
DESARROLLO DE SISTEMAS
FARMACOTERAPÉUTICOS DE LIBERACIÓN
MODIFICADA PARA EL TRATAMIENTO DE
LA TUBERCULOSIS



Farm. Laura Carolina Luciani Giacobbe

2017

DESARROLLO DE SISTEMAS FARMACOTERAPÉUTICOS DE LIBERACIÓN MODIFICADA PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

TRABAJO DE TESIS PARA ACCEDER AL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS DE

Laura Carolina Luciani Giacobbe

DIRECTORA

Prof. Dra. María Eugenia Olivera

COMISIÓN ASESORA

Prof. Dra. Cecilia Alvarez Igarzábal

Prof. Dr. Daniel Allemandi

Prof. Dra. Carla Giacomelli

EVALUADOR EXTERNO

Prof. Dr. Julio Alberto Luna

29 de marzo de 2017





Dedicado a mi familia, con mucho amor



Este trabajo ha sido una gran oportunidad de crecimiento personal y profesional. En estas líneas quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que me ayudaron y acompañaron en este proceso.

Quiero agradecer...

A mi directora de tesis, Prof. Dra. María Eugenia Olivera; por darme la oportunidad de realizar una tesis doctoral en una temática tan interesante para mí, por su compromiso y dedicación con el trabajo;

A los profesores que integran la Comisión Asesora, Prof. Dra. Cecilia Álvarez Igarzábal, Prof. Dr. Daniel Allemandi y Prof. Dra. Carla Giacomelli; por su seguimiento y colaboración;

Al evaluador externo, Prof. Dr. Julio Alberto Luna, por acceder a la corrección del manuscrito;

A la institución que financió mi beca doctoral, CONICET;

A la Universidad Nacional de Córdoba, a la Facultad de Ciencias Químicas y en especial al Departamento de Farmacia, por ser el espacio donde pude realizar mi labor de docencia e investigación;

A quien me guió en mis primeros pasos en la investigación y me contagió el gusto por la tecnología farmacéutica, Prof. Dra. María Verónica Ramírez Rigo;

Al Prof. Dr. Nicolas Litterio y su equipo de investigación de la Universidad Católica de Córdoba, que posibilitaron la realización de los estudios farmacocinéticos en perros;

A las personas que me facilitaron el uso de equipos, especialmente en otros centros de investigación como el INFIQC, el CEQUIMAP, el Laboratorio Hemoderivados y el ICYTAC;

A mis compañeros de laboratorio y de docencia, y especialmente a Lauri, Flor y Lili, por su colaboración, apoyo, compañía y amistad,

A Carola, quien también me acompañó desde el principio;

A todo el personal docente y no docente del Departamento de Farmacia;

A mi familia: mis abuelos, papás y hermanas; ellos son las raíces de donde provengo y las ramas en las cuales me apoyo;

A mi esposo, por su amor, comprensión y ayuda incondicional... Sin él, no lo hubiese logrado;

A mi hijo Juan Felipe, por soportar las ausencias y cambiar las prioridades;

Y especialmente a Dios, por las bendiciones que me concede cada día, por sostenerme y guiarme.

RESUMEN

Este trabajo comprende el desarrollo y evaluación de nuevos materiales y sistemas multiunitarios de liberación segregada y sitio-específica, para la combinación a dosis fija de rifampicina e isoniazida, orientados a la optimización del tratamiento de la tuberculosis. En conjunto, los resultados obtenidos demostraron que los sistemas desarrollados ofrecerían ventajas farmacoterapéuticas, respecto de los productos farmacéuticos disponibles actualmente.

En particular, se obtuvieron materiales portadores de rifampicina e isoniazida mediante asociación de los fármacos a polielectrolitos, específicamente la forma ácida de carboximetilcelulosa y ácido algínico. Estos sistemas fueron caracterizados en relación al tipo de interacción y capacidad de carga, las propiedades cristalinas y reológicas. Los compactos de estos materiales fueron evaluados en cuanto a su hidrofiliidad y la velocidad de liberación.

El sistema portador de rifampicina fue una dispersión sólida cristalina, que aumenta significativamente la hidrofiliidad del fármaco y favorece su rápida disolución. El sistema portador de isoniazida presentó características típicas de un complejo iónico polielectrolito-fármaco, el cual fue un material amorfo, que una vez compactado, liberó isoniazida de manera modulada en medio gástrico simulado y completa en medio intestinal simulado.

En una segunda etapa, a partir de los sistemas portadores de rifampicina e isoniazida compactados en forma de matrices, se evaluó la estabilidad de rifampicina en condiciones que simulan el entorno gástrico. Este estudio demostró que las matrices asociadas mejoran la estabilidad de rifampicina, por segregación de la liberación de isoniazida.

En una tercera etapa, se evaluó la biodisponibilidad oral de las matrices anteriormente obtenidas, observándose un significativo aumento en la biodisponibilidad de rifampicina, respecto de la formulación combinada comercial de referencia. Sin embargo la biodisponibilidad de isoniazida no fue satisfactoria, por lo que se propuso el diseño de un sistema multiunitario conteniendo una formulación de isoniazida de liberación retardada.

Finalmente, se desarrolló un comprimido con cubierta compactada a partir del sistema portador de rifampicina e isoniazida como un comprimido con recubrimiento entérico, con propiedades de liberación secuencial y sitio-específica y estabilidad incrementada. En este desarrollo se utilizaron las estrategias de Calidad desde el Diseño para identificar parámetros críticos del proceso y establecer condiciones de ensayo, que permitan obtener un producto de calidad aceptable.

Se espera que los resultados obtenidos en esta tesis doctoral contribuyan al desarrollo de formulaciones más seguras y confiables, potencialmente útiles para el abordaje farmacoterapéutico de la tuberculosis.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Resumen	1
1.2. Tuberculosis	2
1.2.1. Manifestaciones clínicas de la tuberculosis	4
1.2.2. Tratamiento farmacológico de la tuberculosis	6
1.2.2.1. <i>Adherencia al tratamiento de la tuberculosis</i>	8
1.2.2.2. <i>Fármacos antituberculosos</i>	8
1.2.2.3. <i>Formulaciones en combinación a dosis fijas (CDF) en el tratamiento de la tuberculosis</i>	10
1.2.2.4. <i>Quimioprofilaxis de la tuberculosis</i>	12
1.3. Propiedades más relevantes de los fármacos usados en el tratamiento de la tuberculosis	13
1.3.1. Rifampicina	13
1.3.2. Isoniazida.....	17
1.4. Innovación en el tratamiento de la tuberculosis	19
1.5. Sistemas de liberación modificada de fármacos	20
1.5.1. Diseño de sistemas portadores de fármacos	22
1.5.2. Tipos de sistemas de liberación modificada	23
1.5.2.1. <i>Sistemas monolíticos o matriciales</i>	23
1.5.2.2. <i>Sistemas de reservorio o de liberación controlada por una membrana</i>	24
1.5.2.3. <i>Sistemas con cubiertas entéricas</i>	25
1.5.2.4. <i>Sistemas con bombas osmóticas</i>	25
1.5.2.5. <i>Sistemas de intercambio iónico</i>	26
1.5.3. Sistemas multiunitarios.....	27
1.5.4. Consideraciones generales para el diseño de sistemas de liberación modificada	29
1.5.5. Estrategias para evaluar el desempeño de los sistemas de liberación modificada	31

1.6. Polielectrolitos (PE) utilizados en tecnología farmacéutica	32
1.6.1. Polielectrolitos seleccionados	35
1.6.1.1. <i>Ácido algínico y sus sales</i>	35
1.6.1.2. <i>Carboximetilcelulosa</i>	39
1.7. Esquema de investigación y desarrollo	41
1.8. Hipótesis de trabajo	44
1.9. Objetivos	44
1.10. Referencias	46

CAPÍTULO 2: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES PORTADORES DE RIFAMPICINA-CARBOXIMETILCELULOSA

2.1. Introducción	53
2.1.1. Objetivos	54
2.2. Materiales	54
2.3. Métodos	55
2.3.1. Preparación de CMC-RIF	55
2.3.2. Preparación de RIF.2H ₂ O	55
2.3.3. Determinación del contenido de RIF en CMC-RIF	56
2.3.4. Caracterización de CMC-RIF en estado sólido	56
2.3.4.1. <i>Microscopía óptica de Luz polarizada</i>	57
2.3.4.2. <i>Difracción de rayos X en polvo (DRXP)</i>	57
2.3.4.3. <i>Análisis térmico</i>	57
2.3.4.4. <i>Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido de ¹³C y ¹⁵N</i>	58
2.3.4.5. <i>Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR)</i>	59
2.3.5. Caracterización reológica de los gránulos CMC-RIF	59
2.3.6. Evaluación de captación de agua	60
2.3.7. Liberación de RIF desde matrices CMC-RIF	61
2.4. Resultados	62

2.4.1. Preparación de CMC-RIF	62
2.4.2. Contenido de RIF en los gránulos de CMC-RIF	63
2.4.3. Caracterización de CMC-RIF en estado sólido.....	63
2.4.4. Caracterización reológica de CMC-RIF	72
2.4.5. Captación de agua	73
2.4.6. Liberación de RIF desde CMC-RIF.....	73
2.5. Discusión	74
2.6. Conclusiones	78
2.7. Referencias	80

CAPÍTULO 3: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES PORTADORES DE ISONIACIDA-ACIDO ALGÍNICO

3.1. Introducción	85
3.1.1. Objetivos	86
3.2. Materiales	87
3.3. Metodología	87
3.3.1. Preparación de complejos AA-ISO.....	87
3.3.2. Determinación del contenido de ISO en los complejos	88
3.3.4. Caracterización reológica de los gránulos de AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	88
3.3.3. Caracterización de los complejos AA-ISO _x y AA-ISO _x -Na ₂₅ en estado sólido.....	88
3.3.5. Evaluación de captación de agua	89
3.3.6. Liberación de ISO desde matrices de AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	89
3.4. Resultados	90
3.4.1. Contenido de ISO en los sólidos.....	90
3.4.2. Caracterización de los complejos AA-ISO _x y AA-ISO _x -Na ₂₅ en estado sólido.....	90
3.4.3. Caracterización reológica de gránulos de AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	96
3.4.4. Captación de agua	96
3.4.5. Liberación de ISO desde matrices de AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	97
3.5. Discusión	98

3.6. Conclusiones	100
3.7. Referencias.....	101

CAPÍTULO 4: EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE RIF EN MEDIO ACIDO

4.1. Introducción	103
4.1.1. Objetivos	107
4.2. Materiales	107
4.3. Metodología.....	108
4.3.1. Obtención y purificación de 3FRSV	108
4.3.2. Obtención y purificación de IH.....	108
4.3.3. Caracterización de 3FRSV e IH.....	109
4.3.4. Espectrometría de masa de alta resolución.....	109
4.3.5. Resonancia magnética nuclear en solución (RMN) de ¹³ C	109
4.3.6. HPLC	110
4.3.6.1. Condiciones cromatográficas	110
4.3.6.2. Parámetros de validación del método de cuantificación por HPLC	110
4.3.7. Valoración de RIF desde las formulaciones.....	111
4.3.8. Evaluación de la estabilidad de RIF en medio ácido	112
4.3.8.1. Análisis estadístico	112
4.4. Resultados	113
4.4.1. Obtención y caracterización de 3FRSV e IH.....	113
4.4.1.1. Espectrometría de masa de alta resolución	113
4.4.1.2. RMN de ¹³ C.....	114
4.4.1.3. HPLC.....	116
4.4.2. Valoración de RIF desde las formulaciones.....	119
4.4.2.1. Evaluación de la estabilidad de RIF en medio ácido	119
4.5. Discusión.....	123
4.6. Conclusiones	125

4.7. Referencias.....	126
-----------------------	-----

CAPÍTULO 5: BIODISPONIBILIDAD ORAL DE MATRICES HIDROFÍLICAS POLIELECTROLITO-FÁRMACO DE CMC-RIF+AA- ISO₇₅-Na₂₅

5.1. Introducción	129
5.1.1. Objetivos	129
5.2. Materiales y métodos	130
5.2.1. Desarrollo y validación de la metodología analítica para la cuantificación de RIF e ISO desde plasma.....	130
5.2.1.1. <i>Reactivos</i>	130
5.2.1.2. <i>Instrumentos de recolección de datos</i>	130
5.2.1.3. <i>Metodología de cuantificación de RIF</i>	130
5.2.1.4. <i>Metodología de cuantificación de ISO</i>	131
5.2.2. Parámetros de validación.....	132
5.2.3. Estudio farmacocinético de las matrices CMC-RIF + AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	134
5.2.3.1. <i>Modelo animal</i>	134
5.2.3.2. <i>Administración y muestreo</i>	135
5.2.3.3. <i>Preparación de las muestras para su análisis</i>	135
5.2.3.4. <i>Análisis farmacocinético</i>	136
5.3. Resultados	136
5.3.1. Desarrollo y validación de la metodología analítica para la cuantificación de RIF e ISO desde plasma.....	136
5.3.1.1. <i>Desarrollo y validación del método de cuantificación de RIF</i>	136
5.3.1.2. <i>Desarrollo y validación del método de cuantificación de ISO</i>	138
5.3.2. Estudio farmacocinético de las matrices CMC-RIF + AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	140
5.4. Discusión	142
5.5. Conclusiones	146
5.6. Referencias	147

CAPITULO 6: CALIDAD DESDE EL DISEÑO EN EL DESARROLLO DE COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA DE RIF E ISO

6.1. Introducción	151
6.1.1. Desarrollo de comprimidos con cubierta compactada para el tratamiento de la tuberculosis.....	151
6.1.1.1. <i>Características de los componentes empleados en la elaboración de comprimidos con cubierta compactada</i>	153
6.1.2. Calidad desde el diseño.....	155
6.1.3. Aplicación de QbD en el desarrollo farmacéutico.....	156
6.1.3.1. <i>Primera Etapa: identificación de objetivos</i>	156
6.1.3.2. <i>Segunda Etapa: establecimiento de los requerimientos críticos</i>	156
6.1.3.3. <i>Tercera Etapa: diseño del plan experimental</i>	157
6.1.3.4. <i>Cuarta Etapa: articulación del proceso</i>	158
6.1.4. Objetivos	158
6.2. Materiales	158
6.3. Metodología	159
6.3.1. Definición de los atributos de calidad del producto	159
6.3.2. Establecimiento de los parámetros críticos de control.....	160
6.3.3. Diseño experimental	161
6.3.3.1. <i>Efecto de la granulación húmeda de ISO en el flujo de los polvos</i>	162
6.3.3.2. <i>Efecto de la composición del núcleo y de la cobertura entérica en su desempeño farmacotécnico y biofarmacéutico</i>	163
6.3.3.3. <i>Efecto de la composición de la capa externa en el desempeño farmacotécnico y biofarmacéutico de los comprimidos con cubierta compactada</i>	166
6.3.3.4. <i>Efecto de la composición de la capa externa y de la cobertura adhesiva en la friabilidad de los comprimidos con cubierta compactada</i>	168
6.3.3.5. <i>Efecto de la fuerza de compresión final y la composición del núcleo en su desempeño biofarmacéutico</i>	169
6.4. Resultados	170
6.4.1. Establecimiento de los parámetros críticos de control.....	171
6.4.2. Efecto de la granulación húmeda de ISO en el flujo de los polvos	174

6.4.3. Efecto de la composición del núcleo en su desempeño farmacotecnico y biofarmacéutico	175
6.4.4. Efecto de la cobertura entérica en el desempeño farmacotecnico y biofarmacéutico de los núcleos.....	177
6.4.5. Efecto de la composición de la capa externa en el desempeño farmacotécnico y biofarmacéutico de los comprimidos con cubierta compactada.....	179
6.4.6. Efecto de la composición de la capa externa y la cobertura de alcohol polivinílico en la friabilidad de los comprimidos con cubierta compactada	181
6.4.7. Efecto de la fuerza de compresión final y la composición del núcleo en su desempeño biofarmacéutico	182
6.5. Discusión.....	185
6.6. Conclusiones	186
6.7. Referencias.....	187

CAPÍTULO 7: CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

7.1. Conclusiones generales.....	189
7.2. Proyecciones	191
7.3. Referencias.....	193
ANEXOS	195
PUBLICACIONES GENERADAS A PARTIR DE ESTA TESIS	201

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

3FRSV: 3-formil rifamicina SV	FDA: Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos.	PVP: polivinilpirrolidona
AA: Acido algínico	FI: Farmacopea Internacional	QbD: <i>quality by design</i> , calidad desde el diseño
AANa: Alginato de sodio	FTIR: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier	RIF: rifampicina
ABC: Área bajo la curva	G: ácido gulurónico	RMN: Resonancia Magnética Nuclear
ANMAT: Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica	H ₂ O: Agua	RNA: ácido ribonucleico
ANOVA: análisis de varianza	HCl: ácido clorhídrico	S: solubilidad
CDF: combinación a dosis fija	HPLC: Cromatografía líquida de alta presión	SCB: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
C _{max} : Concentración plasmática máxima	I+D: Investigación y desarrollo	SCT: <i>short contact time</i>
CMC: carboximetilcelulosa	IH: isonicotil hidrazona	SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
CMCNa: carboximetilcelulosa sódica	ISO: isoniazida	TB-MR: tuberculosis multiresistente
CP/MAS: <i>cross polarization/magic angle spinning</i>	Log P: coeficiente de partición	TB-RR: tuberculosis resistente a rifampicina
CV: coeficiente de variación	M: ácido manurónico	TB-XR: tuberculosis extremadamente resistente
DNA: ácido desoxiribonucleico	MPC: microscopía de platina calentable	TLC: cromatografía en capa delgada
DRXP: Difractometría de Rayos X de polvos	MF: Mezcla Física	t _{max} : tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
D: dosis	n: número de determinaciones	TGA: Termogravimetría
D/S: relación dosis/solubilidad	NaOH: Hidróxido de Sodio	USP: <i>United States Pharmacopoeia</i> , Farmacopea de los Estados Unidos.
DSC: Calorimetría diferencial de barrido	OMS: Organización Mundial de la Salud	UV: Ultravioleta
ED: Eficiencia de disolución	PDA: Arreglo de diodos	VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana
EE: Error estándar	PE: Polielectrolito	
EST: estreptomina	pKa: Constante de disociación ácida	
FA: Farmacopea Argentina	PM: peso molecular	
	PNCTyL: Programa Nacional del Control de la Tuberculosis y la Lepra	

UNIDADES DE MEDIDA UTILIZADAS

Clasificación	Unidad
<i>Tiempo</i>	μ s: microsegundo ms: milisegundo s: segundo min: minuto h: hora
<i>Masa</i>	μ g: microgramo mg: miligramos g: gramos Kg: kilogramos t: tonelada
<i>Concentración</i>	M: molaridad eq: equivalentes % p/p: porcentaje peso en peso % p/v: porcentaje peso en volumen
<i>Volumen</i>	mL: mililitro
<i>Longitud</i>	μ m: micrómetro mm: milímetro nm: nanómetro
<i>Temperatura</i>	°C: grados centígrados
<i>Otros</i>	mPa: milipascales Hz: Hertz (hercio) kHz: kilohertz rpm: revoluciones por minuto kV: kilovolts mA: miliamperes

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. RESUMEN

La tuberculosis representa en la actualidad un importante problema de salud pública. De hecho, es una de las 10 principales causas de muerte por enfermedades transmisibles a nivel mundial, siendo responsable de más muertes que el SIDA (1). A pesar de que esta enfermedad es prevenible y curable, su alta incidencia es debida, entre otras razones, a problemas de funcionamiento del sistema de salud, la falta de detección de los casos existentes, problemas de adherencia al tratamiento, la coinfección con VIH y la aparición de resistencia a los fármacos antituberculosos (2,3).

Rifampicina (RIF) e isoniazida (ISO) son fármacos de primera línea que se utilizan en el tratamiento de la tuberculosis. Se administran como formas farmacéuticas sólidas (comprimidos o cápsulas) de liberación inmediata en combinación a dosis fijas (CDF) y, además, pueden estar asociadas a etambutol (ETA) y pirazinamida (PIR) (4).

Es ampliamente conocida la inestabilidad química de RIF en el entorno ácido del medio estomacal. Esta descomposición se ve favorecida en presencia de ISO en la formulación, en una magnitud proporcional a su concentración (5). Por otra parte, la baja hidrofiliidad de RIF incide negativamente en su disolución (6). Estos aspectos, entre otros, afectan la biodisponibilidad oral de RIF cuando se administra en CDF con ISO, lo que da lugar a niveles plasmáticos sub-terapéuticos de RIF. Esto aumenta el riesgo de desarrollo de resistencia microbiana.

Sistemas multiunitarios de RIF e ISO, que permitan la liberación secuencial y sitio-específica de RIF (en estómago) e ISO (en intestino) podrían mejorar la efectividad y la estabilidad de RIF.

En este contexto, es de interés el desarrollo de materiales por asociación de los fármacos a polielectrolitos (PE) de carga opuesta (complejos PE-fármaco u otras dispersiones sólidas). Estos materiales pueden ser fácilmente manipulados por las técnicas habituales de procesamiento farmacéutico (granulación, secado, compresión, entre otros) y permiten

obtener una amplia variedad de formulaciones, con diferentes propiedades de liberación de los fármacos.

PE, tales como la forma ácida de carboximetilcelulosa y ácido algínico, presentan propiedades de liberación muy rápida y sostenida, respectivamente. La formación de dispersiones sólidas con RIF e ISO, permitirían desarrollar sistemas multiunitarios, tales como comprimidos bicapa (a partir de matrices) o comprimidos con cubierta compactada, que presenten una fase de liberación rápida de RIF y otra fase de ISO de liberación sostenida o retardada.

El desarrollo farmacéutico planteado, pretende ser económico y accesible, de manera que sea factible de ser transferido al sector de producción pública de medicamentos, con un incremento positivo en tecnología de productos e innovación.

1.2. TUBERCULOSIS

La tuberculosis representa en la actualidad un importante problema de salud pública en el mundo debido a sus altas tasas de incidencia y mortalidad. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2015 surgieron 10,4 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1,8 millones murieron por esta enfermedad, entre ellos, 400.000 personas coinfectadas con VIH. Esta enfermedad es una de las 10 principales causas de muerte en todo el mundo, siendo responsable de más muertes que el SIDA. Más del 95% de las muertes por tuberculosis se producen en países de ingresos bajos y medianos (1).

En Argentina, en 2015 se notificaron 9.600 casos nuevos de tuberculosis, mientras que alrededor de ochocientas personas murieron debido a esta enfermedad (12,5 % de estos fueron VIH positivos) (1).

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica producida por el *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch, que se localiza generalmente en el pulmón, aunque puede afectar también a otros órganos. Se transmite por contacto directo de persona a persona, por inhalación de aerosoles contaminados con el bacilo, que han sido eliminados por los individuos enfermos al toser, hablar o estornudar. Se puede producir una infección latente silenciosa o una enfermedad progresiva y activa (7).

Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente, término aplicado a las personas infectadas por el bacilo pero que aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección. Estas personas tienen un riesgo del 6 al 10% de enfermarse de tuberculosis a lo largo de su vida. Este riesgo se incrementa al 50-60% si son personas VIH

positivas (8,9). La misma tendencia se observa en otras situaciones de inmunodepresión, por ejemplo ante desnutrición o diabetes, o si son consumidores de tabaco (3).

Cuando se desarrolla tuberculosis activa, los síntomas tales como tos, fiebre, sudores nocturnos y pérdida de peso, pueden ser leves durante muchos meses. Esto puede hacer que la persona afectada tarde en buscar atención médica, con el consiguiente riesgo de que la bacteria se transmita a otros sujetos. Una persona con tuberculosis activa puede infectar a lo largo de un año a entre 10 y 15 personas por contacto directo. Si no se proporciona un tratamiento adecuado, pueden morir más del 45% de las personas VIH-negativas con tuberculosis y prácticamente la totalidad de las personas coinfectadas con VIH (3).

Si bien hace más de 80 años que existe la vacuna derivada del bacilo de Calmette y Guérin (vacuna BCG), que se utiliza de manera extensiva para la prevención de esta enfermedad, su efectividad es limitada. Se ha documentado el efecto protector en niños de esta vacuna contra la meningitis tuberculosa y la tuberculosis diseminada. Sin embargo, la vacuna no evita la infección primaria y, lo que es más importante, no evita la reactivación de la infección pulmonar latente, la principal fuente de propagación del bacilo en la comunidad. A pesar de ello, y teniendo en cuenta las graves consecuencias de una infección por tuberculosis multirresistente o la coinfección con VIH, se continúa recomendando la administración de una única dosis del BCG a los recién nacidos en países con prevalencia alta de tuberculosis (10,11).

El diagnóstico precoz y el tratamiento adecuado de esta enfermedad lograrían la curación en la mayoría de los pacientes. Esto conllevaría a una disminución de las fuentes de infección así como también del riesgo de contagio. Sin embargo, la tuberculosis es aún hoy la causa más importante de muertes evitables y es un importante problema en los países en desarrollo (12). Esto se debe, especialmente, a problemas de funcionamiento del sistema de salud en el manejo de la enfermedad, la falta de detección de los casos existentes, los abandonos del tratamiento, la coinfección con VIH y la aparición de resistencia a los fármacos antituberculosos tradicionales (2,3).

Considerando la severidad y expansión de la enfermedad, la OMS declaró, en 1993, la emergencia global de la tuberculosis. Por ello, se instauraron los tratamientos directamente observados en los programas de erradicación de la tuberculosis y el uso de las combinaciones a dosis fija (CDF) de dos o más de los fármacos de primera línea (12).

A 26 años de este hecho, se han reducido considerablemente las tasas de morbi-mortalidad de tuberculosis. Sin embargo, esta enfermedad sigue teniendo un enorme impacto a nivel

mundial. Actualmente la OMS planteó la estrategia *Fin a la tuberculosis*, cuyos indicadores para el año 2035 son los siguientes:

- reducción de la mortalidad y la tasa de incidencia por tuberculosis en un 95 y 90%, respectivamente, de lo informado en el año 2015;
- ausencia de familias que tengan que afrontar gastos desmedidos, ocasionados por la tuberculosis.

Para llevar a cabo estas metas, se han apoyado en tres pilares fundamentales: 1. Atención y prevención integradas y centradas en el paciente; 2. Políticas audaces y sistemas de apoyo; 3. Intensificación de la investigación y la innovación (13). En este marco, la investigación y desarrollo en sistemas farmacoterapéuticos innovadores, podría aportar a esta estrategia.

1.2.1. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA TUBERCULOSIS

Si bien la mayoría de los casos de la tuberculosis se producen en el pulmón (tuberculosis pulmonar), hay casos en los que la tuberculosis se produce en otros órganos (tuberculosis extrapulmonar) (7).

La tuberculosis pulmonar es la forma más frecuente y la más contagiosa y representa alrededor del 80 al 85% del total de los casos. Se presenta con signos respiratorios como tos seca o productiva, expectoración con o sin hemoptisis, dolor torácico y síntomas generales tales como anorexia, astenia, adinamia, sudoración nocturna, pérdida de peso y, a veces, fiebre prolongada. El examen del aparato respiratorio de los pacientes con tuberculosis suele ser normal, a pesar de lo extensa que pueda ser la afección a nivel radiológico (7).

La tuberculosis extrapulmonar comprende entre el 15 al 20% de todos los casos de tuberculosis, en los cuales están afectados otros órganos diferentes del pulmón. Las formas más frecuentes de tuberculosis extrapulmonar son la pleural y la ganglionar, seguidas por la genitourinaria. Los síntomas de la tuberculosis extrapulmonar, dependerán del órgano afectado (7).

Tal como se muestra en la **Tabla 1.1**, los pacientes tuberculosos son clasificados en categorías (entre I y IV), según la localización y gravedad de la enfermedad, así como también la bacteriología y los antecedentes de tratamiento previo (3).

Tabla 1.1. Categorización de los pacientes tuberculosos de acuerdo a la localización y gravedad de la enfermedad, así como también la bacteriología y los antecedentes de tratamiento previo.

Categoría I Caso nuevo	<ul style="list-style-type: none">• Caso nuevo de tuberculosis pulmonar con baciloscopía positiva.• Caso de tuberculosis pulmonar baciloscopía negativa, con lesiones radiológicas extensas y sintomatología importante.• Caso de tuberculosis extrapulmonar severa: meningitis, pericarditis, peritonitis, pleuresía bilateral, intestinal, genitourinaria, vertebral y osteoarticular, diseminada (miliar).
Categoría II Casos con tratamiento previo	<ul style="list-style-type: none">• <i>Caso de interrupción del tratamiento o abandono:</i> Paciente que realizó tratamiento por más de un mes, y lo interrumpe por dos meses o más, y persiste con baciloscopía positiva o baciloscopía negativa, pero con evidencia clínica o radiológica de tuberculosis activa.• <i>Caso de recaída:</i> paciente con antecedentes de tuberculosis que completó el tratamiento y fue dado de alta como curado y que tiene baciloscopía o cultivo de esputo positivo.• <i>Caso de fracaso operativo:</i> Paciente en tratamiento que continúa o vuelve con bacteriología positiva (baciloscopía o cultivo de esputo) al final del cuarto mes de iniciado un primer tratamiento no supervisado muy irregular.
Categoría III Caso nuevo	<ul style="list-style-type: none">• Caso nuevo de tuberculosis pulmonar con baciloscopía negativa que no está incluido en la Categoría I.• Caso de tuberculosis extrapulmonar menos severa que los incluidos en la Categoría I (ganglionar, pleuresía unilateral y tuberculosis de piel localizada sin diseminación aparente).
Categoría IV	<ul style="list-style-type: none">• <i>Caso de fracaso farmacológico:</i> Paciente en tratamiento que continúa o vuelve con bacteriología positiva (baciloscopía o cultivo de esputo) al finalizar el cuarto mes de haber comenzado un primer tratamiento directamente observado.• <i>Caso crónico:</i> Paciente que continúa o vuelve a presentar baciloscopía o cultivo positivo después de completar un retratamiento directamente observado.• <i>Caso de tuberculosis resistente a rifampicina (TB-RR):</i> Paciente con tuberculosis activa en el que se aíslan bacilos resistentes a rifampicina (RIF).• <i>Caso de tuberculosis multirresistente (TB-MR):</i> Paciente con tuberculosis activa en el que se aíslan bacilos resistentes al menos a dos fármacos de primera línea, generalmente isoniazida (ISO) y RIF.• <i>Caso de tuberculosis extermadamente-resistente (TB-XR):</i> Paciente con tuberculosis activa en el que se aíslan bacilos resistentes a ISO, RIF, así como a todas las fluoroquinolonas y a por lo menos uno de tres medicamentos inyectables de segunda línea (por ejemplo, amikacina, kanamicina o capreomicina).

1.2.2. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA TUBERCULOSIS

El tratamiento de la tuberculosis es complejo (ver **anexo 1**). De hecho, consta de la utilización concomitante de hasta cinco fármacos, por un período que oscila entre 6 a 20 meses, según la gravedad del caso. Este tratamiento pretende curar al paciente, evitar recaídas, prevenir muertes, impedir la transmisión y prevenir la resistencia bacteriana. En este contexto, es ampliamente considerada la utilización de formulaciones en CDF.

Para asegurar al máximo la posibilidad de curación sin recaídas, todo tratamiento debería asociar al menos 4 fármacos. En el caso que se trate de una recaída, estos no debieran haber sido utilizados previamente. Al menos 2 de ellos deberían ser fármacos de primera línea o esenciales, uno con buena actividad bactericida (capacidad de matar a los bacilos en replicación activa, que son los que provocan los síntomas y la muerte del paciente) y otro con buena capacidad esterilizante (capacidad de matar a los bacilos en fases latentes, productores de las recaídas). Como son los fármacos que van a curar al paciente, idealmente deberían administrarse todo el tiempo que dure el tratamiento. Los otros dos fármacos, denominados acompañantes, no están en el régimen terapéutico para eliminar bacilos de una manera específica, sino para proteger a los fármacos “esenciales” del desarrollo de resistencia microbiana. Teóricamente, estos fármacos “acompañantes” se podrían suspender cuando se haya conseguido la conversión bacteriológica, sinónimo de que existe una población bacilar muy reducida.

Es importante destacar que si un fármaco “esencial” no se puede usar por resistencia o toxicidad, debe ser reemplazado por otro con una acción similar (bactericida o esterilizante). En la **Tabla 1.2** se representa la capacidad bactericida, esterilizante y de prevención de resistencias de los diferentes fármacos, así como su toxicidad.

Además de tener en cuenta los fármacos, en el tratamiento de la tuberculosis se debe tener en cuenta el régimen y la modalidad de tratamiento.

En función de lo expuesto previamente, el régimen terapéutico para el tratamiento de la tuberculosis consta de dos fases. En la fase inicial, intensiva o esterilizante, los medicamentos se administran en forma diaria. En la segunda fase, de consolidación, los medicamentos se podrán administrar o bien diariamente, o tres veces por semana (trisemanal).

En relación a la modalidad de tratamiento, el mismo puede ser directamente observado o autoadministrado. En el tratamiento directamente observado el paciente se administra los medicamentos bajo la supervisión de otra persona, ya sea en el centro de salud al que

concorre en forma diaria, o en su domicilio o su trabajo, si alguna persona designada visita diariamente al paciente. Esta estrategia es el esquema promovido por la OMS desde 1995, ya que se mejora la adherencia al tratamiento y baja el riesgo de aparición de multirresistencia debida a la toma irregular de los medicamentos y al abandono. En el tratamiento autoadministrado, el paciente toma los medicamentos sin supervisión, y es el único responsable de su correcta administración. Este régimen terapéutico tiene un alto riesgo de abandono de la medicación, lo que genera no sólo la persistencia de la tuberculosis en el enfermo con la consiguiente posibilidad de seguir transmitiendo la misma, sino que es una de las causas de aparición de resistencia a los fármacos, tanto para el paciente que abandona, como para todos sus contactos.

En Argentina, la medicación antituberculosa es provista de manera gratuita por el Programa Nacional para el Control de la Tuberculosis y Lepra (PNCTByL), el cual adhiere a la Estrategia *Alto a la Tuberculosis* impulsada por la OMS.

Tabla 1.2. Actividad y toxicidad de los fármacos con actividad frente a *M. tuberculosis*, extraído de Caminero Luna (14)

Actividad	Prevención de resistencias	Actividad bactericida	Actividad esterilizante	Toxicidad
Alta	Rifampicina Isoniazida Etambutol	Isoniazida Rifampicina	Rifampicina Pirazinamida Moxifloxacino Levofloxacino	Ácido para-aminosalicílico Etionamida Cicloserina Linezolid
Moderada	Estreptomina Kanamicina Amikacina Capreomicina Moxifloxacino Levofloxacino Etionamida Cicloserina Ácido para-aminosalicílico Linezolid*	Estreptomina Kanamicina Amikacina Capreomicina Moxifloxacino Levofloxacino Linezolid*	Linezolid Clofazimina Bedaquilina* Delamanid*	Estreptomina Kanamicina Amikacina Capreomicina Pirazinamida
Baja	Pirazinamida	Etionamida Pirazinamida		Etambutol Rifampicina Isoniazida Moxifloxacino Levofloxacino

* poca evidencia clínica que compruebe su actividad

1.2.2.1. ADHERENCIA AL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Si bien los regímenes terapéuticos recomendados por la OMS han demostrado ser sumamente efectivos para prevenir y tratar la tuberculosis, la adherencia deficiente a la medicación antituberculosa es una de las principales barreras para su control mundial. La tuberculosis es una enfermedad transmisible, por lo tanto, la adherencia deficiente a un tratamiento prescrito aumenta los riesgos de morbilidad, mortalidad y farmacorresistencia en el orden individual y comunitario (15).

La adherencia al tratamiento de la tuberculosis se refiere al grado de cumplimiento del paciente en la administración del régimen terapéutico establecido en cada fase del tratamiento. En esto, debe considerarse el respeto del esquema posológico, tanto en la cantidad de unidades como el momento del día establecido para la administración (16).

Existen múltiples factores que impiden la adherencia al tratamiento antituberculoso. Entre estos se destacan factores socio-económicos, otros relacionados con el sistema, el equipo de atención sanitaria, la enfermedad, el tratamiento y el paciente.

Respecto a los factores relacionados con el tratamiento y que afectan la adherencia, cabe destacar que el número elevado de comprimidos que deben administrarse, así como su toxicidad y los efectos adversos asociados con su uso pueden actuar como un obstáculo para la continuidad del tratamiento. Como solución a esta problemática, los tratamientos directamente observados son una herramienta importante para asegurar la administración del medicamento y el contacto con el paciente para evidenciar situaciones de posible abandono. Además, la asociación de fármacos en CDF reduce el número de comprimidos a administrar, mejorando la adherencia.

1.2.2.2. FÁRMACOS ANTITUBERCULOSOS

Para el tratamiento de la tuberculosis se cuenta con fármacos de primera y segunda línea.

Es mundialmente reconocido que los fármacos de primera línea, principales, o esenciales son RIF, ISO, PIR, ETA y estreptomicina (EST) (3,4). Estos fármacos son efectivos en la mayoría de los casos y logran la curación de los pacientes en un periodo de seis meses o más, de acuerdo a la categoría de la enfermedad. Tal como se observa en la **Figura 1.1**, estos antibióticos presentan sitios de acción diferentes en la micobacteria, por lo que su combinación genera una acción más potente. El tipo de acción, las dosis utilizadas y presentaciones comerciales de éstos fármacos, se describen en la **Tabla 1.3**.

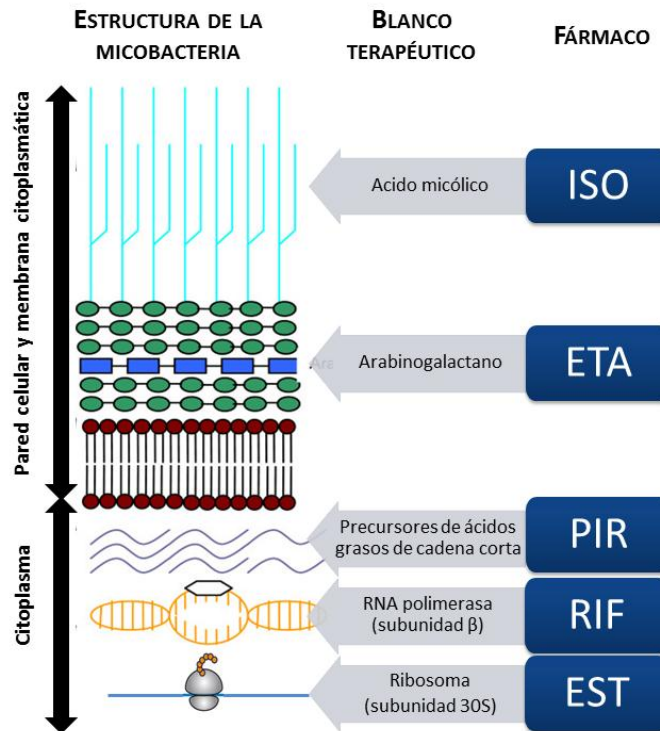


Figura 1.1. Sitios de acción de los principales fármacos antituberculosos, adaptado de Du Toit et al. (38).

Tabla 1.3. Tipo de acción, las dosis utilizadas y presentaciones comerciales de los fármacos de primera línea utilizados en el tratamiento de la tuberculosis (3).

Fármaco	Acción terapéutica	Dosis recomendada		Presentación comercial (vía de administración)
		Dosis diaria QD (dosis máxima)	Dosis trisemanal QD	
Isoniazida	bactericida	5 mg/kg (300 mg)	10 mg/kg	Comprimidos de 100 y 300 mg (Oral) Jarabe 2 % (Oral) Solución inyectable 2,5% (IV o IM)
Rifampicina	bactericida	10 mg/kg (600 mg)	10 mg/kg	Cápsulas 300 mg (Oral) Suspensión 2% (Oral) Polvo para solución inyectable 2% (IV)
Pirazinamida	bactericida	25-30 mg/kg	35 mg/kg	Comprimidos de 250 mg (Oral)
Etambutol	bacteriostático	15-20 mg/kg	30 mg/kg	Comprimidos de 400 mg (Oral)
Estreptomicina	bactericida	15 mg/kg (1000mg)	*	Polvo para solución inyectable 1 % (IM)

QD: *quaque die*, administrada una vez al día.

IV: intravenosa

IM: intramuscular

*Estreptomicina no se utiliza en forma trisemanal

Los fármacos de segunda línea son más tóxicos, más costosos y menos activos contra cepas de *Mycobacterium sp.* y se utilizan en caso de reacciones adversas y resistencia a fármacos de primera línea, particularmente RIF o ISO. La adherencia a este régimen terapéutico es fundamental, ya que formas más graves de tuberculosis agotan las posibilidades de tratamiento y conllevan a la muerte. En la **Tabla 1.4** se resumen los fármacos de segunda línea. La clasificación en grupos se utiliza para facilitar la interpretación en el diseño del tratamiento farmacológico.

Tabla 1.4. Fármacos de segunda línea, recomendados para el tratamiento de TB-RR y TB-MR (17)

Grupo		Fármacos
A. Fluoroquinolonas		Levofloxacina Moxifloxacina Gatifloxacina
B. Agentes inyectables de segunda línea		Amikacina Capreomicina Kanamicina Estreptomina*
C. Otros agentes de segunda línea		Etionamida/ protionamida Cicloserina/terizidona Linezolid Clofazimina
D. Agentes complementarios (que no forman parte del régimen básico TB-MR)	D1	PIR ETA dosis altas de ISO
	D2	Bedaquiline Delamanid
	D3	Ácido p-aminobsalíclico Imipenem-cilastatina Meropenem Amoxicilina-ácido clavulánico Tioacetazona**

*estreptomina puede sustituir otros agentes inyectables, cuando los aminoglucósidos o la capreomicina no pueden utilizarse y la susceptibilidad de la micobacteria a estos antibióticos es alta.

**Por su toxicidad, antes de iniciar un tratamiento con tioacetazona se debe confirmar que el paciente es VIH-negativo.

1.2.2.3. FORMULACIONES EN COMBINACIÓN A DOSIS FIJAS (CDF) EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Las CDF contienen dos o más fármacos de primera línea, vehiculizados en diferentes presentaciones sólidas (comprimidos o cápsulas) de liberación inmediata. La OMS, en su documento *Tratamiento de la Tuberculosis: Directrices para los programas nacionales*, detalla una serie de combinaciones posibles (4).

En Argentina el PNCTyL provee de las siguientes CDF, descriptas en la **Tabla 1.5**.

Tabla 1.5. Formulaciones en CDF disponibles en Argentina para el tratamiento de la tuberculosis (3)

Asociación	Fármacos	Dosis
Doble	ISO+RIF	150 mg+300 mg
Triple	ISO+RIF+ PIR	75 mg + 150mg + 400 mg
Cuádruple	ISO + RIF + PIR + ETA	75 mg + 150mg + 400 mg+ 275 mg

La utilización de formulaciones en CDF, reduce significativamente el número de comprimidos administrados. La **Figura 1.2** ejemplifica el esquema terapéutico para un caso nuevo de tuberculosis pulmonar (categoría III), considerando el uso de CDF o de fármacos separados. Como se evidencia de la figura, en la fase intensiva el tratamiento con fármacos separados requiere la administración diaria de 12 unidades de comprimidos, mientras que con el tratamiento en CDF la cantidad de unidades se reduce a 4.

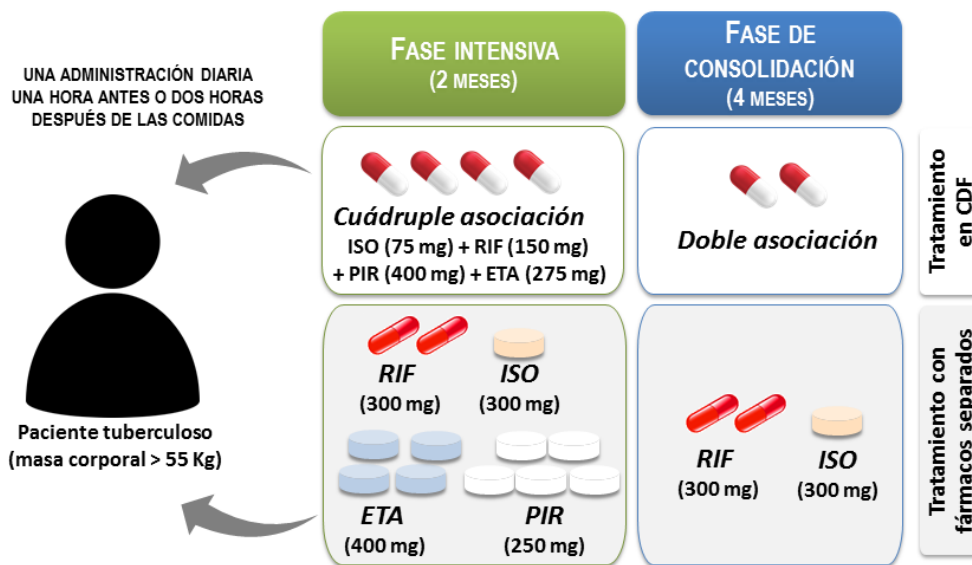


Figura 1.2. Ejemplo de un esquema terapéutico para un caso nuevo de tuberculosis pulmonar (categoría III), considerando el tratamiento en CDF o con fármacos separados.

Las formulaciones en CDF presentan múltiples ventajas respecto de las formulaciones separadas. Entre éstas, se destaca que las CDF mejoran la adherencia del paciente al tratamiento, previenen la monoterapia lo cual conllevaría a la aparición de resistencia, simplifican el tratamiento, minimizan los errores de prescripción y mejoran el cumplimiento

del paciente. Sumado a esto, se simplifican el manejo del stock y el proceso de distribución de la medicación (4,18).

La provisión confiable de productos de alta calidad en CDF es una parte esencial del tratamiento de la tuberculosis. En algunos países del mundo, la escasez de estos productos es frecuente, vinculada por lo general a problemas financieros, sistemas de adquisición deficientes y manejos inadecuados, y, aunque la escasez de estos medicamentos no es el único problema, sus consecuencias son extremadamente serias.

La OMS y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y enfermedades Pulmonares recomiendan que sólo se usen CDF cuya biodisponibilidad y bioequivalencia hayan sido demostradas (4), por lo que su calidad fisicoquímica y biofarmacéutica es un problema de relevancia a nivel mundial.

La calidad de las CDF y la biodisponibilidad reducida de RIF en ciertas formulaciones, respecto de la administración de las formulaciones individuales por separado, es el mayor impedimento para la generalización del uso de las CDF en la terapia de la tuberculosis. La calidad de las CDF responde a factores múltiples y críticos, que afectan los procesos farmacéuticos y biofarmacéuticos en los sistemas de liberación inmediata. Además, el problema de la calidad de las formulaciones conteniendo RIF no se limita solo a las CDF, sino que se extiende también a las formulaciones individuales, poniendo de manifiesto que la contribución de los problemas farmacéuticos es predominante.

Uno de los motivos por el cual la biodisponibilidad de RIF es inaceptable, es por su degradación en el entorno ácido del medio estomacal, favorecida por la presencia de ISO en la CDF. Esta descomposición ha sido demostrada ampliamente. Estudios *in vitro* han demostrado que los niveles de RIF se reducen hasta un 50% de la dosis cuando la CDF permanece en HCl 0,1 M durante 3 h (19). Niveles plasmáticos sub-terapéuticos de RIF, ocasionados por productos de calidad deficiente, podrían aumentar el riesgo de resistencia, en vista de que su actividad es altamente dosis-dependiente (20,21) y su mecanismo de resistencia se desarrolla en un único paso (22).

1.2.2.4. QUIMIOPROFILAXIS DE LA TUBERCULOSIS

La quimioprofilaxis antituberculosa es la quimioterapia específica empleada con finalidad preventiva para evitar el desarrollo de la enfermedad en un sujeto sano infectado con riesgo de padecer tuberculosis.

La quimioprofilaxis, se realiza habitualmente con una toma matutina y en ayunas, de ISO durante 6 meses, utilizando la misma posología que para el tratamiento de la enfermedad (3). También se han descrito pautas de ISO + RIF durante 3 meses, con similar eficacia (14).

Recientemente, se han realizado ensayos clínicos para evaluar una quimioprofilaxis más sencilla, con una dosis semanal durante 3 meses, de ISO y rifapentina (una rifamicina con larga vida media y los mismos problemas de estabilidad en medio ácido que RIF (23)). Se trataría, por lo tanto, de solo 12 dosis de este tratamiento, que tendría una eficacia similar a los 9 meses de ISO (14).

1.3. PROPIEDADES MÁS RELEVANTES DE LOS FÁRMACOS USADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

RIF e ISO son fármacos antituberculosos de primera línea que, por su efectividad, están presentes a lo largo de todo el tratamiento. Sin embargo, el problema de estabilidad de RIF en medio ácido estomacal, acelerado por la presencia de ISO en la CDF conlleva a fallas en el tratamiento. Dada la relevancia de este inconveniente, es de interés abordar el desarrollo de una formulación superadora en CDF de éstos fármacos.

A continuación se describen las propiedades más relevantes de RIF e ISO.

1.3.1. RIFAMPICINA

RIF (**Figura 1.3**) es un potente antibiótico, activo contra ciertas bacterias gram positivas, gram negativas y todas las poblaciones de bacilos tuberculosos y otras micobacterias. Es efectiva contra bacilos que se encuentran en rápida división en lesiones cavernosas extracelulares, así como también contra microorganismos en estado latente, como los que se encuentran en lesiones caseosas y macrófagos. Se une a la subunidad β de la RNA-polimerasa procarionte dependiente de DNA, por lo que inhibe la unión de esta enzima al DNA y bloquea la transcripción (24). Tal como lo recomienda la OMS, es el principio activo clave en el tratamiento combinado de tuberculosis y lepra.

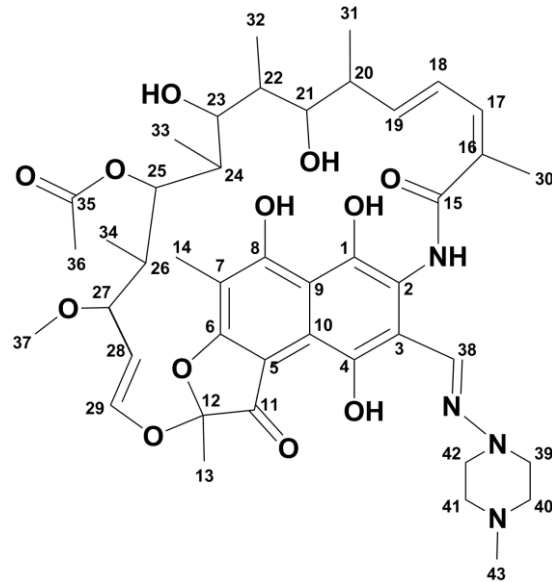


Figura 1.3. Estructura molecular numerada de RIF (PM=822,95g/mol).

RIF presenta dos polimorfos cristalinos anhidros (formas I y II) y también se encuentra en forma amorfa. Adicionalmente, existe una forma monohidrato, un dihidrato y un pentahidrato (25,26). De acuerdo al proveedor, el material a granel disponible comercialmente de RIF, puede ser un polimorfo puro o contener una mezcla de las formas cristalinas o amorfa (27), y por ello, es importante su caracterización.

RIF es estable en estado sólido, cuando se lo conserva en recipientes cerrados a temperatura ambiente bajo protección de la humedad, la luz y el oxígeno. Sin embargo, en soluciones ácidas hidroliza rápidamente, mientras que en condiciones neutras, la hidrólisis es relativamente lenta.

RIF es una molécula zwitteriónica, con un pK_{a1} de 1,7, asociado al grupo hidroxilo en el C4 y un pK_{a2} de 7,9 relacionado con el N-CH₃ del anillo piperazina. Ya que RIF tiene capacidad de ionizarse tanto a pHs ácidos como básicos, su solubilidad es pH dependiente (**Figura 1.4**) y mínima entre pHs 3 y 8 (entre 0,64 y 5,44 mg/mL; según lo informado por Becker et al (26)). Cabe destacar que a nivel del tracto gastrointestinal, RIF solo es soluble en el estómago (28), donde el pH oscila, en estado de ayuno, entre 1 y 3.

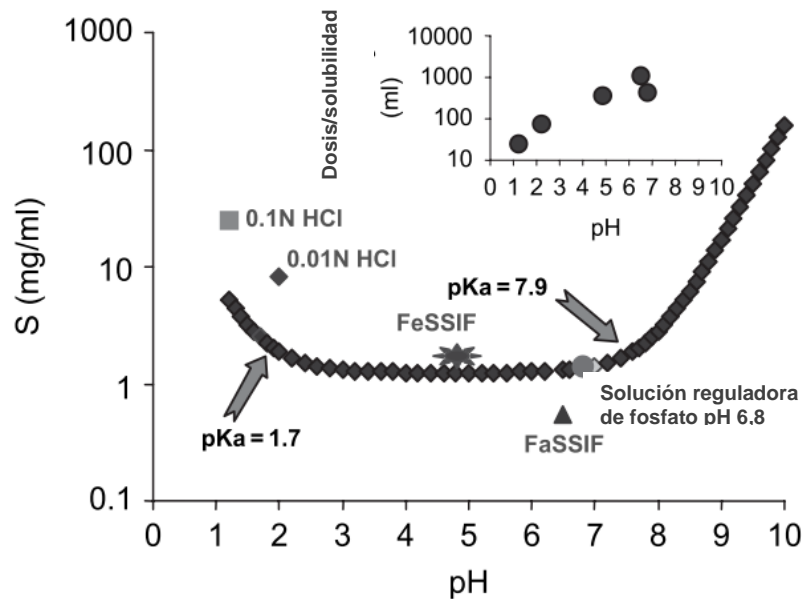


Figura 1.4. Solubilidad (S) de RIF en diferentes medios biorrelevantes. Extraído de Panchagnula et al (28). La curva indica predicciones de solubilidad teórica, basadas en los datos experimentales y los valores de pKa de RIF. (■) Solubilidad en HCl 0,1N; (◆) Solubilidad en HCl 0,01N; (*) Solubilidad en medio intestinal simulando el estado posprandial (FeSSIF, por sus siglas en inglés); (▲) Solubilidad en medio intestinal simulando el estado de ayuno (FaSSIF, por sus siglas en inglés); (●) Solubilidad en solución reguladora de fosfato pH 6,8.

RIF presenta un log P de 4,2. A su vez presenta alta permeabilidad intestinal, tanto en animales de experimentación (29) como en humanos (30). Debido a que RIF es sustrato de la glicoproteína-P, su absorción depende de la saturación de éstas proteínas de eflujo en el intestino delgado. En consecuencia, su absorción es dependiente de la dosis (31).

Teniendo en cuenta que RIF presenta baja solubilidad en relación la dosis (solubilidad pH-dependiente) y alta permeabilidad intestinal, se lo se ha clasificado como un fármaco clase II, según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (26).

La estabilidad de RIF en soluciones acuosas a diferentes pHs ha sido ampliamente estudiada y los productos de degradación obtenidos se resumen en la **Figura 1.5**. Como otras rifamicinas, RIF sufre desacetilación ante un tratamiento con álcalis, transformándose a 25-desacetil-rifampicina, sin pérdida sustancial de la actividad antibacteriana (25).

En soluciones acuosas alcalinas y en presencia de oxígeno atmosférico, a temperatura ambiente, RIF se degrada a rifampin-quinona. Esta reacción puede ser prevenida usando ascorbato de sodio. Bajo las mismas condiciones, y a 60-70°C, RIF se degrada en varios

productos, siendo 25-desacetil-rifampicina, 25-desacetil-21-acetilrifampicina y 25-desacetil-23-acetilrifampicina los principales (25).

Las reacciones de degradación en medio ácido han sido las más estudiadas por ser de relevancia en condiciones fisiológicas. En este medio, RIF hidroliza a 3-formilrifampicina (3FRSV) (2,5,19). La presencia de ISO favorece esta descomposición, ya que reacciona con 3FRSV formando isonicotinil hidrazona (IH). Este tema va a ser abordado en mayor profundidad en el Capítulo 4.

La degradación de RIF, también se ha descrito en condiciones de el almacenamiento, cuando están presentes PIR y ETA. Estos fármacos pueden formar parte de la CDF en la cuádruple asociación y son higroscópicos. El aumento de humedad en la forma farmacéutica sólida genera un entorno de hidrólisis ácida, lo que favorece la reacción entre RIF e ISO (32). Por ello, resulta importante la separación física de RIF e ISO en la forma farmacéutica de la cuádruple asociación.

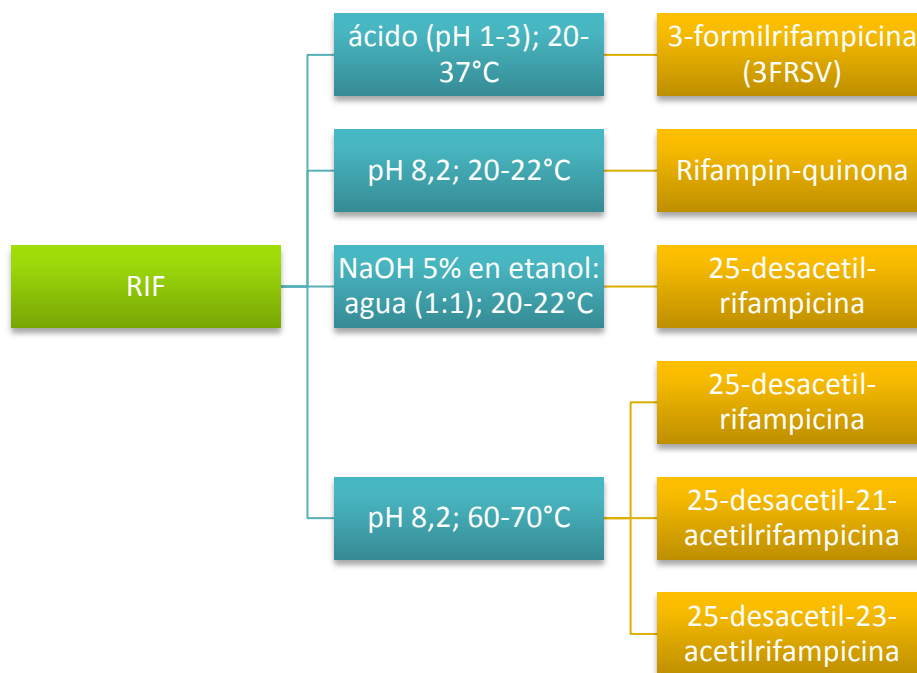


Figura 5. Vías de degradación química de RIF en soluciones acuosas y productos de degradación formados. Extraído de Gallo y Radaelli (25).

RIF se puede administrar por vía oral (en forma de suspensión, cápsulas rígidas o comprimidos) o parenteral (solución inyectable preparada a partir del polvo liofilizado). Luego de la administración oral de RIF, se ha reportado ampliamente la alta variabilidad interindividual en la C_{\max} alcanzadas en ensayos clínicos en adultos y niños, ya sea sola o en CDF con ISO. RIF se

distribuye ampliamente en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales, incluidos los pulmones, el hígado, los huesos, la saliva y los fluidos pleurales y periféricos. Penetra en las meninges inflamadas, y alcanza concentraciones importantes en el líquido cefalorraquídeo. RIF se une aproximadamente en un 80% a proteínas. Además, se metaboliza en el hígado a un metabolito activo, desacetil-RIF, vía desacetilación y experimenta circulación enterohepática con reabsorción significativa. Puede producirse competencia entre RIF y bilirrubina para las vías excretoras del hígado, lo que puede llevar a hiperbilirrubinemia en los días iniciales del tratamiento. La excreción del fármaco y su metabolito ocurre primariamente por vía biliar (30-40%). Hasta el 30% de la dosis se excreta en la orina, de la cual, la mitad de ésta proporción lo hace de forma inalterada. La semivida de eliminación en adultos es de 3 a 5 horas, pero disminuye con el uso prolongado debido a la inducción del metabolismo hepático del complejo CYP450 (24).

Tal como se mencionó previamente, el principal problema de la farmacoterapia de la tuberculosis es la baja y variable biodisponibilidad oral de RIF. Este inconveniente está relacionado, principalmente, con las diferencias en la humectabilidad y la velocidad de disolución del sólido debido a su solubilidad dependiente del pH, su hidrofobicidad y las diferentes propiedades de los polimorfos de RIF existentes. La influencia de los excipientes en el desempeño de la forma farmacéutica, la variabilidad interindividual en la absorción y el metabolismo de RIF, están asociados con problemas de biodisponibilidad de RIF (26,32). Adicionalmente, su degradación a pH gástrico, acelerada por la presencia de ISO en la formulación, también tiene un impacto significativo en la biodisponibilidad de RIF (32). Pacientes que presenten niveles plasmáticos sub-terapéuticos de RIF tienen mayor riesgo de desarrollo de resistencia microbiana, lo que conlleva a tratamientos más tóxicos y costosos así como también menos eficaces.

Por lo anteriormente expuesto, se considera que RIF es un “fármaco problema”, y mejorar su desempeño biofarmacéutico es un importante desafío.

1.3.2. ISONIAZIDA

Como se mencionó previamente, ISO es un antimicrobiano clave en el tratamiento de la tuberculosis. Presenta acción bactericida o bacteriostática, dependiendo de su concentración en el sitio de infección y la susceptibilidad bacteriana. Su acción es bactericida, si los bacilos se encuentran en rápida división en lesiones cavernosas extracelulares, mientras que es bacteriostático, si los microorganismos se encuentran en estado latente, tales como los que

están en lesiones caseosas y macrófagos. Su mecanismo de acción está relacionado con la inhibición enzimática, y principalmente interfiere en la síntesis de ácido micólico alterando la formación de la pared bacteriana. Sin embargo, no está bien definida la acción antimicrobiana exacta (33).

ISO no presenta polimorfismo ni forma hidratos. A partir de su síntesis, se forman cristales de hábito ortorrómbico (34,35).

ISO es estable en soluciones acuosas de pH menores a 8, sin embargo en soluciones alcalinas, y en condiciones aeróbicas, hidroliza a ácido isonicotínico, isonicotinamida y 1,2 diisonicotinoil hidracina. La reacción del grupo hidrazina con aldehídos y cetonas tales como azúcares y cetoácidos, que conllevan a la formación de hidrazonas es de particular interés. De hecho, hay reportes que demuestran que ISO en jarabe reacciona con la glucosa libre, por lo que los autores recomiendan el uso de sorbitol en reemplazo de sacarosa (34). También se ha demostrado que, cuando se formula en comprimidos, interacciona con lactosa y otros azúcares deoxidantes, lo que trae consecuencias en la biodisponibilidad del fármaco (35).

También ha sido informado el acomplejamiento de ISO con iones metálicos, lo que conlleva a la necesidad de utilizar agentes quelantes para evitar la degradación de ISO cuando las soluciones son autoclavadas (34).

Otra consideración relevante es la inestabilidad de ISO en plasma humano o de conejo, incluso a temperaturas de heladera (34). Esto implica la evaluación de la integridad de ISO en muestras biológicas, en las condiciones de manipulación.

ISO es fácilmente soluble en agua (125 mg/mL) y en las soluciones reguladoras de relevancia biofarmacéutica (35).

Tal como se muestra en la **Figura 1.6**, ISO es una molécula zwitteriónica (PM=137,14g/mol), con tres grupos ionizables. Los valores de pKa determinados a 20 °C fueron de 1,8 para el N del anillo piridina, 3,5 para el NH_3^+ del grupo hidrazida y de 10,8 para la desprotonación del NH del grupo hidrazida. El anión se estabiliza por resonancia (35). Fisiológicamente, el fármaco se comporta como base débil.

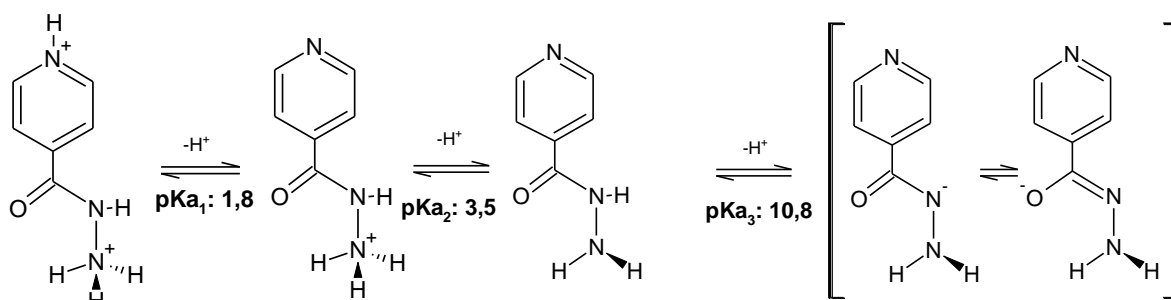


Figura 1.6: Equilibrios ácido-base de ISO.

El log P de ISO, determinado en octanol/solución reguladora de pH 7,4, es de 1,1. Mariappan et al. (29) demostraron, en un estudio en ratas, que ISO es poco permeable en el estómago y que su principal sitio de absorción se encuentra en el intestino. La menor permeabilidad en el estómago se puede explicar en base a la protonación de ISO en medio ácido debido a sus propiedades de base débil. Por otra parte, los datos de absorción oral son inconclusos, sugiriendo que este fármaco está en el límite entre las clases I y III (35).

ISO se administra con mayor frecuencia por vía oral (en comprimidos o solución oral de preparación magistral) pero también se puede administrar por vía intramuscular (33). Se distribuye en todos los tejidos y fluidos corporales, penetra en las meninges inflamadas y logra niveles terapéuticos en el líquido cefalorraquídeo. Atraviesa la placenta y se distribuye en la leche materna. No está significativamente ligada a las proteínas plasmáticas. Se metaboliza en el hígado, principalmente a través de la acetilación, formando sustancias inactivas. La semivida de eliminación es de 1 a 4 horas, dependiendo de la tasa de acetilación del paciente. A su vez, la relación de eventos farmacocinéticos/farmacodinámicos de ISO indican que su actividad es dependiente de la concentración (36), sin embargo, la efectividad del fármaco no parece alterarse si se administra una sola vez al día. Aproximadamente el 75% del fármaco y sus metabolitos se excretan en la orina. El resto se excreta en las heces, la saliva y el esputo (33).

Los alimentos disminuyen la velocidad y la cantidad de ISO absorbida, cuando se administra por vía oral, lo que está asociado a reacciones de degradación o acomplejamiento con sus componentes (33).

1.4. INNOVACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Existe una escasa investigación de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos tratamientos contra la tuberculosis. Por una parte, aportes en el diseño de nuevos antibióticos, el cual es un proceso muy costoso y lento, intentan superar la resistencia a los fármacos, acortar el curso del tratamiento y reducir las interacciones medicamentosas con las terapias

antirretrovirales (37). Por otra parte, los fármacos antituberculosos de primera línea siguen siendo eficaces. La superación de los principales inconvenientes tecnológicos de estos agentes terapéuticos, tales como la baja solubilidad, la inestabilidad acuosa y la variable y baja biodisponibilidad, es el principal objetivo de la tecnología farmacéutica.

Con el propósito de optimizar los tratamientos, se están realizando avances en el diseño de nuevos sistemas de liberación modificada a fin de reducir la frecuencia de administración o de vectorizar los fármacos hacia el sitio de infección para disminuir efectos adversos.

La literatura científica describe algunos sistemas potencialmente útiles para la liberación modificada de fármacos antituberculosos (38), en particular, sistemas de liberación modificada para administración oral (12,39,40), y micro-nano partículas para administración pulmonar (18–20). Además, hay sólo una patente de una composición farmacéutica de fármacos antituberculosos y su procedimiento para su preparación (44). Sin embargo, ninguno de estos desarrollos se encuentra comercialmente disponible.

1.5. SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA DE FÁRMACOS

Dentro de las nuevas estrategias de formulación, podemos mencionar los sistemas de liberación modificada.

La Farmacopea Argentina 7 Ed. define a las formas farmacéuticas de **liberación prolongada** como aquellas en las que la liberación del fármaco se produce durante un período de tiempo prolongado después de su administración.

La Farmacopea de Estados Unidos (USP 39) utiliza el término **liberación modificada** (*modified release*) para referirse a formas farmacéuticas en las que sus características de disolución son moduladas en el tiempo o en el espacio, a los fines de cumplir con objetivos terapéuticos o de conveniencia, que no son alcanzados con las formulaciones farmacéuticas convencionales.

La ubicación espacial se relaciona con la orientación del fármaco hacia un órgano o tejido específico, mientras que el suministro temporal hace referencia al control de la velocidad con la que éste llega al tejido blanco.

En el desarrollo de esta Tesis, haremos referencia al término “liberación modificada” descripto en USP 39, por considerarlo más amplio e inclusivo de todas las aplicaciones descriptas.

Las formas farmacéuticas de liberación modificada incluyen a los sistemas de liberación retardada (*delayed release*), liberación extendida (*extended release*) y liberación sitio-específica.

Las formas farmacéuticas de **liberación retardada** presentan una cubierta entérica que evita la liberación del fármaco, hasta que el sistema (comprimido, gránulo o cápsula) haya pasado a través del estómago. Esto, evita la degradación del fármaco por los jugos gástricos o la irritación de la mucosa gástrica. Además, facilita el tránsito gastrointestinal a fármacos que son mejor absorbidos a nivel intestinal (45).

Las formas farmacéuticas de **liberación extendida o prolongada** se formulan de tal manera que hacen que el fármaco contenido esté disponible durante un periodo de tiempo prolongado después de la ingestión. También se han utilizado expresiones tales como "acción prolongada", "acción repetida" y "liberación sostenida" para describir tales formas de dosificación. Estos sistemas permiten reducir la frecuencia de administración, disminuyendo la velocidad de liberación del fármaco desde la forma farmacéutica a través del tracto gastrointestinal.

Las formas farmacéuticas de **liberación sitio-específica** son aquellas donde el fármaco está dirigido a una determinada localización biológica (46).

La investigación en Tecnología Farmacéutica también contempla la posibilidad de dirigir al principio activo hacia un tejido u órgano diana, evitando la indiscriminada distribución tisular que sufren los fármacos en una terapia sistémica convencional. Esta distribución no selectiva es responsable de provocar efectos adversos. Una de las estrategias propuestas para conseguir vectorizar el fármaco y dirigirlo hacia el tejido o incluso célula diana es el empleo de transportadores de fármacos, es decir, el uso de determinadas sustancias (excipientes) que lleven el principio activo al lugar de acción de forma selectiva y mayoritaria (47). Entre los numerosos sistemas transportadores investigados actualmente, los que suscitan mayor interés son los liposomas, nanoesferas, nanocápsulas y dendrímeros (48,49).

Las formas farmacéuticas de **liberación segregada**, no están codificadas ni en Farmacopea Argentina ni en la USP. Éstas hacen referencia a aquellas formulaciones de dos o más fármacos que se liberan en distintas regiones del tracto gastrointestinal, de manera que se evite el contacto entre ellos. Este tipo de sistema, es útil para vehicular combinaciones de fármacos incompatibles.

En general, existen ciertas ventajas relacionadas con el desarrollo de sistemas de liberación modificada (50), tales como:

- Reducción de la frecuencia de dosificación;
- Uniformidad del efecto terapéutico;
- Mejora del cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes;
- Reducción de las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas;
- Liberación sitio-específica en el tracto gastrointestinal;

Entre las desventajas podemos citar:

- Riesgo de falla del sistema de liberación modificada, conduciendo a una liberación masiva de la dosis;
- Riesgo de acumulación del fármaco en el sistema circulatorio;
- Falta de reproducibilidad del efecto terapéutico;
- Problemas asociados a la manipulación incorrecta;
- Mayor costo de diseño y producción;

1.5.1. DISEÑO DE SISTEMAS PORTADORES DE FÁRMACOS

La racionalización del diseño de medicamentos se sustenta en las metas predeterminadas para lograr óptima eficacia, con máxima seguridad y confiabilidad. Esto permite dotar al medicamento de los atributos que garantizan su utilidad: identidad, pureza, potencia, estabilidad, eficacia, seguridad y confiabilidad.

Los siguientes, se pueden señalar como objetivos más importantes que persigue el diseño de una formulación de liberación modificada (47):

- Administración por la vía más adecuada y en la dosis exacta.
- Asegurar la estabilidad del producto durante un tiempo perfectamente estudiado y establecido (tiempo de caducidad o periodo de validez).
- Posibilitar una administración cómoda (baja frecuencia de administración) y lo menos desagradable posible, mejorando las características organolépticas del fármaco, con el fin de favorecer el mantenimiento de la pauta terapéutica.
- Posibilitar la administración segura de principios activos utilizados en dosis muy reducidas, asegurando homogeneidad de la dosis en las distintas unidades.

- Proteger el fármaco de los agentes externos, tanto medio ambientales (oxígeno, humedad, entre otros) como fisiológicos (por ejemplo, jugo gástrico).
- Suministrar el fármaco a una velocidad necesaria para alcanzar y mantener niveles sanguíneos constantes. Esto implica que la velocidad de liberación del fármaco debe ser constante e independiente de la cantidad que permanece en la forma farmacéutica.
- Dirigir selectivamente el principio activo a determinados órganos o tejidos.
- Optimizar acciones farmacológicas y reducir efectos adversos.

1.5.2. TIPOS DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

Se disponen de formulaciones de liberación modificada para diferentes vías de administración, pero las destinadas a la vía oral son las más estudiadas (51,52).

Existen diferentes criterios para clasificarlas, según la vía de administración, el mecanismo de liberación o de acuerdo al sistema tecnológico empleado (53). Según este último criterio, los principales sistemas pueden dividirse en monolíticos o matriciales, sistemas de reservorio o controlados por membranas, de bomba osmótica y de intercambio iónico.

A continuación se describen las principales características (54).

1.5.2.1. SISTEMAS MONOLÍTICOS O MATRICIALES:

Estos sistemas se caracterizan por tener el principio activo uniformemente distribuido en el seno de un polímero ya sea como suspensión o como disolución. La liberación se produce mediante mecanismos de disolución, difusión o erosión, siendo frecuente que coincidan dos o tres a la vez. Pueden dividirse en tres grupos, según la naturaleza del polímero que forme la matriz:

- a) Matrices hidrofílicas;
- b) Matrices lipídicas
- c) Matrices de polímeros insolubles.

Las **matrices hidrofílicas** se obtienen mezclando el principio activo con polímeros hidrofílicos (derivados de celulosa, alcohol polivinílico, gelatina, goma xantan, carbomer, entre otros) de forma que, en presencia de medios acuosos, son capaces de hincharse formando una capa hidratada (hidrogel) viscosa. Esta capa controla la difusión de agua hacia el interior y la difusión del fármaco (que primero debe mojarse y disolverse) hacia el exterior de la matriz.

Paralelamente, la zona más externa de la capa hidrogel puede erosionarse. La velocidad de este proceso depende de la naturaleza del polímero.

Por lo tanto, la velocidad de liberación del fármaco desde estos sistemas es controlada por procesos de difusión y erosión y puede modularse, por ejemplo, mediante la selección adecuada de mezclas de polímeros.

A partir de estos sistemas, se pueden formular comprimidos o cápsulas de gelatina rígida. Cuando una de estas formas farmacéuticas entra en contacto con un medio acuoso como puede ser el medio gástrico o intestinal, se produce la hidratación prácticamente instantánea de las moléculas más superficiales que forman la interfaz sólido-líquido, dando lugar a continuación a la formación de una capa muy viscosa. Conforme va penetrando el agua en el sistema, la capa de gel va experimentando un progresivo aumento de volumen. Poco a poco, la capa exterior sufre paulatinamente un proceso de erosión. El proceso concluye con una total gelificación del sistema y con la liberación completa del principio activo por difusión, por erosión o por una mezcla de ambos fenómenos.

Las **matrices lipídicas** contienen el principio activo disperso en una matriz insoluble, preparándose por compresión directa, compactación entre rodillos o granulación mediante fusión en caliente, a partir de una mezcla pulverulenta. La liberación depende de la disolución de un agente de canalización, tal como cloruro de sodio, que va formando una matriz porosa de capilares tortuosos embebidos de fluido gastrointestinal en el que va liberándose el fármaco.

Las **matrices de polímeros insolubles** contienen el principio activo embebido dentro de un polímero inerte e insoluble en el medio gastrointestinal. Este sistema, ha sido comparado por muchos autores con una esponja. El fármaco puede estar en forma dispersa como una suspensión o puede estar disuelto en el polímero. Al igual que para las matrices lipofílicas, la liberación del fármaco está regulada por la porosidad y tortuosidad de la matriz, y para su liberación, se requiere de procesos de disolución/difusión.

1.5.2.2. SISTEMAS DE RESERVORIO O DE LIBERACIÓN CONTROLADA POR UNA MEMBRANA

La parte del sistema que modifica la velocidad de liberación, es una membrana a través de la cual el fármaco puede difundir (50). Esta membrana debe volverse permeable para permitir la salida del fármaco, por ejemplo, mediante hidratación con fluidos del tracto gastrointestinal.

Cabe aclarar que dichas membranas poliméricas no son diseñadas para hincharse ni erosionarse. En las formulaciones de liberación modificada para la vía oral el proceso de liberación sigue las siguientes etapas:

1. El jugo gástrico o intestinal permea a través de la cubierta hacia el interior.
2. El principio activo se disuelve y, si hay una cantidad suficiente, se alcanza la concentración de saturación.
3. El principio activo disuelto difunde a través de la cubierta hacia el exterior.
4. Si permanece la concentración de saturación del principio activo, su velocidad de liberación es constante (cinética de orden cero), y posteriormente la velocidad de liberación decrece exponencialmente (cinética de primer orden). Básicamente, el agua entra y el fármaco sale.

El espesor y el tipo de material que constituye la membrana afecta la velocidad a la cual los fluidos biológicos son capaces de penetrar el sistema.

Los materiales que suelen utilizarse para la elaboración de la cubierta son principalmente, polímeros como etilcelulosa, metilcelulosa, polivinilacetato, polimetacrilatos, carboximetilcelulosa sódica, polietileno y diversas ceras (55).

1.5.2.3. SISTEMAS CON CUBIERTAS ENTÉRICAS

Una clase especial de sistema de liberación controlada por una membrana es el caso de las cubiertas entéricas. Un comprimido cubierto entéricamente permanece intacto en el estómago y libera sus ingredientes recién cuando alcanza el medio intestinal. La cubierta entérica puede ser de tres tipos: dependiente del pH, del tiempo o de las enzimas. En el primer caso, la cubierta, insoluble a pH ácido, se disuelve a pHs cercanos a la neutralidad, en el medio intestinal. Las cubiertas dependientes del tiempo se erosionan por la humedad durante el tránsito gastrointestinal, mientras que las que dependen de las enzimas, se degradan por la acción hidrolítica de las enzimas intestinales. Entre los materiales utilizados para el recubrimiento entérico de comprimidos y cápsulas, se encuentran grasas, ácidos grasos, ceras, goma laca y polímeros gastroresistentes, tales como el acetato-ftalato de celulosa (54).

1.5.2.4. SISTEMAS CON BOMBAS OSMÓTICAS

Son sistemas compuestos por un núcleo de fármaco rodeado por una membrana polimérica selectiva al agua. La membrana permite el paso del agua pero no el del fármaco. La membrana polimérica presenta una pequeña apertura (0,4 mm de diámetro). Cuando el sistema entra en

contacto con los fluidos del tracto gastrointestinal, la membrana semipermeable permite la entrada de agua, disolviendo o suspendiendo el fármaco que está en el interior. A medida que ingresa mayor cantidad de agua, la presión en la capa osmótica aumenta y ésta bombea la solución (o suspensión) del principio activo hacia el exterior del sistema a través del orificio (45).

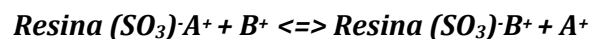
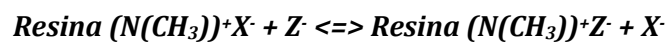
La velocidad de liberación del fármaco puede alterarse por cambio del área superficial, ancho o composición de la membrana o por el cambio del diámetro del orificio.

Generalmente, como materiales de membrana se utilizan alcohol polivinílico, poliuretano, acetato de celulosa, etilcelulosa, cloruro de polivinilo (54).

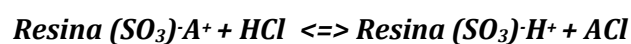
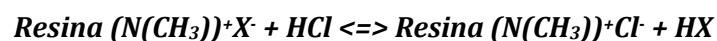
1.5.2.5. SISTEMAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

El intercambio iónico es una forma atractiva de controlar la liberación de un principio activo, por cuanto que este proceso se encuentra condicionado por la concentración iónica del medio. A nivel del tracto gastrointestinal, dicha concentración se puede considerar más constante que la de otros fluidos biológicos, a pesar de la influencia que tienen la cantidad de líquido ingerido, la naturaleza de los alimentos, el contenido gastrointestinal, entre otros (54).

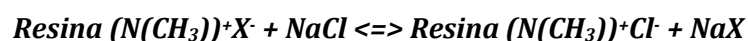
Las resinas intercambiadoras de iones son polímeros insolubles que contienen grupos aniónicos o catiónicos situados en determinadas posiciones repetitivas de las cadenas que conforman la resina. La resina aniónica o catiónica, seleccionada según la naturaleza del principio activo, se carga al ponerla en contacto con una solución que contiene el principio activo. En esta resina cargada se producen los siguientes procesos cuando se expone frente a una solución iónica:

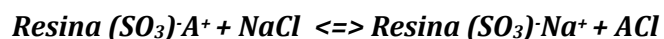


Una forma más completa de expresar los procesos de intercambio iónico en el estómago se representa en el siguiente esquema:



Y en el intestino:





Estos sistemas pueden ser comprimidos, recubiertos, encapsulados, combinados con otros polímeros o suspendidos en vehículos acuosos. El proceso de liberación del fármaco está influenciado por el grado de reticulación y el tamaño de partícula de la resina, así como también la fuerza iónica del medio (54).

1.5.3. SISTEMAS MULTIUNITARIOS

Bajo la denominación de sistemas multiunitarios se han descrito aquellos sistemas que permiten vehicular en una unidad de dosificación fármacos incompatibles o el mismo fármaco pero con diferentes propiedades de liberación. A continuación se mencionan los más importantes: comprimidos multicapa; comprimidos con cubierta compactada o recubiertos por compresión; y cápsulas.

1.5.3.1. COMPRIMIDOS MULTICAPA

Un comprimido multicapa está constituido por diferentes mezclas de sólidos, dispuestos uno sobre otro en varias capas paralelas. Se utilizan para incorporar en un mismo comprimido sustancias incompatibles física o químicamente, como por ejemplo el clorhidrato de fenilefrina y el ácido ascórbico mezclados con paracetamol, o bien para producir formas de acción prolongada. Para producir este tipo de comprimidos se requieren comprimidoras especiales, que realizan una precompresión de las capas individuales y finalmente comprimen el conjunto de capas para dar lugar a un comprimido estratificado (54).

1.5.3.2. COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA O RECUBIERTOS POR COMPRESIÓN

La tecnología del recubrimiento por compresión consiste en la compactación, mediante comprimidoras especiales, de material granular alrededor de un núcleo comprimido. El producto final es un comprimido dentro de otro. Este procedimiento no es muy utilizado pero tiene indudables ventajas en el recubrimiento de comprimidos conteniendo principios activos sensibles al agua, a los solventes orgánicos o al calor. Además, permite separar físicamente principios activos incompatibles o bien formular un mismo principio activo con distintas propiedades de liberación (liberación en distintos tramos del tracto gastrointestinal o a diferentes velocidades) (54,56).

Las máquinas de recubrimiento por compresión constan de dos tolvas, para transferir a la matriz los núcleos y el material de recubrimiento. Deben incluir un dispositivo especial que

permita centrar el núcleo para asegurar un recubrimiento uniforme. La tecnología de recubrimiento por compresión en un solo paso, más conocida por su nombre en inglés (*one-step dry-coated Tablet, OSDRC*) se basa en una máquina que realiza la compresión del núcleo y su posterior recubrimiento mediante una segunda compresión, en una misma matriz, asegurando el correcto centrado del núcleo (56). Utilizando equipos apropiados es posible cargar núcleos preelaborados (comprimidos) sobre un lecho de polvo que luego se rellena con el resto del material de la capa externa y se comprime (**Figura 1.7**). Es un procedimiento cuya puesta a punto es delicada, ya que se requiere una adecuada adherencia entre el núcleo y el material de la cubierta y que el espesor del recubrimiento sea adecuado en todas las direcciones.

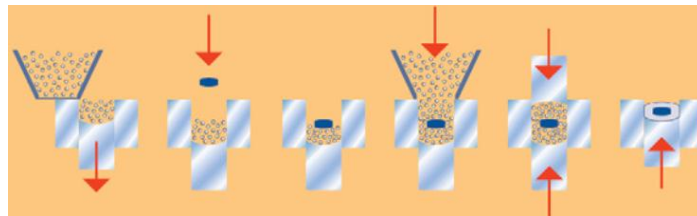


Figura 1.7. Proceso de manufactura de comprimidos con cubierta compactada, partiendo de núcleos preelaborados (56).

1.5.3.3. CÁPSULAS RÍGIDAS

Las cápsulas de gelatina rígidas se rellenan generalmente con sólidos pulverulentos que contienen uno o varios principios activos. Sin embargo, también puede utilizarse otras preparaciones como material de relleno. Algunos de ellos son granulados, pellets, comprimidos, microcápsulas, cápsulas, pastas y sus combinaciones, usando dispositivos especiales de llenado. La única exigencia es que la preparación no sea capaz de reaccionar con la gelatina o interferir con la integridad de la cubierta. El ejemplo más común de incompatibilidad, es el entrecruzamiento de la gelatina. Este se produce por reacciones de condensación de los grupos amino presentes, especialmente los residuos de lisina, ante la exposición a aldehídos, colorantes y altos niveles de humedad. El entrecruzamiento disminuye la solubilidad de la cápsula y puede retardar o evitar su apertura, lo que conlleva a una reducción de la liberación y posterior absorción del principio activo (54,57,58).

La **Figura 1.8** recoge los diferentes tipos de material que puede incorporarse en estas cápsulas: granulados, pellets, comprimidos, microcápsulas, cápsulas, pastas y sus combinaciones.

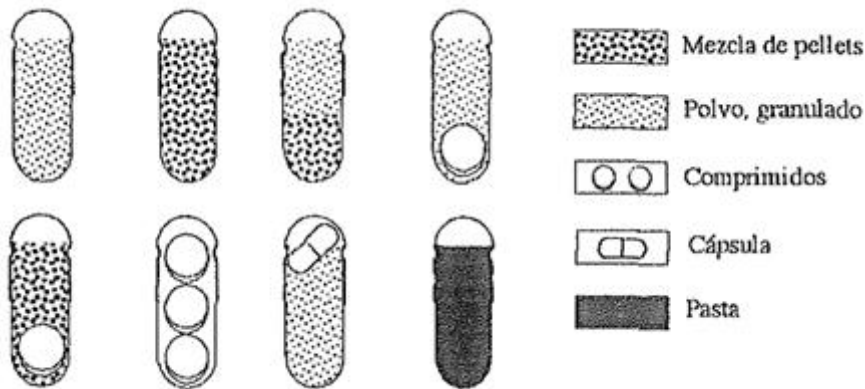


Figura 1.8. Tipo de materiales que pueden incorporarse en una cápsula de gelatina rígida.

1.5.4. CONSIDERACIONES GENERALES PARA EL DISEÑO DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

El diseño de formulaciones de liberación modificada es, generalmente, una tarea difícil por la relación entre las propiedades del fármaco, el estado del paciente y su enfermedad y las limitaciones tecnológicas en la fabricación de una forma farmacéutica. Algunos factores que pueden influir en la estrategia de diseño de sistemas de liberación modificada son:

- Tipo de enfermedad a tratar;
- Forma farmacéutica; por ejemplo, si se va a formular un sistema simple (cápsula, comprimido), múltiple (gránulos, micropartículas, etc.) o dispersiones líquidas;
- Fisiología del tracto gastrointestinal (para la vía de administración oral) donde, por ejemplo, el tiempo de residencia de una formulación es influenciada por el vaciado gástrico y el tránsito gastrointestinal.

Entre las propiedades fisicoquímicas de los fármacos que influyen significativamente en el diseño de un sistema de liberación modificada, pueden citarse las siguientes:

- **Dosis:** los fármacos para la vía oral que requieran dosis mayores a 500 mg, no son buenos candidatos ya que generarían sistemas de tamaño inaceptable;
- **Peso molecular:** se prefieren fármacos con PM inferiores a 1000, ya que este parámetro podría limitar su paso a través de las membranas biológicas;
- **Solubilidad acuosa:** los fármacos que presenten valores de solubilidad acuosa extremadamente bajos, no son buenos candidatos para el diseño de un sistema de liberación modificada ya que, en general, su velocidad de disolución sería el factor

limitante de la cinética del proceso. La solubilidad en los fluidos gastrointestinales también condiciona la velocidad de difusión a través de las membranas, dado que representa la fuerza directriz para su pasaje;

- **Coeficiente de reparto:** un valor de coeficiente de reparto favorable hacia la fase lipídica facilita el flujo a través de membranas. Los fármacos con valores de coeficiente de reparto octanol/agua extremadamente pequeños, tienen un flujo de entrada al organismo demasiado bajo. Los valores de coeficiente de reparto excesivamente altos pueden producir acumulación de los fármacos en los tejidos.

En términos generales, entre las características farmacocinéticas que un fármaco debe presentar para poder ser formulado exitosamente en un sistema de liberación modificada, se han mencionado las siguientes:

- *Semivida de eliminación, ($t_{1/2}$):* los fármacos con $t_{1/2}$ entre 2-6 h son candidatos ideales. Si el $t_{1/2}$ es menor a 2 h se requerirán dosis muy elevadas para alcanzar niveles plasmáticos eficaces y la administración del medicamento a intervalos posológicos aceptables (12-24 h). En este caso, la utilización de un sistema de liberación modificada puede que no reúna las exigencias de seguridad requeridas;
- *Clearance total:* no debe ser dosis dependiente;
- *Volumen de distribución:* para fármacos con baja actividad farmacológica intrínseca, el volumen de distribución no debe ser demasiado elevado, ya que cuanto mayor es este parámetro, deben incorporarse mayores dosis del fármaco a la formulación para alcanzar las concentraciones terapéuticas;
- *Metabolismo y efecto de primer paso hepático:* los fármacos que son metabolizados antes de su absorción (ya sea en el lumen o en la pared intestinal) o sufren un efecto de primer paso importante, pueden exhibir una disminución en la biodisponibilidad cuando son liberados lentamente desde la formulación. Esto es debido a que, en las condiciones mencionadas, la mayoría de las enzimas metabolizadoras utilizan procesos saturables y pueden no verse saturados;
- *Índice Terapéutico:* los fármacos con índice terapéutico estrecho requieren un preciso control de sus niveles en sangre. La incorporación de más de una dosis a una formulación, implica un mayor riesgo si se produce la liberación masiva no deseada del fármaco.

Tal como se describió en la sección 1.3.2, ISO presenta características farmacocinéticas que lo hacen un fármaco candidato para formularlo en sistemas de liberación modificada.

1.5.5. ESTRATEGIAS PARA EVALUAR EL DESEMPEÑO DE LOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

Las estrategias utilizadas para evaluar el desempeño de un sistema de liberación modificada dependerán de cuáles sean las propiedades desfavorables del fármaco en cuestión, como así también de la etapa del proceso de desarrollo del sistema, que abarca desde la optimización de los materiales de partida, hasta estudios que permiten evaluar su eficacia, seguridad y confiabilidad.

La evaluación del desempeño de un sistema de liberación modificada puede llevarse a cabo mediante ensayos que incluyan modelos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En todos los casos, las propiedades a evaluar deben ser comparadas y constatadas con una referencia, ya sea el propio fármaco o una formulación que lo contenga.

Los ensayos de disolución *in vitro* proveen información valiosa en muchas etapas del proceso de preformulación y formulación. En etapas de formulación, este ensayo se utiliza para valorar las propiedades de disolución de un fármaco y seleccionar los excipientes adecuados. Los ensayos de disolución también se usan para seleccionar formulaciones candidatas, con el perfil de liberación más adecuado y reproducible. En etapas clínicas, los ensayos de disolución permiten establecer correlaciones *in vitro/in vivo* entre la liberación del fármaco desde la forma farmacéutica y su absorción. Desde el punto de vista regulatorio, la evaluación de datos clínicos o preclínicos están enormemente facilitados por la disponibilidad de una metodología de disolución del producto validada y predictiva. Aspectos importantes del aseguramiento de la calidad del producto, incluyen la capacidad de confirmar el correcto procedimiento de manufactura de un lote, que la reproducibilidad lote a lote cumple con los requerimientos regulatorios, y que las especificaciones del producto se mantienen durante toda su vida útil (59).

Los ensayos *in vivo* implican la evaluación de la exposición sistémica de un sistema farmacoterapéutico dado, en animales de experimentación. A partir de perfiles plasmáticos en función del tiempo, se determinan parámetros farmacocinéticos tales como el área bajo la curva (ABC), indicativa de la biodisponibilidad del fármaco, la concentración máxima alcanzada (C_{max}) y el tiempo en el que se alcanza dicha C_{max} (t_{max}). Estos resultados se evalúan comparativamente contra una referencia (60).

La biodisponibilidad está condicionada por diversos factores tales como la solubilidad y velocidad de disolución del fármaco en el sitio de absorción, su capacidad para atravesar la

membrana intestinal, su metabolización en dicha membrana y en el hígado (metabolización por primer paso hepático), su afinidad por transportadores de eflujo, etc.

Los modelos animales comunmente utilizados para la administración de formas farmacéuticas sólidas son el conejo, el perro y el cerdo. Estos se seleccionan en función de su capacidad de deglutir comprimidos enteros, de contar con una volemia suficiente para el muestreo y estar fácilmente disponibles para ensayos farmacocinéticos.

1.6. POLIELECTROLITOS (PE) UTILIZADOS EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Los PE son polímeros hidrofílicos que contienen grupos ionizables, los cuales al ser dispersados en un solvente polar pueden disociarse generando cadenas de polímero cargadas (macroiones) y pequeños contraiones.

En contacto con el agua, las partículas sólidas de PE provocan el influjo por ósmosis, con el consecuente hinchamiento. Si la interacción entre el PE y el agua es favorable, éste puede terminar disolviéndose o dispersándose homogéneamente, provocando un aumento de la viscosidad del sistema. El entrecruzamiento de las cadenas poliméricas limita el grado de hidratación e hinchamiento, la velocidad de disolución y la viscosidad resultante.

Sobre la base de la carga que generan en dispersión, los PE pueden clasificarse en aniónicos (que generan cargas negativas provistas por grupos carboxilatos) y catiónicos (que generan cargas positivas generalmente provistas por grupos aminos protonados).

En la **Tabla 1.6** se describen algunos PE de utilidad en terapéutica, su origen, aplicaciones y usos. Los PE, bajo la forma de resinas de intercambio iónico (PE insolubles) o de polímeros hidrofílicos dispersables (PE solubles), han sido ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas (61).

Tabla 1.6. Principales PE de uso farmacéutico. Aplicaciones y usos frecuentes (61)

Polielectrolito	Origen/ Características	Aplicaciones y usos
Ácido hialurónico	Natural, homopolímero lineal. Mezcla de ácido manurónico y glucurónico. Inestable a temperaturas elevadas. Alta viscosidad. Aniónico	Formulaciones oftálmicas como agente viscosante, humectante. Se encuentra aprobado para implantes de lentes intraoculares.
Carbomer	Sintético, homopolímero constituido por cadenas de ácido acrílico. El grado de entrecruzamiento origina las diferentes clases de Carbomer. Peso molecular = 3×10^6 D. Buena estabilidad térmica y muy alta viscosidad. Aniónico	En formas farmacéuticas líquidas y semisólidas como viscosante y suspensor, para administración oftálmica, rectal y tópica en general. Emulsificante en preparaciones aceite en agua (0,1-1,0 %). En comprimidos, como ligante tanto en compresión directa como en granulación húmeda (5-10 %).
Chitosan	Natural, homopolímero de quitina parcialmente desacetilada. Estable térmicamente, de moderada a baja viscosidad. Catiónico.	En sistemas de liberación sostenida, bioadhesivos, promueve la absorción de fármaco a través de las mucosas.
Eudragit E100	Sintético, copolímero basado en dimetilaminoetilmetacrilato. Peso molecular $\geq 100\ 000$ D. Catiónico.	Agente formador de coberturas solubles a pH gástrico. Ligante y relleno en comprimidos. Formador de matriz en sistemas de liberación modificada para vía oral, transdermal y rectal.
Eudragit L100	Sintético, copolímero producto de la polimerización de ácido metacrílico y metilmetacrilato. Aniónico	Formador de cobertura entérica, resistente a fluidos gástricos, para administración oral.
Policarbófilo	Sintético, homopolímero del ácido acrílico entrecruzado con divinilglicol. Aniónico.	Bioadhesivo. En sistemas de liberación sobre mucosas, para administración bucal, nasal, vaginal e intestinal. Las sales de calcio son usadas en comprimidos laxantes.

Las propiedades únicas provenientes de la interacción de los PE con contraiones orgánicos o inorgánicos se han explotado para una variedad de propósitos tales como: modulación de la liberación de fármaco, enmascaramiento del sabor, incremento de la compatibilidad o estabilidad acuosa, entre otros.

Cuando se neutralizan los grupos ácidos o básicos de un PE con moléculas de carga contraria, como fármaco de características ácido/base opuestas, se generan los siguientes equilibrios en un medio acuoso:

Para PE ácidos (RCOOH):



Para PE básicos R-N(CH₃)₂:



Las **ecuaciones 1.1 y 1.2** ejemplifican el fenómeno de condensación iónica, que genera una dada proporción de pares iónicos, como producto de la asociación iónica entre un PE y un fármaco de carga opuesta. Estos pares iónicos, indicados en las mencionadas ecuaciones como las especies entre corchetes, son denominados sistemas o complejos PE-fármaco (62).

La interacción proveniente de la atracción electrostática de un contraión (el fármaco) hacia el PE y la pérdida de la entropía translacional por el contraión debido a su localización en la vecindad de la cadena del polímero, generan la reacción de condensación.

Las dispersiones PE-fármaco se caracterizan por una alta proporción de condensación iónica y constituyen sistemas de liberación modificada con características propias provenientes de los complejos iónicos formados (63).

De acuerdo a la teoría de condensación de Osawa-Manning (64), los contraiones podrían dividirse en dos grupos, los “libres” y los “condensados”. Los libres se encontrarían disponibles para recorrer todo el volumen de la solución, mientras que los condensados se localizan alrededor de las cadenas del polímero, acomplejados con los grupos que presentan cargas eléctricas opuestas.

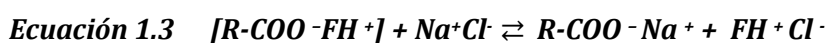
La fracción del contraión libre es determinada por la energía requerida para alejarse del campo electrostático del PE, el cual es disminuido por la compensación parcial de las cargas del PE por el contraión, mientras que la fracción condensada se mueve junto con la macromolécula.

La fuerza con la que un contraión se encuentra condensado depende de la afinidad que presente por el PE. Dicha afinidad estará condicionada por el tipo de unión que se establezca entre los componentes. Los fármacos que poseen grupos ionizables establecen uniones

electrostáticas con los PE de carga opuesta. También pueden establecer interacciones de tipo hidrofóbicas con otras porciones de la molécula, favoreciendo la afinidad entre los mismos.

El conocimiento sobre los factores que determinan el tipo de interacción entre fármacos iónicos o ionizables y PE resulta relevante en el diseño de formulaciones farmacéuticas.

En nuestro grupo de I+D se han desarrollado sistemas de liberación modificada constituidos por complejos PE-fármaco. Estos productos pueden ser catalogados como sistemas de liberación “inteligentes” dado que liberan el fármaco en respuesta a cambios en el entorno (65). En este sentido, el agregado de iones al sistema genera intercambios iónicos y reagrupamientos de cargas, provocando la disociación parcial de los pares iónicos (**Ecuación 1.3**).



1.6.1. POLIELECTROLITOS SELECCIONADOS

En este trabajo de Tesis se seleccionaron ácido algínico (AA) y la forma ácida de carboximetilcelulosa (CMC) para desarrollar sistemas portadores de ISO y RIF respectivamente.

La elección, basada fundamentalmente en sus características fisicoquímicas, tuvo en cuenta también otros criterios tales como ausencia de toxicidad, impacto en su utilización, costo y disponibilidad en el mercado.

El AA es un PE natural dispersable en agua, mientras que la CMC es semi-sintética y es estudiada como modelo de PE insoluble en agua. Ambos son polisacáridos y poseen grupos funcionales carboxílicos en su estructura.

Las sales de estos PE son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética desde hace muchos años. Por esta razón son considerados sustancias seguras, e incluso pertenecen a la lista *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (68).

A continuación se describen brevemente la estructura, el método de obtención, las características fisicoquímicas relevantes y la aplicación de los PE seleccionados.

1.6.1.1. ÁCIDO ALGÍNICO Y SUS SALES

Los alginatos son polímeros naturales aislados principalmente de algas marinas pardas. También son producidos extracelularmente por algunas bacterias como *Pseudomona*

aeruginosa y *Azetobacter vinelandi* (69). En este trabajo de tesis se utilizó el AA proveniente de *Macrocystis pyrifera*.

En estas algas, el AA es el polisacárido más abundante, comprende entre el 2-7% del peso del vegetal mojado y más del 40% del peso seco. Está localizado en la matriz intercelular como gel, formando sales de sodio, calcio, magnesio y otros cationes multivalentes. Su principal función es estructural, dando resistencia mecánica y flexibilidad al tejido.

Los alginatos se extraen con soluciones alcalinas. La masa viscosa resultante es tratada con ácidos minerales para obtener ácido algínico libre. Luego puede ser convertido en diferentes sales, de las cuales el alginato de sodio es la más usada. También están disponibles comercialmente sales de calcio, magnesio y potasio.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALGINATOS

Los alginatos son polisacáridos lineales, costituidos por unidades de los ácidos α -(1-4)-L-gulurónico (G) y β -(1-4)-D-manurónico (M) (**Figura 1.9**). Las unidades G y M se ubican en el polímero formando bloques. Los bloques homogéneos son separados por otros de unidades alternantes y la proporción de los mismos es diferente según el origen.

Esto se debe a que, durante la biosíntesis del alginato, las cadenas de polimanuronato son sustrato de la C-5-epimerasa, que transforma las unidades de M en G, cuya actividad depende de la especie, edad, condiciones de crecimiento sección vegetal y estación del año. Por ejemplo, las algas que crecen en aguas bravas proveen alginato rico en unidades de G, que les provee resistencia y flexibilidad, comparado con las mismas especies de aguas calmas (70).

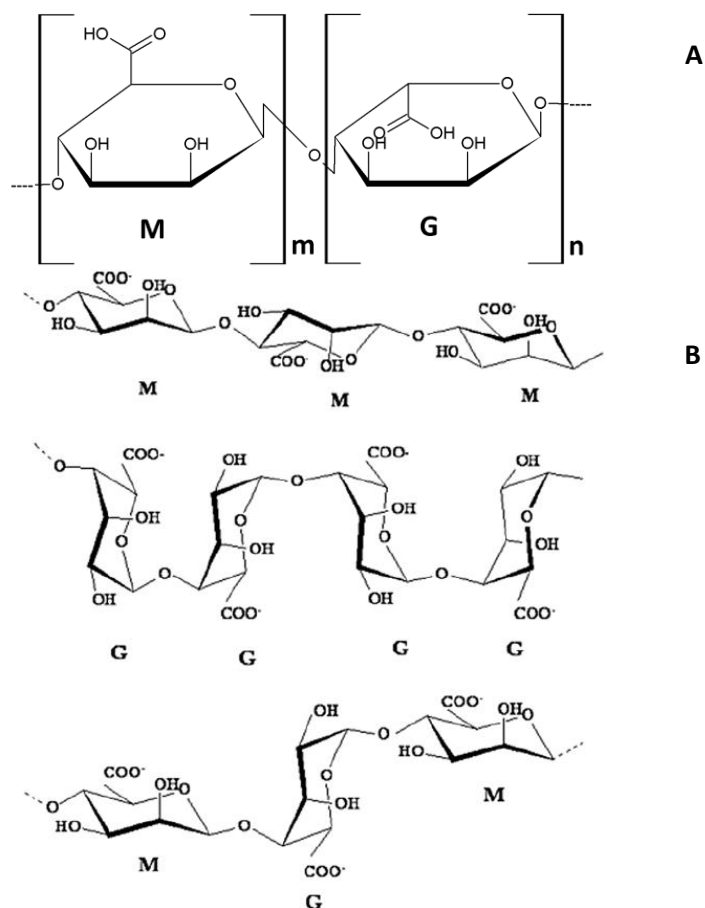


Figura 1.9. Composición química de AA. (A) monómeros; (B) tipo de bloques.

Es conocido que este polímero forma un gel por uniones puente hidrogénos a pHs bajos (gel ácido) y por interacciones iónicas con cationes polivalentes tales como calcio. En la **Tabla 1.7** se encuentran datos fisicoquímicos y de toxicidad de AA y su sal sódica, que son relevantes en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Tabla 1.7. Propiedades fisicoquímicas de AA y su sal sódica (71)

Propiedades	AA	AANa
PM	20.000 a 200.000	-
pKa	3,4 (M) y 3,7 (G)	-
Acidez/alcalinidad	pH 1,5-3,5 (dispersión acuosa al 3% p/v)	pH 7,2 (solución acuosa al 1% p/v)
Solubilidad	Se hincha en agua pero no se disuelve. Prácticamente insoluble en etanol 95° y otros solventes orgánicos.	De disolución lenta en agua formando una solución coloidal viscosa.
Viscosidad	20 mPa.s, dispersión 0,5% p/p y 2000 mPa.s, dispersión al 2% p/p	20/400 mPa.s, solución 1% p/p (20°C).
Toxicidad	Ingesta diaria recomendada por OMS: 25mg/kg. DL ₅₀ : ratas (IP): 1,6 g/kg.	DL ₅₀ : ratas (EV): 1,0 g/kg.

APLICACIONES DE LOS ALGINATOS

Se utilizan en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética y textil para espesar soluciones, estabilizar suspensiones y emulsiones, como agente gelante y para formar películas sobre diferentes superficies.

En farmacia, se utilizan tradicionalmente como excipientes en formas farmacéuticas orales y tópicas de liberación inmediata cumpliendo diferentes funciones: agente estabilizante de suspensiones y emulsiones, desintegrante de comprimidos y cápsulas, ligante en comprimidos y viscosante de pastas y cremas, como se describe en la **Tabla 1.8** (71).

Tabla 1.8. Utilización del AA como excipiente en formas farmacéuticas

Usos	Concentración (% p/v)
Pastas y cremas	5-10
Estabilizante de emulsiones	1-3
Agente suspensor	1-5
Agente ligante en comprimidos	1-3
Agente desintegrante de comprimidos	2,5-10

En los últimos años se han desarrollado numerosas formulaciones conteniendo AA o sus sales, tales como microcápsulas, nanopartículas, matrices, films y formulaciones líquidas, para administración oral, transdérmica u oftálmica. Estas formulaciones presentan propiedades de liberación prolongada o sitio-específica de fármacos (72–77).

También está descrito que el AA forma complejos con policationes, tales como poli[(2-dimetilamino)etilmetacrilato] y quitosan, para modular la liberación de diversos fármacos (78,79). Ramirez Rigo et al (80) estudiaron el uso de AA como portador de fármacos con grupos básicos modelo, tanto en dispersión como en matrices, y demostraron que el AA genera sistemas del tipo reservorio, que produce la liberación de los fármacos en presencia de sales.

Las dispersiones presentan baja viscosidad, con flujo plástico o *cuasi-newtoniano*. Son estables físicamente y permiten vehiculizar una cantidad importante de fármaco.

Las matrices obtenidas modulan la liberación de fármaco, con una cinética de liberación de orden cero en agua o en solución reguladora pH 6,8. El principal mecanismo por el que ocurre la liberación es la erosión.

Se han elaborado complejos de AA y atenolol como micropartículas para vía inhalatoria (81), que presentaron alta eficiencia de carga, bajo contenido de humedad y tamaño apropiado (alta fracción acumulativa de partículas respirables), por lo que se podría mejorar la disposición del fármaco en la membrana respiratoria y aumentar su tiempo de residencia debido a las propiedades mucoadhesivas de las cadenas poliméricas de AA.

Se han reportado usos de AA o su sal sódica en asociación con fármacos antituberculosos (12,73,74,82). Sin embargo, no se dispone en la actualidad del conocimiento detallado sobre las interacciones moleculares (iónica, dipolo-dipolo, hidrofóbica, entre otras) entre estos PE y los fármacos tales como RIF o ISO, y el rol de tales interacciones en la modulación de la liberación.

1.6.1.2. CARBOXIMETILCELULOSA

La carboximetilcelulosa es un derivado semi-sintético de la celulosa. A partir de celulosa en soluciones de hidróxido de sodio se obtiene celulosa alcalina que, luego, se hace reaccionar con monocloroacetato de sodio para producir carboximetilcelulosa de sodio (CMCNa) (83).

Están disponibles CMCNa de diferentes viscosidades (alta, media y baja) así como también de diferentes grados de sustitución. El grado de sustitución está definido como el número promedio de grupos hidroxilos sustituidos por unidad de glucosa anhidra y es lo que determina la solubilidad acuosa del polímero. Sus características se resumen en la **Tabla 1.9**.

Tabla 1.9. Propiedades fisicoquímicas de CMCNa (83)

Propiedades	CMCNa
PM	90.000 a 700.000
pKa	4,30
Solubilidad	Insoluble en acetona y etanol. Fácilmente dispersable en agua, formando coloides.
Viscosidad	5-4000 mPa.s, dispersión 1% p/v
Toxicidad	No tóxico ni irritante, OMS no especifica una ingesta diaria aceptable, por no considerarse de riesgo para la salud. DL ₅₀ ratas (oral): 27 g/kg.

La sal sódica es soluble en agua en un amplio rango de temperatura y precipita como ácido a valores de pH menores a 2. La forma ácida de carboximetilcelulosa (CMC) (**Figura 1.10**), al entrar en contacto con agua, se hincha y dispersa, pero no se disuelve (83).

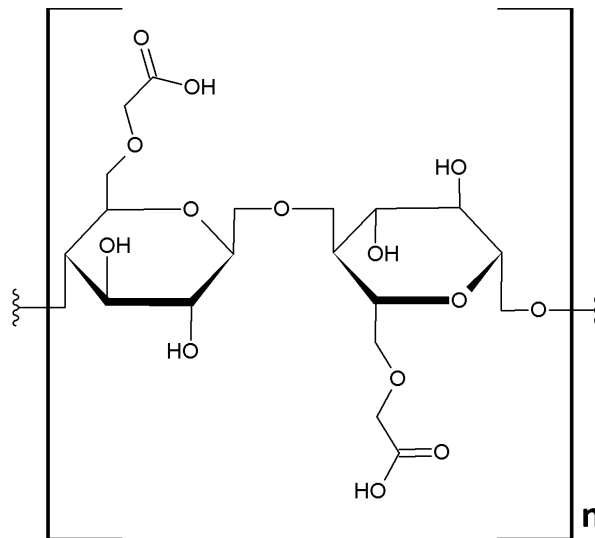


Figura 1.10. Estructura química de la forma ácida de carboximetilcelulosa (CMC).

APLICACIONES EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS Y TECNOLOGÍA

CMCNa se usa ampliamente en formulaciones de uso tópico y oral, principalmente como viscosante. También se usa como agente ligante y desintegrante en comprimidos o agente estabilizante en emulsiones (**Tabla 1.10**). La CMCNa de mediana viscosidad, en concentraciones del 4 al 6 % p/v se utiliza para preparar geles. Es uno de los principales ingredientes de los parches de ostomía, cuidado de heridas, y dermatológicos donde se usa para absorber el exudado o el agua transepidermal y sudor. También se utiliza en productos alimenticios y cosméticos (83).

Tabla 1.10. Utilización de CMCNa como excipiente en formas farmacéuticas (83)

Usos	Concentración (% p/v)
Agente emulsificante	0,25-1
Agente formador de geles	4-6
Inyectables	0,05-0,75
Soluciones orales	0,1-1
Agente ligante en comprimidos	1-6

Terapéuticamente, se usa CMCNa de mediana y alta viscosidad, en dosis entre 4 a 10 g para pacientes adultos, como laxante(83).

Existen amplios antecedentes del uso de CMCNa en la formulación de sistemas matriciales de liberación modificada ó sitio-específica, ya sea sola o asociada a otros polímeros tales como chitosan e hidroxipropilmetilcelulosa, entre otros (78,84,85).

Desde 1953, existen antecedentes de las propiedades y usos de CMC para formar films y dispersiones de uso farmacéutico (86).

En Japón, la empresa Gotoku Chemical Co LTD, provee de CMC bajo la marca NS-300, patentada en ese país en 1986 (87). Además, hay una serie patentes de productos farmacéuticos de muy rápida velocidad de disgregación que contienen NS-300 como excipiente (88,89).

Finalmente, Ramirez Rigo et al (90) obtuvieron CMC a partir de la neutralización de CMCNa y formaron complejos PE-fármaco, utilizando fármacos con grupos básicos modelo. Los materiales compactados en forma de matrices, presentaron alta hidrofiliidad, muy rápida velocidad de disgregación y de disolución, propiedades interesantes para sistemas de liberación inmediata y con problemas de humectabilidad.

1.7. ESQUEMA DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

Esta Tesis Doctoral se encuentra enmarcada en un proyecto de mayor envergadura que se desarrolla en 3 niveles de experimentación (**Figura 1.11**). A través del mismo se pretende adquirir gradualmente la capacidad científica y técnica para el desarrollo integral de sistemas farmacoterapéuticos, que permitan optimizar los atributos de fármacos de reconocida utilidad, abarcando desde su concepción hasta la evaluación de sus propiedades de eficacia y seguridad. El NIVEL 1 comprende el desarrollo y optimización de la metodología de obtención de los nuevos derivados y materiales portadores y su caracterización física, fisicoquímica y biológica. En el NIVEL 2, se diseñan y obtienen nuevos derivados farmacéuticos, sistemas de liberación modificada y otras formas farmacéuticas cuyas propiedades biofarmacéuticas son evaluadas *in vitro* o *in vivo/in situ* en animales. El NIVEL 3 comprende estudios farmacocinéticos y clínicos que permitan ponderar efectividad, seguridad y confiabilidad.

En este trabajo, se pretende abarcar actividades en los tres segmentos del esquema de I+D presentado.

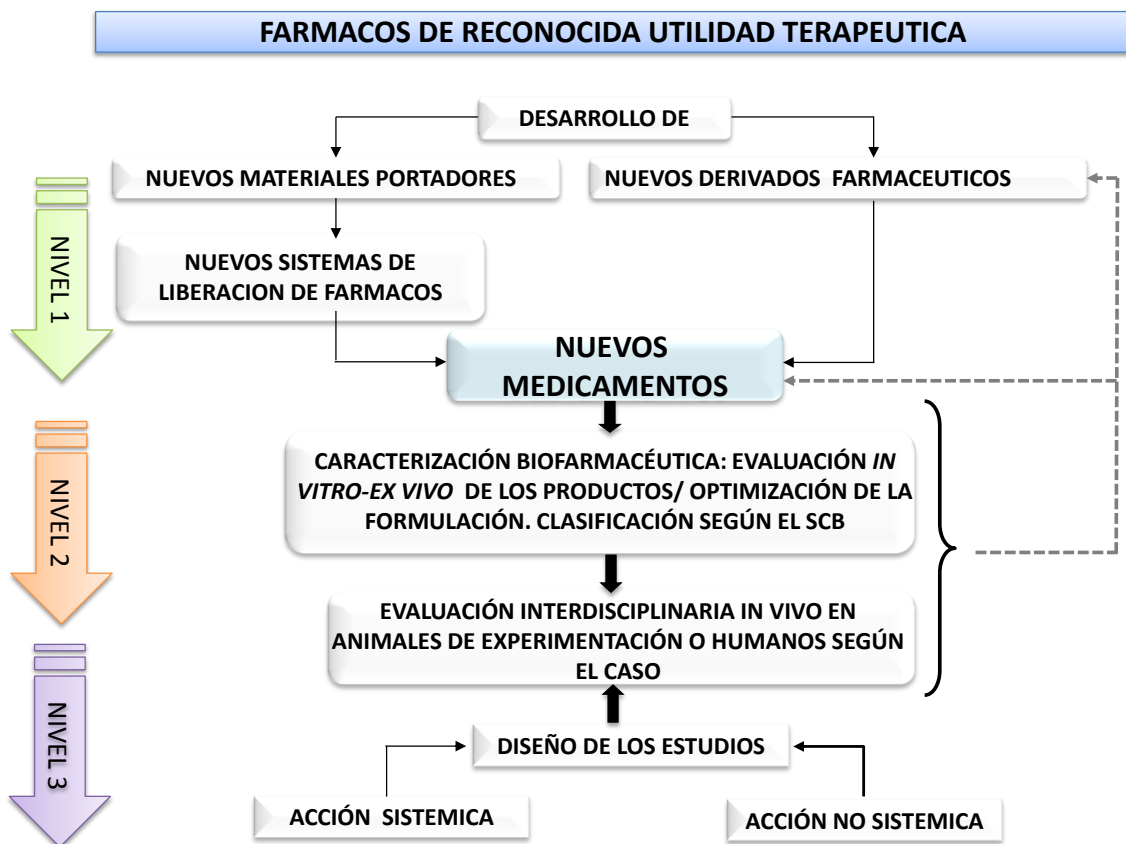


Figura 1.11. Esquema de I+D realizada en el grupo de investigación, mostrando los diferentes niveles de trabajo.

En los últimos años, nuestro grupo de investigación en tecnología farmacéutica ha desarrollado una nueva estrategia de I+D sobre sistemas portadores de fármacos y nuevos derivados farmacéuticos. Esto nos ha permitido consolidar una plataforma tecnológica original, basada en la interacción ácido-base entre un PE y fármacos ionizables de carga opuesta, sobre cuya base se diseñan sistemas de liberación modificada para atender situaciones farmacoterapéuticas específicas.

Estos sistemas permiten mejorar la efectividad, seguridad y confiabilidad de la acción medicamentosa de fármacos de reconocida utilidad terapéutica.

Por un lado, se han desarrollado sistemas de liberación modificada constituidos por complejos PE-fármaco en dispersión acuosa. Estos sistemas pueden formar hidrogeles estables en dispersión acuosa y, entre otras ventajas, son capaces de liberar al fármaco a una velocidad

controlada y sostenida, principalmente, mediante un mecanismo de intercambio iónico en presencia de fluidos biológicos (91,92).

El estudio del comportamiento de las dispersiones mostró que el equilibrio de condensación iónica no es afectado por la presencia de sustancias no iónicas (63,80,90–92) ni por el efecto de dilución y a su vez puede ser parcialmente desplazado por la adición de sales. Se ha observado un aumento en la solubilidad aparente de fármacos ácidos y básicos poco solubles vehiculizados en dispersiones PE- fármaco (63,93).

Por otra parte, se demostró que el acomplejamiento de fármacos con PE, permiten proteger al fármaco de la degradación química. Dicha interacción produce una elevada proporción de pares iónicos en los que las moléculas de los fármacos permanecen asociadas a la fase macromolecular de mayor viscosidad y menor energía cinética que las de la fase fluida. La disminución en el número de colisiones entre las moléculas presentes en la dispersión aumenta su estabilidad (93,94).

Además, estos sistemas presentan propiedades reológicas favorables para su aplicación por vía tópica y potencian la acción antimicrobiana frente a gérmenes resistentes (95).

El estudio de las formas sólidas compactadas permitió definir una nueva clase de matrices denominadas matrices hinchables PE-fármaco (80,96,97). En estas matrices, a diferencia de los sistemas matriciales convencionales, el PE y el fármaco forman una única entidad molecular, de modo que las moléculas del fármaco están homogéneamente distribuidas en la masa de la matriz, proporcionándole propiedades particulares que pueden ser explotadas tanto para el diseño de sistemas monolíticos (comprimidos) como de sistemas multiparticulados de liberación modificada.

Se han obtenido matrices hinchables PE-fármaco a partir de una amplia variedad de PE aniónicos: Carbomer (97), AA-Alginato de sodio (80), Eudragit L100 (98), carboximetilcelulosa (80) y catiónicos: Eudragit E100 (99). Se estudiaron integralmente las propiedades de relevancia farmacotécnica y biofarmacéutica de los materiales obtenidos y se definieron los mecanismos que gobiernan la liberación del fármaco desde estos sistemas.

1.8. HIPOTESIS DE TRABAJO

En función de lo anteriormente expuesto, se plantea siguiente hipótesis.

El desarrollo de una forma farmacéutica sólida en CDF de RIF e ISO, con un esquema de liberación secuencial y sitio-específica, tal que la liberación de RIF sea inmediata en estómago y la liberación ISO sea segregada respecto a la primera, optimizaría el desempeño de RIF. Más específicamente, este sistema mejoraría la estabilidad de RIF *in vivo* y durante el almacenamiento e incrementaría la biodisponibilidad oral de RIF. Además, no se pondría en riesgo el cumplimiento de la terapia, ya que se mantendría la asociación en CDF.

Adicionalmente, se realizaría un aporte en I+D a la farmacoterapia de la tuberculosis, apoyando la estrategia de *fin a la tuberculosis*, de la OMS.

1.9. OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta Tesis fue desarrollar sistemas farmacoterapéuticos de RIF e ISO que permitan mejorar la farmacoterapia actual de la tuberculosis.

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Obtener un nuevo material coprocesado de RIF, utilizando la estrategia PE-fármaco, que mejore la hidrofiliidad de RIF y la libere rápidamente en contacto con fluidos gástricos;
2. Vehiculizar ISO, de manera que la liberación sea segregada a RIF;
3. A partir de estos materiales innovadores, desarrollar sistemas de administración oral de RIF e ISO en CDF de liberación segregada y sitio-específica, tales como comprimidos bi-capa (matrices hidrofílicas PE-fármaco) o comprimidos con cubierta compactada;
4. Mejorar la estabilidad de RIF en medio ácido, cuando el fármaco se libera de la formulación innovadora en CDF con ISO;
5. Incrementar la biodisponibilidad de RIF en la formulación innovadora en CDF con ISO, tras su administración oral;
6. Aplicar conceptos del enfoque de Calidad desde el Diseño, al desarrollo de un sistema multiunitario de RIF e ISO.

En este marco, se ha organizado este trabajo de Tesis de la siguiente manera:

En primer lugar, se describe el desarrollo y caracterización de materiales portadores y matrices de RIF y CMC (Capítulo 2) y de ISO y AA (Capítulo 3). Luego, en el Capítulo 4, se evalúa la estabilidad de RIF en condiciones que simulan el entorno gástrico, cuando el fármaco se libera desde matrices innovadoras, en CDF con ISO. A partir de dichas matrices, en el Capítulo 5, se determina la biodisponibilidad oral de RIF e ISO, en un modelo animal. En el Capítulo 6 se abordan los conceptos de Calidad desde el Diseño en el desarrollo de comprimidos con cubierta compactada de RIF e ISO. Finalmente, se exponen las conclusiones y proyecciones de este trabajo (Capítulo 7), los anexos y publicaciones generadas a partir de esta Tesis.

1.10. REFERENCIAS

1. World Health Organization. WHO, 2016: Global Tuberculosis Report. Geneva, Switzerland; 2016.
2. Singh S, Mariappan TT, Shankar R, Sarda N, Singh B. A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *Int J Pharm*. 2001;228(1–2):5–17.
3. Beltrame S, Latorraca M, Moral M. Enfermedades infecciosas. Tuberculosis. GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD. 2nd ed. Buenos Aires, Argentina: Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación; 2014.
4. World Health Organization. Tratamiento de la Tuberculosis: Directrices para los programas nacionales. 2nd ed. Vol. 2, OMS, Serie de Informes Técnicos. Geneva, Switzerland; 1997. 23 p.
5. Sankar R, Sharda N, Singh S. Behavior of Decomposition of Rifampicin in the Presence of Isoniazid in the pH Range 1–3. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2003;29(7):733. Available from: <http://ezproxy.lib.vt.edu:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=bth&AN=10223024&site=ehost-live&scope=site>
6. Henwood SQ, Liebenberg W, Tiedt LR, Villiers MM De. Characterization of the Solubility and Dissolution Properties of Several New Rifampicin Polymorphs, Solvates and Hydrates. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2001;27(10):1017–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1081/DDC-100108364>
7. Dipiro TJ. PHARMACOTHERAPY A Pathophysiologic Approach. 6th ed. 2005. 2856 p.
8. Schluger NW. The pathogenesis of tuberculosis: The first one hundred (and twenty-three) years. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32(4):251–6.
9. Sosnik A, Carcaboso ÁM, Glisoni RJ, Moretton M a., Chiappetta D a. New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;62(4–5):547–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.023>
10. Organización Mundial de la Salud (OMS). La vacuna antituberculosa. Documento de posición de la OMS [Internet]. 2004. Available from: http://www.who.int/immunization/wer7904BCG_Jan04_position_paper_SP.pdf
11. Nación M de S de la. Resolución 498/2008. V Actualización de Normas Nacionales de Vacunación. Argentina; 2008.
12. Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(5):409–16.
13. WHO. The End TB Strategy. World Health Organization. Geneva, Switzerland; 2015. 1-20 p.
14. Caminero Luna JA. Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. *Rev Clínica Española* [Internet]. SEGO; 2016;216(2):76–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rce.2015.09.005>

15. Organización Mundial de la Salud (OMS). ADHERENCIA A LOS TRATAMIENTOS A LARGO PLAZO: Pruebas para la acción [Internet]. Washington, D.C; 2004. 202 p. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=18722&Itemid=
16. Mila L, Montaña M. Evaluación de la adherencia al tratamiento para Tuberculosis en el Departamento del Amazonas 2009-2012. Universidad Nacional de Colombia; 2014.
17. World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland; 2016.
18. Ashokraj Y, Agrawal S, Panchagnula R. A decision tree for rapid quality assurance and control of rifampicin-containing oral dosage forms for global distribution for tuberculosis treatment. *Indian J Pharm Sci.* 2008;70(1):1–4.
19. Singh S, Mariappan TT, Sharda N, Kumar S, Chakraborti AK. The reason for an increase in decomposition of rifampicin in the presence of isoniazid under acid conditions. *Pharm Pharmacol Commun.* 2000;6(9):405–10.
20. Ellard G a, Fourie PB. Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 1999;3(11 Suppl 3):S301-8-21. Available from: <http://pubget.com/paper/10593709/rifampicin-bioavailability-a-review-of-its-pharmacology-and-the-chemotherapeutic-necessity-for-ensuring-optimal-absorption%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593709>
21. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1980;121(6):939–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6774638>
22. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet.* 1993;341(8846):647–50.
23. Prasad B, Bhutani H, Singh S. Study of the interaction between rifapentine and isoniazid under acid conditions. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(4):1438–41.
24. Clinical Pharmacology. Rifampin [Internet]. Elsevier. 2016 [cited 2016 Jul 22]. p. 1–40. Available from: www.clinicalpharmacology.com
25. Gallo GG, Radaelli P. Rifampicin. In: Florey K, editor. *Analytical Profiles of Drug Substances.* London: Academic Press; 1976. p. 467–513.
26. Becker C, Dressman JB, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Rifampicin. *J Pharm Sci.* 2009;98(7):2252–67.
27. Agrawal S, Ashokraj Y, Bharatam PV, Pillai O, Panchagnula R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *Eur J Pharm Sci.* 2004;22(2–3):127–44.
28. Panchagnula R, Gulati I, Varma MVS, Ashok Raj Y. Dissolution Methodology for Evaluation of Rifampicin-Containing Fixed-Dose Combinations Using Biopharmaceutic Classification System Based Approach. *Clin Res Regul Aff* [Internet]. 2007;24(2–4):61–76. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10601330701683305>
29. Mariappan TT, 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.
30. Acocella G. Clinical Pharmacokinetics of Rifampicin. *Clin Pharmacokinet.* 1978;3(2):108–27.
 31. Agrawal S, Singh I, Kaur KJ, Bhade S, Kaul CL, Panchagnula R. Bioequivalence trials of rifampicin containing formulations: Extrinsic and intrinsic factors in the absorption of rifampicin. *Pharmacol Res.* 2004;50(3):317–27.
 32. Singh S, Bhutani H, Mariappan TT. Quality Problems of Anti-Tuberculosis Fixed-Dose Combinations (Fdcs): a Way Forward. *Indian J Tuberc.* 2006;53:201–5.
 33. Clinical Pharmacology. Isoniazid [Internet]. Elsevier. 2016 [cited 2016 Dec 21]. p. 1–77. Available from: www.clinicalpharmacology.com
 34. Brewer GA. Isoniazid. *Anal Profiles Drug Subst.* 1977;6:183–255.
 35. Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Isoniazid. *J Pharm Sci.* 2007;96(3):522–31.
 36. Jayaram R, Shandil RK, Gaonkar S, Kaur P, Suresh BL, Mahesh BN, et al. Isoniazid pharmacokinetics-pharmacodynamics in an aerosol infection model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(7):2951–7.
 37. Guy ES, Mallampalli A. Managing TB in the 21st century: existing and novel drug therapies. *Ther Adv Respir Dis [Internet].* 2008;2(6):401–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19124385>
 38. du Toit LC, Pillay V, Danckwerts MP. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. *Respir Res.* 2006;7(1):118.
 39. Gohel MC, Sarvaiya KG. A novel dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *AAPS PharmSciTech.* 2007;44(1):22–7.
 40. Hiremath PS, Saha RN. Oral matrix tablet formulations for concomitant controlled release of anti-tubercular drugs: Design and in vitro evaluations. *Int J Pharm.* 2008;362(1–2):118–25.
 41. Singh C, Koduri LVSK, Singh A, Suresh S. Novel potential for optimization of antitubercular therapy: Pulmonary delivery of rifampicin lipospheres. *Asian J Pharm Sci [Internet]. The Authors;* 2015;10(6):549–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2015.08.003>
 42. Son YJ, McConville JT. A new respirable form of rifampicin. *Eur J Pharm Biopharm [Internet]. Elsevier B.V.;* 2011;78(3):366–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.004>
 43. Maretti E, Rossi T, Bondi M, Croce MA, Hanuskova M, Leo E, et al. Inhaled Solid Lipid Microparticles to target alveolar macrophages for tuberculosis. *Int J Pharm [Internet]. Elsevier B.V.;* 2014;462(1–2):74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.034>
 44. Singh A, Jain R. Pharmaceutical compositions of anti-tubercular drugs and process for their preparation [Internet]. Google Patents; 2007. Available from: <https://www.google.com/patents/US7195769>
 45. Ansel HC, Popovich NG, Allen L V. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems.* 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia; 2011.
 46. Genaro A, editor. *Remington Farmacia.* 20th ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2003.

- 1408 p.
47. Suñé-Negre JM. Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración. In: Formación continuada para farmacéuticos de Hospital. Barcelona: Fundación PROMEDIC; 2002. p. 27–66.
 48. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2013;65(1):36–48. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X12002980>
 49. Safari J, Zarnegar Z. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *J Saudi Chem Soc* [Internet]. 2014 Apr;18(2):85–99. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610312001986>
 50. Berrozpe J, Ferrer E. Preparados orales de cesión modificada: cinética. In: Berrozpe J, Martínez Lanao J, Plá Delfina J, editors. *Biofarmacia y Farmacocinética Volumen II*. Madrid: Editorial Síntesis SA; 1997. p. 317–47.
 51. Kshirsagar N. Drug Delivery Systems. *Indian J Pharmacol*. 2000;32:S54–61.
 52. Sáez V, Hern E, Angulo LS. Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros. *Rev Iberoam Polímeros*. 2004;5(1):55–70.
 53. Laza Loaces D, Gómez Carril M, Ramos Picos D. DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS DE AVANZADA PARA LA PRODUCCIÓN DE FÁRMACOS. ANÁLISIS INFORMÉTRICO. *Rev Cuba Farm* [Internet]. 2001;35(3):181. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=7433700&lang=es&site=ehost-live>
 54. Vila Jato JL, editor. *Tecnología Farmacéutica. Volumen II: Formas Farmacéuticas*. Madrid: Editorial Síntesis; 2001.
 55. Chang R, Robinson J. Sustained drug release from tablets and particles through coating. In: Larry LA, Lieberman H, Schwartz JB, editors. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol 3* [Internet]. 2nd ed. Nueva York: Taylor & Francis; 1990. p. 199–302. (Pharmaceutical Dosage Forms--tablets). Available from: <https://books.google.com.ar/books?id=bFzblSaEE8MC>
 56. Lin S-Y, Kawashima Y. Current status and approaches to developing press-coated chronodelivery drug systems. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;157(3):331–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911008509>
 57. Qiu Y, Chen Y, Zhang GGZ, Liu L, Porter W. Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice [Internet]. Elsevier Science; 2009. (Pharmaceutical Theory and Practice Series). Available from: <https://books.google.com.ar/books?id=rhglCWal07UC>
 58. Digenis G, Gold T, Shah V. Cross-Linking of Gelatin Capsules and Its Relevance to Their in Vitro-in Vivo Performance. *J Pharm Sci*. 1994;83(7).
 59. Dressman J, Amidon G, Reppas C, Shah V. Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms. *Pharm Res*. 1998;15(1):11–22.
 60. Berrozpe J. *Biofarmacia y farmacocinética* [Internet]. Berrozpe JD, Lanao JM, Delfina JMP, editors. Editorial Síntesis SA; 1997. (Biofarmacia y farmacocinética). Available from: <https://books.google.com.ar/books?id=lhv9KwAACAAJ>
 61. Raymond C R, Paul J S MEQ. *Handbook Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition*. 2009;

62. Dobrynin A V., Rubinstein M. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog Polym Sci.* 2005;30(11):1049–118.
63. Jimenez-Kairuz AF, Allemandi DA, Manzo RH. The improvement of aqueous chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes. *Int J Pharm.* 2004;269(1):149–56.
64. Oosawa F. *Polyelectrolytes.* Nueva York: Marcel Dekker; 1971.
65. Guzmán ML, Manzo RH, Olivera ME. Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine. *Mol Pharm.* 2012;9(9):2424–33.
66. Breda SA, Jimenez-Kairuz AF, Manzo RH, Olivera ME. Solubility behavior and biopharmaceutical classification of novel high-solubility ciprofloxacin and norfloxacin pharmaceutical derivatives. *Int J Pharm.* 2009;371(1–2):106–13.
67. Romaňuk C, Manzo R, Garro-Linck Y, Chattah A, Monti G, Olivera M. Characterization of the Solubility and Solid-State Properties of Saccharin Salts of Fluoroquinolones. *J Pharm Sci.* 2009;98(10):3788–3801.
68. U.S. Government Publishing Office. *Electronix Code of Federal Regulations: PART 182—SUBSTANCES GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE* [Internet]. 2016 [cited 2016 Mar 31]. Available from: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&sid=3efaad1b0a259d4e48f1150a34d1aa77&rgn=div5&view=text&node=14:2.0.1.3.10&idno=14#14:2.0.1.3.10.3.7.6>
69. Goh CH, Heng PWS, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr Polym* [Internet]. Elsevier Ltd.; 2012;88(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.11.012>
70. FMC Corporation. *Alginates* [Internet]. FMC Corporation. 2003. Available from: <http://www.fmcbiopolymer.com/portals/pharm/content/docs/alginates.pdf>
71. Repka M, Singh A. *Alginate Acid.* In: *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 6th ed. Washington DC, USA: The Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association; 2009. p. 20–2.
72. Liew CV, Chan LW, Ching AL, Heng PWS. Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *Int J Pharm.* 2006;309(1–2):25–37.
73. Narra K, Dhanalekshmi U, Rangaraj G, Raja D, Kumar CS, Reddy PN, et al. Effect of formulation variables on rifampicin loaded alginate beads. *Iran J Pharm Res.* 2012;11(3):715–21.
74. Rastogi R, Sultana Y, Aqil M, Ali A, Kumar S, Chuttani K, et al. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. *Int J Pharm.* 2007;334(1–2):71–7.
75. Huang RYM, Pal R, Moon GY. Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol–water and isopropanol–water mixtures. *J Memb Sci* [Internet]. 1999 Jul 15;160(1):101–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037673889900071X>
76. Rane AB, Gattani SG, Kadam VD, Tekade AR. Formulation and evaluation of press coated tablets for pulsatile drug delivery using hydrophilic and hydrophobic polymers. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2009;57(November):1213–7.
77. Séchoy O, Tissié G, Sébastien C, Maurin F, Driot JY, Trinquand C. A new long acting

- ophthalmic formulation of Carteolol containing alginic acid. *Int J Pharm.* 2000;207(1–2):109–16.
78. Kulkarni AD, Vanjari YH, Sancheti KH, Patel HM, Belgamwar VS, Surana SJ, et al. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2016;1401(January):1–11. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2015.1129624>
79. Cai H, Ni C, Zhang L. Preparation of complex nano-particles based on alginic acid/poly[(2-dimethylamino) ethyl methacrylate] and a drug vehicle for doxorubicin release controlled by ionic strength. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;45(1–2):43–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.020>
80. Ramírez Rigo M V., Allemandi DA, Manzo RH. Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid. Characterization and delivery properties. *Int J Pharm.* 2006;322(1–2):36–43.
81. Ceschan NE, Bucalá V, Ramírez-Rigo MV. New alginic acid-atenolol microparticles for inhalatory drug targeting. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;41:255–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.040>
82. Avachat AM, Bhise SB. Tailored release drug delivery system for rifampicin and isoniazid for enhanced bioavailability of rifampicin. *Pharm Dev Technol* [Internet]. 2011;16(2):127–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105081>
83. Hooton J. Sodium Carboxymethylcellulose. In: The Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association, editor. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. Washington USA; 2009. p. 118–21.
84. Joe JH, Lee WM, Park YJ, Joe KH, Oh DH, Seo YG, et al. Effect of the solid-dispersion method on the solubility and crystalline property of tacrolimus. *Int J Pharm.* 2010;395(1–2):161–6.
85. Gómez-Burgaz M, García-Ochoa B, Torrado-Santiago S. Chitosan-carboxymethylcellulose interpolymer complexes for gastric-specific delivery of clarithromycin. *Int J Pharm.* 2008;359(1–2):135–43.
86. Dieckman SF, Jarrell JG, Voris RS. Carboxymethylcellulose in the free acid form. *Ind Eng Chem* [Internet]. 1953;45(10):2287–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/ie50526a041>
87. GOTOKU CHEMICAL COMPANY LTD. NS-300. 2001.
88. Hiramura T, Ikura K, Itaya S, Okabayashi T, Hashikawa N, Morita T, et al. Method for producing disintegrating particulate composition comprising acid-type carboxymethylcellulose, disintegrating particulate composition comprising acid-type carboxymethylcellulose, and orally disintegrating tablet including disintegrating particulate [Internet]. Google Patents; 2015. Available from: <https://www.google.com/patents/US20150045452>
89. Hiramura T, Ikura K, Ishikawa S, Okabayashi T, Hashikawa N, Morita T, et al. Disintegrating particle composition containing acid-type carboxymethylcellulose and crystalline cellulose, and orally disintegrating tablet containing said composition [Internet]. Google Patents; 2015. Available from: <http://www.google.co.in/patents/US20150238424>
90. Ramírez Rigo M, Allemandi D, Manzo R. Swellable drug-polyelectrolyte matrices of drug-carboxymethylcellulose complexes. Characterization and delivery properties. *Drug Deliv.* 2009;16(2):108–15.

91. Quinteros DA, Rigo VR, Kairuz AFJ, Olivera ME, Manzo RH, Allemandi DA. Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2008;33(1):72–9.
92. Breda SA, Guzmán ML, Confalonieri A, González C, Sparo M, Manzo RH, et al. Systemic exposure, tissue distribution, and disease evolution of a high solubility ciprofloxacin-aluminum complex in a murine model of septicemia induced by *Salmonella enterica* serotype enteritidis. *Mol Pharm.* 2013;10(2):598–605.
93. Zoppi A, Linck YG, Monti GA, Genovese DB, Jimenez Kairuz ÁF, Manzo RH, et al. Studies of pilocarpine: Carbomer intermolecular interactions. *Int J Pharm [Internet]. Elsevier B.V.;* 2012;427(2):252–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.02.005>
94. Esteban SL, Manzo RH, Alovero FL. Azithromycin loaded on hydrogels of carbomer: Chemical stability and delivery properties. *Int J Pharm.* 2009;366(1–2):53–7.
95. Romero VL, Pons P, Bocco JL, Manzo RH, Alovero FL. Eudragit E100 potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;334(2):102–10.
96. Bermúdez JM, Jimenez-Kairuz AF, Olivera ME, Allemandi D a, Manzo RH. A ciprofloxacin extended release tablet based on swellable drug polyelectrolyte matrices. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(3):924–30.
97. Jimenez-Kairuz AF, Llabot JM, Allemandi DA, Manzo RH. Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) Characterization and delivery properties. *Int J Pharm [Internet].* 2005;288(1):87–99. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517304005502>
98. Arduzzo MS, Manzo RH, Jimenez-Kairuz a. F. Comparative study of three structurally related acid polyelectrolytes as carriers of basic drugs: Carbomer, Eudragit L-100 and S-100. *Supramol Chem [Internet].* 2010;22(5):289–96. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10610270903469757>
99. Quinteros DA, Manzo RH, Allemandi DA. Design of a colonic delivery system based on cationic polymethacrylate (Eudragit E100)-mesalamine complexes. *Drug Deliv [Internet].* 2010;17(4):208–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/10717541003667806>

CAPÍTULO 2

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES PORTADORES DE RIFAMPICINA- CARBOXIMETILCELULOSA

2.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales obstáculos para el éxito del tratamiento de la tuberculosis es la baja y variable biodisponibilidad oral del RIF, que es un fármaco de clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), lo que implica que la velocidad y el grado de disolución juegan un papel importante en su desempeño *in vivo*. RIF es un zwitterión fácilmente soluble a valores de pH por debajo de 3 pero poco soluble a valores de pH entre 3 y 8. Por tanto, la disolución *in vivo* de RIF en el medio ácido del estómago, es una condición necesaria para su adecuada biodisponibilidad (1), ya que se absorbe principalmente en el estómago y en el duodeno (2).

Existen varios informes de bio-inequivalencia de RIF y se han postulado numerosas causas que aportan a este inconveniente (3). Por ejemplo, la solubilidad dependiente del pH, la hidrofobicidad y el polimorfismo de RIF conducen a diferencias en la humectabilidad y la velocidad de disolución. La influencia de los excipientes en el desempeño de la forma farmacéutica, la variabilidad interindividual en la absorción y el metabolismo de RIF, así como también su degradación a pH gástrico están asociadas con problemas de biodisponibilidad de RIF. Los niveles plasmáticos sub-terapéuticos de RIF pueden aumentar el riesgo de resistencia en vista de que su actividad es altamente dependiente de la dosis y que el mecanismo de resistencia de RIF se desarrolla en un solo paso (4–6).

Algunas investigaciones prometedoras se han llevado a cabo con el objetivo de mejorar el desempeño de RIF, tales como la amorfización, la reducción del tamaño de partícula o la encapsulación RIF en liposomas o polímeros (7). Sin embargo, estas técnicas suelen aumentar los costos de producción y en ocasiones utilizan aditivos que no son aprobados por las organizaciones de salud (8). Adicionalmente, representa un reto adicional a la formulación las

altas dosis de RIF (300 mg) y la necesidad de combinarla con otros fármacos antituberculosos a dosis fija. El desarrollo de nuevos materiales capaces de superar los inconvenientes de RIF, que permitan la preparación de formas farmacéuticas sólidas para la vía oral, a través de procedimientos simples y de bajo costo, puede proporcionar un nuevo enfoque para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas eficaces contra la tuberculosis.

Como se mencionó previamente, CMC en su forma ácida es insoluble en agua, comportándose como una resina de intercambio iónico que puede cargarse fácilmente con moléculas de fármacos que tienen grupos básicos protonables, formando productos insolubles. De hecho, los complejos de CMC con fármacos básicos modelo han mostrado una liberación muy rápida en medio ácido y se han propuesto como plataforma para aumentar la velocidad de disolución de fármacos de baja solubilidad acuosa (9,10).

Como hipótesis de trabajo, se consideró que el desarrollo de materiales portadores de RIF, asociados a un PE tal como CMC, permitiría la obtención de formas farmacéuticas sólidas para la vía oral, con muy rápida velocidad de liberación de RIF.

2.1.1. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo fue obtener un material portador de RIF por asociación a CMC, que permita mejorar la hidrofiliidad de RIF y liberarla rápidamente en contacto con fluidos gástricos, de manera que sea potencialmente útil en el desarrollo de formulaciones sólidas para la vía oral para el tratamiento de la tuberculosis.

2.2. MATERIALES

RIF (grado farmacéutico) y KBr (grado espectroscópico), se adquirieron en Parafarm[®]-Argentina y en Merck[®]-Alemania, respectivamente. Como medios de disolución, se utilizaron las soluciones de HCl 0,1M pH = 1,0 y KH₂PO₃/NaOH pH = 6,8, preparados según USP 39 (11).

CMCNa (de ultra-alta viscosidad, altamente purificada, grado de sustitución (COOH) 0,98) se adquirió de Fluka[®]-Argentina. La viscosidad de una solución acuosa al 1% p/v de CMCNa fue de 2100 mPa.

CMC se obtuvo por adición de 40 mL de HCl 37% (Cicarelli [®]-Argentina) a 2500 mL de una dispersión acuosa de CMCNa al 4 % p/v, hasta pH = 2 y posterior precipitación de CMC con 800 mL de etanol. El sólido, separado por filtración, fue lavado con aproximadamente 2 L de agua destilada, filtrado y secado en un horno a 50 °C hasta peso constante. El producto obtenido fue

molido y tamizado, seleccionándose la fracción comprendida entre los tamices de 425 y 212 μm . Los equivalentes de grupos carboxílicos por gramo de CMC se determinaron por titulación potenciométrica ácido-base (10), para lo cual se disolvieron 15,0 mg de CMC con 3,0 mL de NaOH 0,0500 M y se añadieron 30 mL de agua destilada. El sistema se tituló con HCl 0,0500 M hasta el punto equivalente. Los equivalentes de grupos carboxílicos por gramo de CMC fueron $(3,75 \pm 0,06) \times 10^{-3}$. Este ensayo se realizó por triplicado.

Los demás reactivos fueron de calidad farmacéutica o analítica y se utilizaron tal como se recibieron.

2.3. MÉTODOS

2.3.1. PREPARACIÓN DE CMC-RIF

CMC-RIF se preparó en un mortero mediante la adición de 12 mL de etanol a una mezcla de 1,00 g de CMC y 3,09 g de RIF (relación molar 1:1 de equivalentes carboxílicos en CMC: grupos amino de RIF). La pasta semisólida resultante se sometió a amasado durante 5 minutos y se dejó durante la noche a temperatura ambiente. La masa se extruyó a continuación utilizando un tamiz con tamaño de poro de 600 μm (ASTM, Zonytest, Argentina) para obtener gránulos que se secaron hasta peso constante en un horno a 40 °C.

CMC-RIF_{0,8} y CMC-RIF_{0,6} se prepararon por el mismo procedimiento, a partir de relaciones molares CMC: RIF de 1: 0,8 y 1: 0,6.

Con fines comparativos, se preparó una mezcla física de CMC+RIF. Para una mejor comprensión del comportamiento térmico, también se preparó rifampicina dihidrato (RIF.2H₂O) y la mezcla física CMC+RIF.2H₂O. Las mezclas físicas contuvieron una composición equivalente en gramos a CMC-RIF y se prepararon mediante la interposición simple de los polvos.

2.3.2. PREPARACIÓN DE RIF.2H₂O

RIF.2H₂O se obtuvo adaptando una metodología descrita por Henwood et al. (7). Resumidamente, se disolvieron 1,10 g de RIF en 50 mL de etanol anhidro a 60°C. El disolvente se evaporó en un rotavapor Phoenix Instrument (Garbsen, Alemania) a temperatura ambiente; el material cristalizado se retiró del balón y se almacenó en condiciones de vacío a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante. Los patrones de DRXP y DSC observados

estuvieron en concordancia con los reportados previamente por Son y McConville y Henwood et al. (7,12).

2.3.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE RIF EN CMC-RIF

El porcentaje de RIF en CMC-RIF se determinó en el material sólido y después de su dispersión en medio ácido.

El contenido de RIF en el material sólido fue calculado a través de la cuantificación del nitrógeno total utilizando el método Kjeldahl (13), contra una referencia de RIF pura. Se analizaron muestras, por duplicado, de 1,0000 g. El porcentaje de RIF en el sólido se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$RIF_{(CMC-RIF)}(\%) = \frac{N_{(CMC-RIF)}(\%)}{N_{(RIF)}(\%)} \times 100$$

Donde $N_{(CMC-RIF)}(\%)$ es el porcentaje de nitrógeno en CMC-RIF y $N_{(RIF)}(\%)$ es el porcentaje de nitrógeno en la muestra RIF pura.

Para determinar la RIF disponible después de la dispersión de CMC-RIF en medio ácido, se pesó con exactitud 30,0 mg de CMC-RIF, que se transfirieron a un matraz de 100 mL y se añadió HCl 0,1 M precalentado a 37 °C hasta el volumen final. La muestra se sonicó durante 5 minutos para permitir la liberación de RIF desde los gránulos, ya que la CMC no es soluble en agua. Finalmente, se tomó 1,0 mL del sobrenadante y se diluyó hasta 10 mL, con solución reguladora de fosfato USP de pH 6,80 (11). Este ensayo se realizó por duplicado.

RIF se cuantificó mediante un método de HPLC indicativo de estabilidad, determinado por Sankar et al. (14). Para ello, se utilizó un equipo de cromatografía líquida Waters, software Empower PRO, columna C18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex Luna 5 µm, con precolumna), volumen de inyección: 20 µL, flujo 1 mL/min, fase móvil metanol: solución reguladora de fosfato 0,0 1M pH 7,00±0,05, en proporción 65:35. La detección se realizó por espectrofotometría UV-Vis con detector de arreglo de diodos (Waters 2475) en el rango de 200 a 550nm.

2.3.4. CARACTERIZACIÓN DE CMC-RIF EN ESTADO SÓLIDO

Los siguientes experimentos se realizaron sobre CMC-RIF, CMC-RIF_{0,8} y CMC-RIF_{0,6}, los materiales de partida y las mezclas físicas mediante los métodos detallados a continuación.

2.3.4.1. MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA

Se tomaron imágenes ópticas de las muestras utilizando un microscopio Olympus BX41 (Bio-Analítica Argentina S.A., EE.UU.) equipado con una cámara digital Infinity 1. El análisis de las imágenes se realizó con el software Infinity Analyze.

2.3.4.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X EN POLVO (DRXP)

Los patrones de DRXP se adquirieron a temperatura ambiente en un difractor de rayos X (PANalytical X'Pert Pro, Holanda) utilizando radiación de Cu K α (tubo operado a 40 kV, 100 mA). Los datos se recogieron en un intervalo angular de 5 a 35° 2 θ en modo de exploración continua, con un tamaño de paso de 0,05° 2 θ y un recuento de tiempo de 5 s por paso.

Los patrones de difracción fueron tomados a temperatura ambiente en un difractor de rayos X (PANalytical X'Pert Pro) usando radiación Cu K α (tubo operado a 40 kV y 100 mA). Los datos se tomaron en un intervalo angular de 5 a 35° 2 θ , con un paso de 0,05° 2 θ y un tiempo de recuento de 5 s/paso. Los difractogramas obtenidos se analizaron mediante el software X'Pert data viewer (PANalytical).

2.3.4.3. ANÁLISIS TÉRMICO

Las muestras se sometieron a calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés), en un rango de temperatura entre 30 y 300 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Para determinar las curvas DSC, se utilizó una celda de DSC estándar A2920 MDSC (Modulated DSC, TA Instruments) equipada con una estación de datos (Universal Analysis, TA Instruments). El eje de temperatura y la constante de celda de DSC se calibraron con indio (15,52 mg, 99,99% puro, pico máximo a 156,71°C, Aldrich®, Milwaukee, EE.UU.). Las muestras (0,8-2,0 mg) se calentaron en portamuestras de aluminio herméticamente cerrados y posteriormente perforados, bajo flujo de nitrógeno (50 mL/min). Las temperaturas de fusión, deshidratación, vaporización y descomposición se determinaron mediante la extrapolación de la temperatura de inicio (*onset*) del pico endotérmico/exotérmico.

Además, RIF.2H₂O y la mezcla física CMC+RIF.2H₂O se calentaron desde temperatura ambiente hasta 80 °C y se mantuvieron a esa temperatura durante 1 min para eliminar el agua adsorbida sobre las superficies de las partículas. Después de eso, las muestras se enfriaron y escanearon por segunda vez, utilizando las condiciones descritas anteriormente.

Para el TGA se utilizó el equipo A2950 TGA (HI-RES, TA Instruments) acoplado a una estación de datos. Los ejes de temperatura se calibraron con el punto Curie de Ni (354,3 °C). Las muestras (0,8-1,3 mg) se colocaron en portamuestras abiertos y se calentaron bajo las mismas condiciones usadas en el análisis de DSC.

La derivada primera de la pérdida de masa en función de la temperatura (dTGA) resaltó los diferentes eventos de pérdida de masa presentes en las muestras, asignados a presencia de agua o descomposición.

La microscopía de platina calentable (MPC) se llevó a cabo en un microscopio de platina calentable (Leitz Wetzlar, Alemania) acoplado a un termómetro digital. Varios cristales de cada muestra, suspendidos previamente en vaselina, fueron colocados sobre la platina en un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos. La velocidad de calentamiento se reguló a aproximadamente 10 °C/min. Esta técnica permite observar burbujas de vapor cuando se libera agua de la superficie de una partícula sólida, así como también modificaciones de forma que pueden estar relacionadas con las transiciones de fase sólido-sólido (15).

2.3.4.4. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ESTADO SÓLIDO (RMN) DE ^{13}C Y ^{15}N .

Estos estudios se realizaron en colaboración con el Dr. Gustavo Monti y la Dra. Yamila Garro-Linck (IFEG-CONICET; FAMAF).

Se llevaron a cabo experimentos de RMN de estado sólido de ^{13}C y ^{15}N utilizando la técnica de polarización cruzada con rotación al ángulo mágico, más conocido en inglés como *cross polarization/magic angle spinning* (CP/MAS). Se utilizó un espectrómetro Bruker Avance II a una frecuencia Larmor de 300,13 MHz, 75,46 MHz y 30,42 MHz para ^1H , ^{13}C y ^{15}N , respectivamente, equipadas con una sonda MAS de 4 mm. La velocidad de rotación de las muestras fue de 10 kHz, y los espectros CP/MAS ^{13}C se registraron utilizando un pulso de 2 ms, con rampa de amplitud variable. El experimento de edición de carbono cuaternario ^{13}C (supresión no cuaternaria; NQS, por sus siglas en inglés) se realizó en todas las muestras, lo que permitió identificar las señales de carbono cuaternario y los grupos metilo, facilitando así la asignación precisa de las señales.

Se llevaron a cabo experimentos ^{15}N CP/MAS, con un pulso de 6 ms. Además se realizaron experimentos para RIF y CMC-RIF de ^1H - ^{15}N con tiempo de contacto corto (SCT, por sus siglas en inglés) CP/MAS usando un tiempo de contacto 200 μs . Se usó glicina como referencia externa de los espectros de ^{13}C y ^{15}N y para ajustar la condición de correlación de Hartman-

Hahn para los experimentos de polarización cruzada. Se registraron diferentes números de transitorios para cada compuesto con el fin de obtener una adecuada relación entre la señal y el ruido.

La secuencia SPINAL64 se utilizó para el desacoplamiento heteronuclear durante la adquisición con un campo de protones H_{1H} que satisfizo $\omega_{1H}/2\pi = \gamma_H H_{1H} = 65$ kHz (16) y un retraso de reciclado de 5 s. La asignación de los espectros de RMN de ^{13}C en estado sólido para RIF se realizó por comparación con los desplazamientos químicos obtenidos en solución, teniendo en cuenta el experimento NQS y las asignaciones presentadas por Przybylski et al. (2014) y Agrawal et al. (2004) (17,18). Además, la asignación de los espectros de RMN de ^{15}N en estado sólido para RIF se llevó a cabo mediante la comparación de los corrimientos químicos con los informados por Przybylski et al. (2014) (17).

2.3.4.5. ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Los espectros infrarrojos se tomaron desde pastillas de KBr, que contenían cada una de las muestras en una concentración del 1% p/p de RIF y se registraron en un espectrómetro NICOLET FTIR (360 FTIR ESP, Thermo Nicolet, Avatar, EE.UU.). Las muestras se escanearon entre 4000 a 400 cm^{-1} , y las condiciones de registro fueron resolución 8,0; número de escaneos 40. Los datos se analizaron utilizando el software OMNIC.

2.3.5. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS GRÁNULOS CMC-RIF

Las propiedades de flujo de CMC-RIF se caracterizaron usando el método descrito en la Farmacopea Europea (Sección 2.9.15-16) (19). Los parámetros determinados se detallan a continuación.

Ángulo de Reposo: se tomó una fracción de cada uno de los polvos y se le calculó el ángulo de reposo ($n=10$). Se utilizó un embudo de PVC donde el extremo del vástago se encuentra ubicado a una altura fija de 5 cm de una base de 0,995 cm de radio sobre la cual cae el polvo. La fracción de polvo a ensayar se dejó caer por gravedad y cuando no se observaron variaciones en la altura del cono formado se midió la altura con un calibre y se calculó el ángulo de inclinación del cono formado aplicando la ecuación: $\alpha = \text{arctang } h/R$, donde h es la altura del cono formado y R es el radio de la base.

Densidad a Granel (DG) y Densidad Empaquetada (DE): se taró una probeta de 10 mL y se colocó suavemente la fracción de polvo a analizar. Este recipiente se pesó nuevamente y se

calculó la DG como la relación entre el peso de las partículas y el volumen que ocupan. Los mismos recipientes fueron sometidos a suaves golpes verticales hasta que el volumen de polvo no presentó variaciones. Se calculó la DG y la DE como la relación entre el volumen ocupado por las partículas antes y después de las vibraciones. Se realizó un triplicado de ensayos con diferentes porciones del lote elaborado.

Índice de Carr (IC) y Cociente de Hausner (CH): se calcularon a partir de los datos de DG y DE con las siguientes ecuaciones:

$$IC = \frac{(DE-DG)}{DE} \times 100$$

$$CH = \frac{DE}{DG}$$

Los datos obtenidos se compararon con los valores establecidos en la USP 39 (11), resumidos en la **Tabla 2.1.**

Tabla 2.1. Propiedades de flujo y su relación con el ángulo de reposo, el IC y el CH, según USP 39.

ANGULO DE REPOSO	IC	CH	TIPO DE FLUJO
25–30	<10	1,00–1,11	Excelente
31–35	11–15	1,12–1,18	Muy Bueno
36–40	16–20	1,19–1,25	Bueno (<i>Fair</i>) (no necesita excipientes)
41–45	21–25	1,26–1,34	Regular (debería mejorarse)
46–55	26–31	1,35–1,45	Pobre (se debe agitar-vibrar)
56–65	32–37	1,46–1,59	Muy pobre
>66	>38	>1,60	Pésimo

2.3.6. EVALUACIÓN DE CAPTACIÓN DE AGUA

Se prepararon discos (13 mm de diámetro) conteniendo polvos en las cantidades descriptas en la **Tabla 2.2** por compresión a 2 t en una prensa hidráulica (Delfabro, Argentina). Cada disco se sometió al ensayo de captación de agua usando un aparato de Enslin como describe Nogami et al. (20), en una sala con temperatura controlada. Los ensayos se realizaron por triplicado y la absorción de agua se expresó en mL por gramo de sólido.

Tabla 2.2. Cantidad de polvo de RIF o CMC usado para elaborar los discos de los ensayos de captación de agua.

Disco	mg de RIF	mg de CMC
RIF	286 ± 4	---
CMC-RIF	285 ± 6	79 ± 2
CMC+RIF	288 ± 3	80 ± 1
CMC	---	83,3 ± 0,1

2.3.7. LIBERACIÓN DE RIF DESDE MATRICES CMC-RIF

Se obtuvieron matrices que contuvieron 300,0 mg de RIF, por compactación de 453,1 mg de CMC-RIF en una comprimidora monopunzón (Talleres Sánchez, CS3-GMP, Argentina). Las matrices obtenidas presentaron una dureza promedio de $(25 \pm 7) 10^4$ Pa ($n = 10$, AVIC, Argentina).

La velocidad de disolución de RIF desde las matrices CMC-RIF se midió en un disolutor (Hanson Research, Modelo SR II, EE.UU.), utilizando el método de disolución USP 39 para cápsulas RIF (aparato 1, 900 mL de HCl 0,1 M, 100 rpm, 37 °C) (11). La cantidad de RIF liberada se determinó por comparación con una solución estándar de concentración conocida de RIF en el mismo medio (es decir, 300 mg de RIF en 900 mL de HCl 0,1 M), que se preparó concomitantemente y se mantuvo en el baño de agua durante el mismo período de tiempo (USP 39).

A los 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos de ensayo, se tomaron muestras de 15 mL utilizando cánulas filtrantes. A los fines de saturar el filtro, se descartaron los primeros 10 mL (que fueron devueltos al vaso) y se repusieron 5 mL con medio fresco precalentado. Las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría UV a 472 nm (espectrofotómetro UV-Vis Evolution 300, Thermo Electron Corporation, EE.UU.).

Con fines comparativos, se realizó la disolución de dos formulaciones de liberación inmediata comercialmente disponibles de RIF, denominadas formulación 1 y 2. La Formulación 1 (RIFADIN®, Sanofi-Aventis Argentina SA, Argentina, cápsulas de gelatina dura) contuvo 300 mg de RIF (que representaba un 83% p/p del contenido de la cápsula), 50 mg de almidón de maíz y 10 mg de estearato de magnesio. La formulación 2 (Rifampicina Fabra®, Fabra SA, Argentina, cápsulas de gelatina dura) contuvo 300 mg de RIF (que representa un 60% p/p del contenido de la cápsula), 5 mg de estearato de magnesio y manitol, en cantidad suficiente para 500 mg.

La eficiencia de disolución (ED) se calculó a partir del perfil de concentración de RIF en función del tiempo a los 5 y 15 minutos, usando la siguiente ecuación:

$$ED_t = \frac{ABC_t}{ABC_{100\%}} * 100$$

En donde ABC_t es el área bajo la curva del perfil de disolución hasta cierto tiempo, t , y $ABC_{100\%}$ es el área del rectángulo descrito por el 100% de disolución en el mismo tiempo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, y los valores ED se compararon por un ANOVA multifactorial (test de Tukey) en un intervalo de confianza del 95% ($p \leq 0,05$).

2.4. RESULTADOS

2.4.1. PREPARACIÓN DE CMC-RIF

CMC-RIF se obtuvo por impregnación, usando etanol para promover la interacción entre CMC y RIF. Este solvente se evaporó fácilmente cuando los materiales se secaron en la estufa. Resultados similares fueron reportados por Ramírez Rigo et al. (10) después de cargar CMC con atenolol y metoclopramida.

La observación de las partículas bajo luz polarizada permitió diferenciar los cristales de RIF, refringentes a la luz, respecto a las partículas amorfas de CMC. Estas partículas individuales de CMC y RIF se pueden observar en la mezcla física CMC+RIF (**Figura 2.1**), mientras que en CMC-RIF, las partículas de CMC están cubiertas por RIF cristalizada en la superficie. Experimentos preliminares comparando diferentes relaciones CMC:RIF (CMC-RIF_{0.8} y CMC-RIF_{0.6}) no mostraron diferencias en la morfología del cristal RIF cuando se observaron bajo luz polarizada.

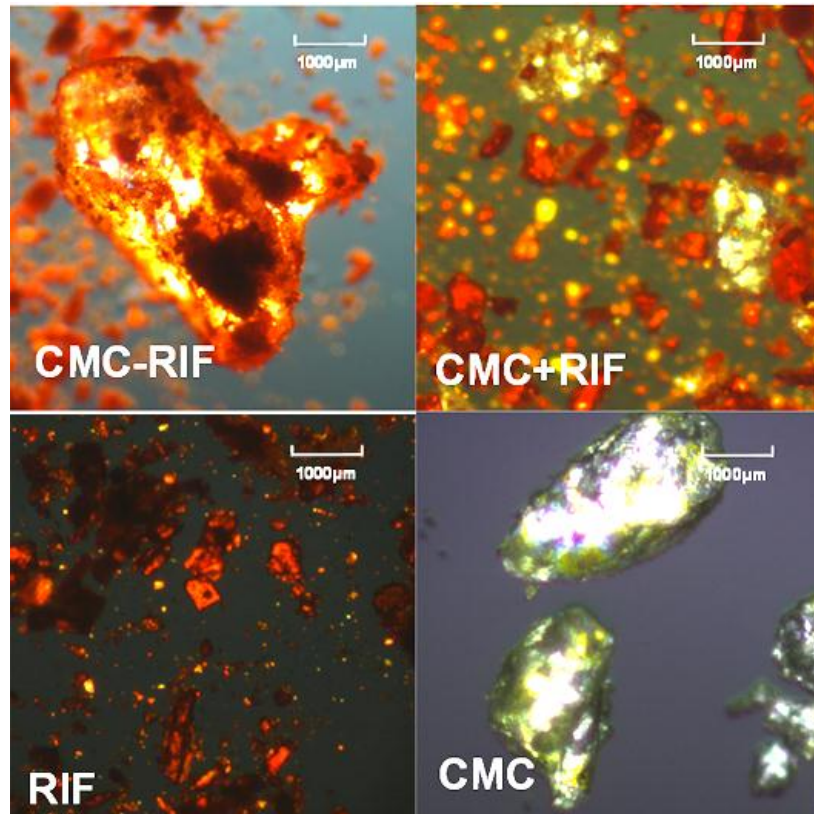


Figura 2.1: Imágenes (40x) de CMC-RIF, sus precursores y la mezcla física, obtenida por microscopía óptica de luz polarizada.

2.4.2. CONTENIDO DE RIF EN LOS GRÁNULOS DE CMC-RIF

La cuantificación del contenido de nitrógeno determinó que CMC-RIF contuvo ($75,8 \pm 0,1$) mg de RIF en 100,0 mg de polvo. Obsérvese que este valor está ligeramente por debajo del contenido teórico previsto (78,3% p/p), lo que sugiere que se ha incorporado aproximadamente 2,5% de agua al material sólido. Después de la disolución en medio ácido, CMC-RIF liberó el ($95,7 \pm 0,4$) % de la cantidad teórica de RIF.

2.4.3. CARACTERIZACIÓN DE CMC-RIF EN ESTADO SÓLIDO

Los productos CMC-RIF, CMC, RIF y CMC+RIF se caracterizaron por microscopía óptica de luz polarizada, DRXP, análisis térmico, RMN en estado sólido de ^{13}C y ^{15}N y FTIR.

Los perfiles DRXP se muestran en la **Figura 2.2**, donde RIF presenta un patrón de difracción con picos a $13,65$ y $14,35^\circ 2\theta$, característicos de la forma cristalina I de RIF anhidra, en concordancia con lo descrito previamente por Agrawal et al. (18). La mezcla física CMC+RIF presentó un patrón similar a RIF.

CMC-RIF tuvo un patrón cristalino completamente diferente al de RIF. En cambio, fue similar a los descriptos anteriormente para RIF.2H₂O (7,12), con diferencias menores entre valores entre 25 y 30° 2θ.

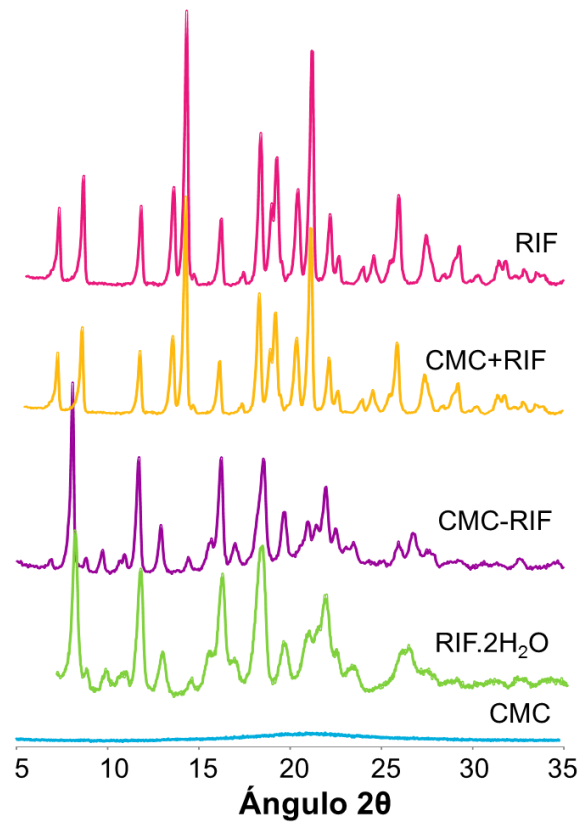


Figura 2.2. Patrones de DRXP de CMC-RIF, sus precursores y la mezcla física CMC+RIF. El patrón de difracción de RIF.2H₂O se obtuvo con fines comparativos.

La interacción iónica entre fármacos y polielectrolitos (PE) se caracteriza por la pérdida de las señales de los fármacos cristalinos (amorfización) (10,21–23). Aunque la DRXP de CMC-RIF sugiere que la interacción entre RIF y CMC no es iónica, no se puede descartar otros tipos de interacciones débiles, tales como las interacciones dipolo-dipolo o las hidrofóbicas.

Los TGA, que representan la pérdida de peso y su derivada en función de la temperatura, se muestran en la **Figura 2.3**. Se puede observar a partir de estos perfiles que RIF no perdió peso al ser calentada desde temperatura ambiente hasta 225 °C, después de lo cual se observó una reducción significativa de la masa. En concordancia, el DSC (**Figura 2.4**) no reveló ningún evento hasta el punto de fusión, alcanzándose un máximo de degradación exotérmica a los 252 °C (inicio 248 °C, recuperación 270 °C), que es característico de la forma cristalina I de RIF.

Para CMC, el perfil de TGA mostró una pérdida de peso gradual (5,0%) desde temperatura ambiente hasta 202 °C, resultante de la deshidratación y de un proceso de descomposición, el cual alcanzó un máximo a 262 °C. El DSC de CMC reveló un amplio pico de degradación exotérmica a 247 °C (inicio 228 °C, recuperación 255 °C). La mezcla física CMC+RIF mostró un comportamiento consistente con la suma de ambos componentes.

Los TGA de RIF.2H₂O y la mezcla física CMC+RIF.2H₂O indicaron dos eventos principales. El primer salto de pérdida de peso, con un máximo a 137 °C, estuvo asociado a la liberación de agua de cristalización, la cual correspondía a 2 moles de agua por mol de RIF. La segunda pérdida de peso se debió a la descomposición RIF, con un máximo a 255 °C. En concordancia, sus DSC mostraron un evento endotérmico entre 144 °C y 163 °C, correspondiente a una transición de fase sólido-sólido donde se superpusieron eventos de deshidratación, fusión y recristalización. También se observó un pico de degradación exotérmica a 256 °C (7). RIF.2H₂O y CMC+RIF.2H₂O se sometieron a un ensayo de DSC con doble escaneo, para observar las transiciones en ausencia de la amplia endoterma de evaporación del agua de sorción. Como se observa en la **Figura 2.4**, el agua de cristalización se perdió fácilmente cuando las muestras se calentaron 1 min a 80 °C. De acuerdo con Henwood et al. (7), no se observó fusión para el fármaco anhidro y se observó la pequeña endoterma de transición sólido-sólido a 156 °C (línea discontinua en la **Figura 2.4**).

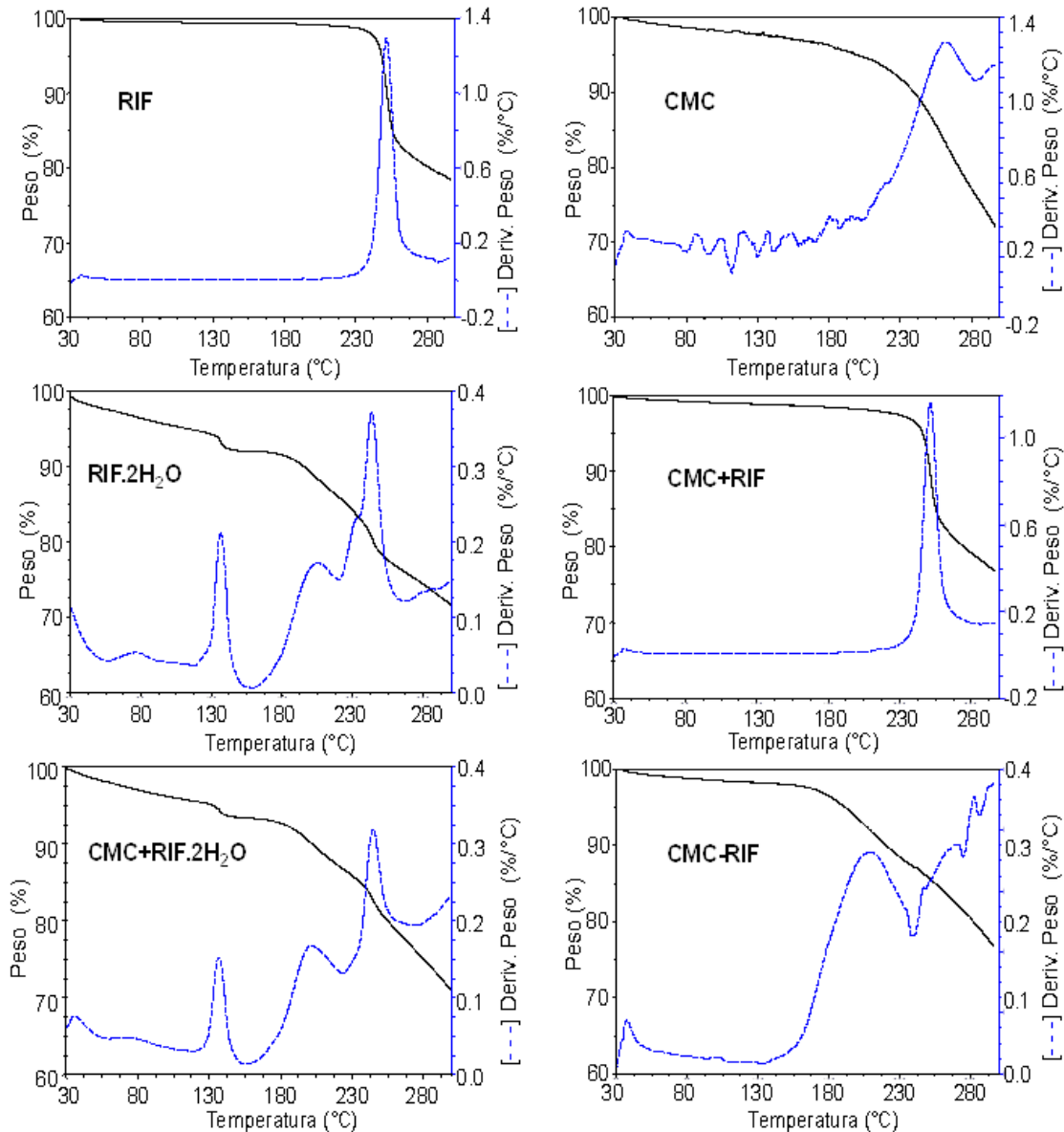


Figura 2.3. Termogramas de TGA (línea continua) y dTGA (línea discontinua) de CMC-RIF, sus precursores y las mezclas físicas CMC+RIF y CMC+RIF.2H₂O.

CMC-RIF, por el contrario, presentó un comportamiento térmico muy diferente de los materiales de partida y mezclas físicas CMC+RIF y CMC+RIF.2H₂O. De acuerdo con el valor de contenido de RIF descrito en la sección 4.2, el perfil de TGA de CMC-RIF mostró una reducción gradual del 2,3% de peso, asignado a la pérdida de agua entre 30-161 °C. Finalmente, una segunda pérdida de peso (con un máximo a 209 °C) se asignó a la descomposición. De manera similar, el DSC de CMC-RIF indicó una endoterma de evaporación casi imperceptible entre 43 y 170 °C y un pico de degradación exotérmica a 256 °C. A diferencia de RIF.2H₂O o la mezcla física CMC+RIF.2H₂O, no se observó fusión ni deshidratación cristalina en CMC-RIF, lo que indica que hubo una interacción entre CMC y RIF.

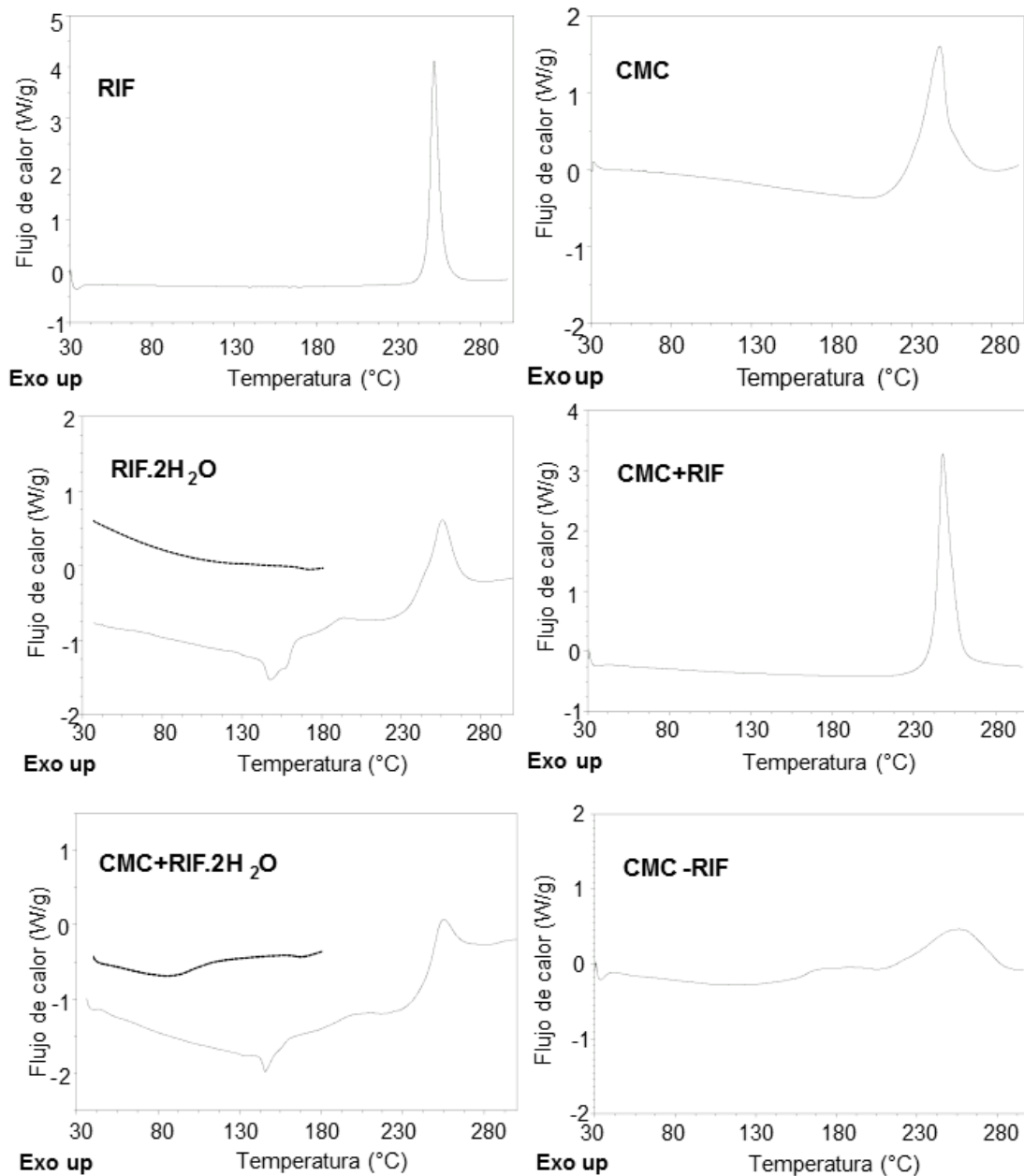


Figura 2.4. Termogramas de DSC de CMC-RIF, sus precursores y las mezclas físicas CMC+RIF y CMC+RIF.2H₂O. Las líneas punteadas en negro en RIF.2H₂O y CMC+RIF.2H₂O muestran el DSC con segundo escaneo de estas muestras.

Estos eventos observados por TGA y DSC fueron confirmados por MPC. De hecho, la deshidratación en RIF.2H₂O y CMC+RIF.2H₂O se evidenció por una liberación intensa de burbujas de vapor de la superficie de los cristales de RIF, acompañada de un cambio morfológico en la forma cristalina que confirmó la transición de fase sólido-sólido previamente observada por DSC a la misma temperatura (15). Contrariamente, CMC-RIF tuvo una liberación

moderada de burbujas de vapor a partir de 52 °C, mostrando un comportamiento similar al observado por DSC y TGA. No se observaron cambios morfológicos ni transiciones de fase. Por último, la descomposición, revelada por oscurecimiento de los sólidos, se observó para todas las muestras a temperaturas similares a las observadas por DSC y TGA.

En la **Figura 2.5** se muestran los espectros de RMN en estado sólido de ^{13}C para RIF, CMC, CMC-RIF y RIF.2H₂O. El espectro de CMC mostró señales amplias. Este hecho, sumado a la baja proporción de CMC en CMC-RIF (sólo $(24,2 \pm 0,1) \%$ p/p), justifican la razón por la cual las señales de CMC no pueden ser claramente observadas en el espectro de CMC-RIF.

La asignación del ^{13}C del espectro de RMN de RIF (**Anexo 2**) confirmó que el fármaco correspondió a la forma cristalina I, ya que se observó una señal única en la región comprendida entre 180-200 ppm, perteneciente al carbonilo en C11, tal como lo informó previamente Agrawal et al. (18).

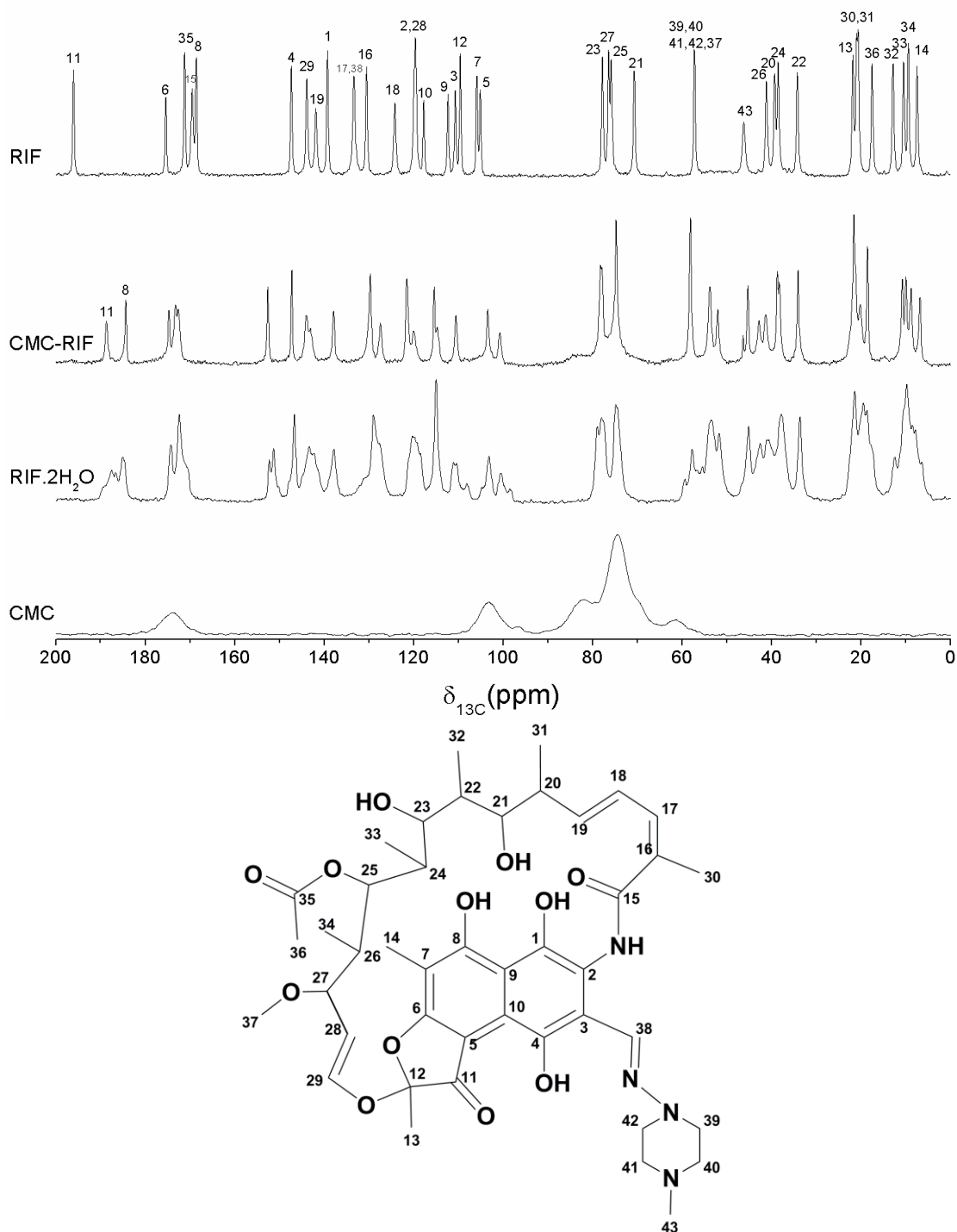


Figura 2.5. A. Espectros de RMN en estado sólido de ^{13}C de RIF, CMC-RIF, RIF.2H₂O y CMC.
B. Estructura molecular numerada de RIF.

El espectro de RMN de ^{13}C de CMC-RIF presentó diferencias mayores en comparación con RIF, ya que las resonancias de C8 (183,8 ppm) y C11 (188,1 ppm) en CMC-RIF se desplazaron a mayores ppm ($\Delta\delta= 15,2$ ppm) y menores ppm ($\Delta\delta= 7,9$ ppm), respectivamente, en relación a RIF. Este comportamiento puede explicarse por un proceso de desprotonación del grupo fenólico OH ácido en C8. La deslocalización de la nube de electrones π conlleva a la pérdida del

doble enlace cetona en C(11)=O, como puede observarse por el desplazamiento de la resonancia de C(11) a campos más bajos. Esta información sugiere que RIF cristaliza como un zwitterion en CMC-RIF. Relacionado con esto, Przybylski et al. (17) informó una forma de RIF anhidra y zwitteriónica, cuyas resonancias fueron desplazadas 15,6 ppm hacia campos ascendentes para el C(8) y 11,3 ppm hacia campos descendentes para C(11) en comparación con la forma cristalina I de RIF.

Puesto que la DRXP de CMC-RIF mostró algunas similitudes con RIF.2H₂O, también se obtuvo su espectro de RMN de ¹³C. Se sabe que RIF.2H₂O cristaliza como un zwitterión (7). En este caso, el espectro de RMN de ¹³C presentó un ensanchamiento de las señales comparadas con CMC-RIF, indicando un menor grado de cristalinidad respecto a CMC-RIF.

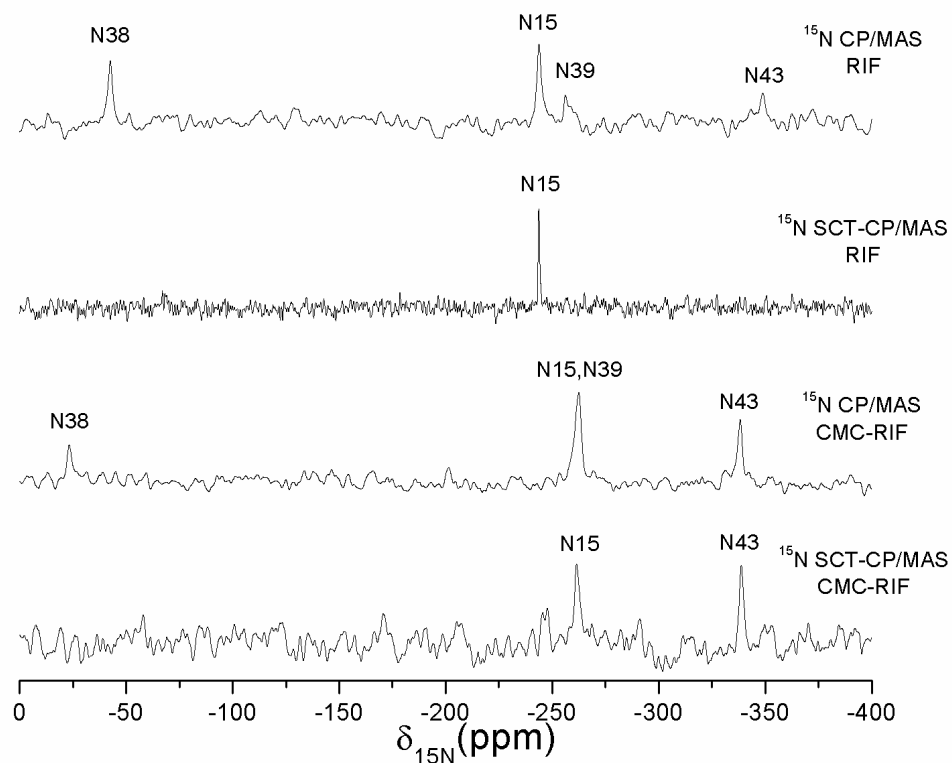


Figura 2.6. Espectros de RMN en estado sólido de ¹⁵N y ¹H-¹⁵N SCT-CP/MAS de RIF y CMC-RIF.

Con el fin de obtener una mejor comprensión de la naturaleza de las interacciones presentes en CMC-RIF, se tomaron los espectros de RMN de ¹⁵N y ¹H-¹⁵N SCT CP/MAS. Los espectros correspondientes a RIF y CMC-RIF se muestran en la **Figura 2.6**, y los desplazamientos químicos se detallan en el **Anexo 3**.

El espectro de RMN de ^{15}N de RIF presentó las señales correspondientes a los cuatro nitrógenos de la molécula, a corrimientos químicos similares a los informados previamente por Przybylski et al. (17) para la forma cristalina I de RIF. Adicionalmente, los desplazamientos químicos observados en el espectro de ^{15}N de CMC-RIF fueron cualitativamente similares a los reportados para la forma zwitteriónica de RIF. Efectivamente, la señal correspondiente al N15 en el espectro CMC-RIF se desplazó a campos más bajos y se superpuso a la señal correspondiente al N39, que también se desplazó ligeramente a ppm menores, respecto a su resonancia en RIF. Además, la resonancia del N38 se desplazó a frecuencias más altas en comparación con la de RIF. Los cambios en N15 y N38 fueron más intensos en CMC-RIF que los informados para la forma zwitteriónica anhidra de RIF ($\Delta\delta$ 13 y 9 ppm, respectivamente). Esto sugiere estos nitrógenos pueden estar involucrados en algunas interacciones con CMC.

El espectro de RMN de ^{15}N de RIF.2H₂O no reveló señales, a pesar de que se obtuvo en las mismas condiciones experimentales. Esto podría relacionarse con el ensanchamiento de las señales observadas previamente en el RMN de ^{13}C , asociadas al menor grado de cristalinidad del sólido.

En el espectro de RMN de ^1H - ^{15}N SCT CP/MAS para RIF (**Figura 2.6**), sólo se observa la señal del N15, ya que es el único nitrógeno unido directamente a un átomo de hidrógeno. Sin embargo, dos señales pertenecientes a N15 y N43 se pueden ver en CMC-RIF, apoyando la hipótesis de que RIF ha cristalizado en forma zwitteriónica en CMC-RIF.

Los espectros de FTIR también mostraron cambios significativos entre RIF, CMC-RIF, RIF.2H₂O y las mezclas físicas (**Figura 2.7 A y B**). Según Agrawal et al. (2004) (18), las bandas de absorción características de la forma I de RIF se encuentran a 3493 cm⁻¹ (ansa O-H), 1725 cm⁻¹ (carbonilo C35=O), 1645 cm⁻¹ (furanona C11=O) y 1565 cm⁻¹ (C=O amida). Adicionalmente se observan bandas de Bohlmann (modo perturbado) a 2801 cm⁻¹, que corresponden a la vibración del enlace C-H del grupo N-CH₃ en RIF (**Figura 2.7A**)(17). La mezcla física CMC+RIF presentó un perfil similar al de RIF .

De acuerdo con su naturaleza zwitteriónica, RIF.2H₂O no presentó bandas de Bohlmann. Además, una banda ancha a 1548 cm⁻¹ atribuida al grupo naftaleno en RIF, presentó un cambio hipsocrómico hacia 1560 cm⁻¹ en RIF.2H₂O, lo cual es consistente con la resonancia del ion fenolato (O(8)) en el anillo de naftaleno (**Figura 2.7B**). En el espectro FTIR de CMC-RIF, las bandas de Bohlmann estuvieron ausentes y las bandas atribuidas al grupo naftaleno se observaron a 1564 cm⁻¹, confirmando así la naturaleza zwitteriónica de RIF en CMC-RIF.

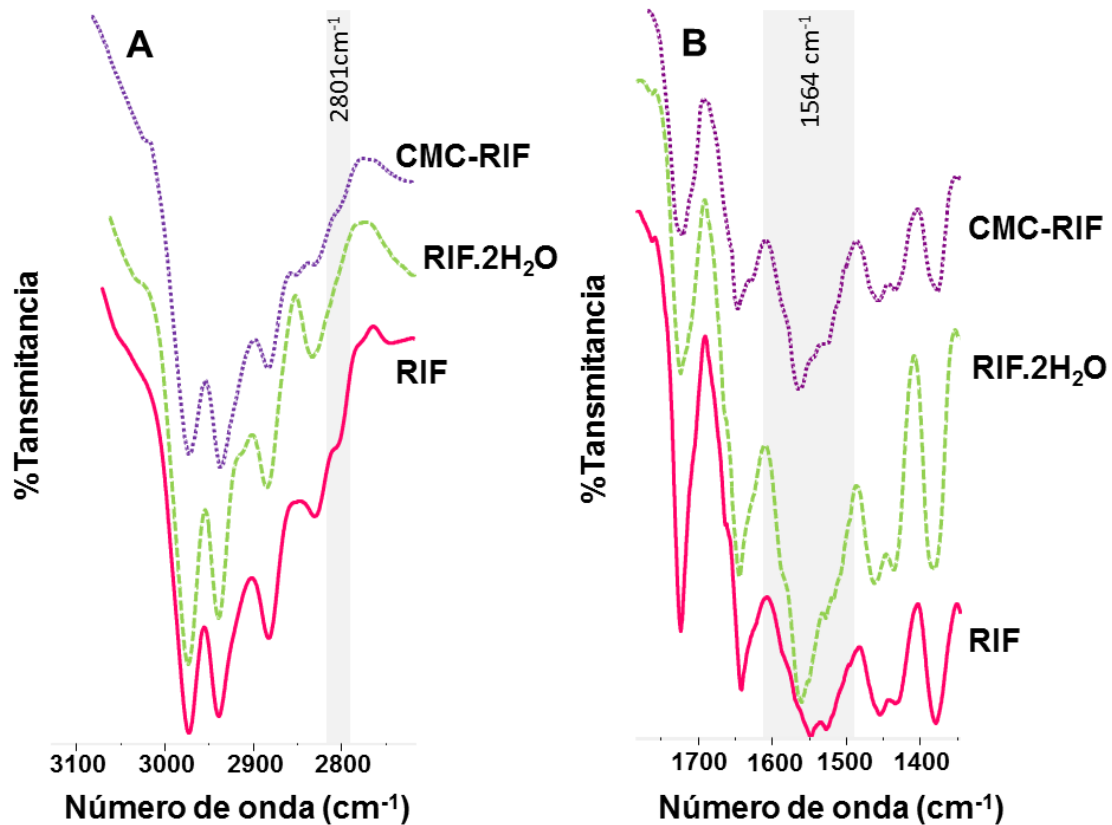


Figura 2.7. Espectros de FTIR representativos de RIF, RIF.2H₂O y CMC-RIF. La naturaleza zwitteriónica de RIF en CMC-RIF se confirma por la ausencia de la banda correspondiente al estiramiento del grupo N-CH₃ no protonado (2801 cm⁻¹) y el desplazamiento hipsocrómico de la banda atribuido al grupo naftaleno a 1564 cm⁻¹.

2.4.4. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE CMC-RIF

La **Tabla 2.3** muestra las propiedades reológicas de RIF y CMC-RIF. Como puede observarse, CMC-RIF presentó propiedades de flujo significativamente mejoradas respecto a las de RIF, que son adecuadas para la producción de comprimidos o cápsulas. De hecho, según las puntuaciones de la Farmacopea Europea, el ángulo de reposo en CMC-RIF pasó de pobre a excelente, el CH y el IC cambiaron de pobres a regular y bueno, respectivamente.

Tabla 2.3. propiedades reológicas de RIF y CMC-RIF

Muestra	Angulo de reposo (°)	DG (g/mL)	DE (g/mL)	IC	CH
RIF	48 ± 3	0,51 ± 0,01	0,69 ± 0,01	26,0 ± 0,5	1,35 ± 0,01
CMC-RIF	22 ± 1	0,36 ± 0,01	0,44 ± 0,01	21 ± 2	1,20 ± 0,04

2.4.5. CAPTACIÓN DE AGUA

La hidrofiliidad de los sólidos, determinada por su capacidad de sorción de agua, se evaluó utilizando el aparato de Enslin, el cual permite medir el volumen de líquido retenido por capilaridad, a intervalos de tiempo preestablecidos. La **Figura 2.8** muestra la sorción de agua de los sólidos (mL/g de sólido) a temperatura ambiente en función del tiempo (min). La captación de agua en CMC fue muy rápida, alcanzando una meseta tras la incorporación del 150% de su peso inicial en agua en menos de un minuto. Como era de esperar, RIF sorbió una cantidad casi imperceptible de agua, mientras que en el caso del CMC-RIF, la meseta se alcanzó 10 minutos después de la incorporación del 100% de su peso inicial en agua, mejorando así la hidrofiliidad de RIF. De manera similar, la mezcla física CMC+RIF incorporó el 90% de su peso en agua después de 3 minutos. No se observó evidencia del desarrollo de una capa de hidrogel que pudiera retrasar la liberación del fármaco en ningún caso, lo que es deseable para la liberación rápida de RIF.

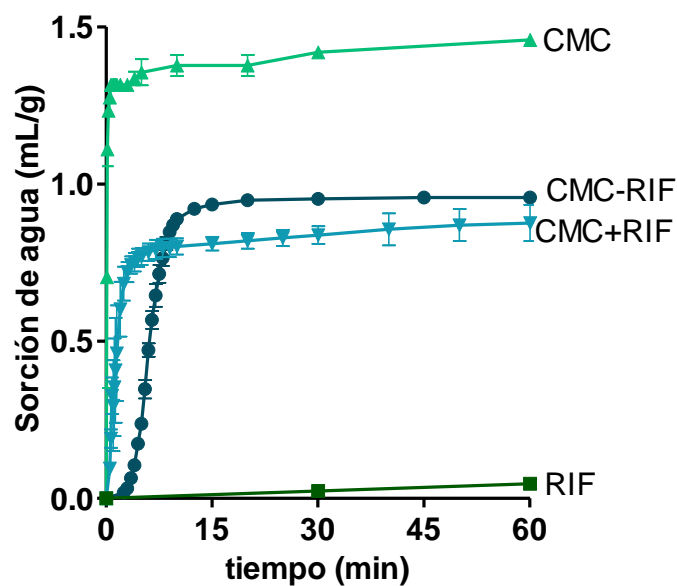


Figura 2.8. Captación de agua (mL) por gramo de sólido en discos de CMC-RIF, RIF, CMC y la mezcla física CMC+RIF en función del tiempo. La cantidad de CMC es la misma en todos los sistemas. El contenido de CMC en CMC-RIF mejora significativamente la hidrofiliidad de RIF.

2.4.6. LIBERACION DE RIF DESDE CMC-RIF

La matriz de CMC-RIF se disgregó instantánea y completamente en medio ácido, dando como resultado una liberación muy rápida de RIF (99 % a los 15 min; **Figura 2.9A**). Los perfiles de

disolución de dos formulaciones de RIF comercialmente disponibles (formulaciones 1 y 2) también se muestran en la **Figura 2.9A**. Como puede observarse, la ED de RIF fue significativamente mayor en las matrices de CMC-RIF, en comparación con las formulaciones comerciales (**Figura 2.9B**, $p < 0,05$).

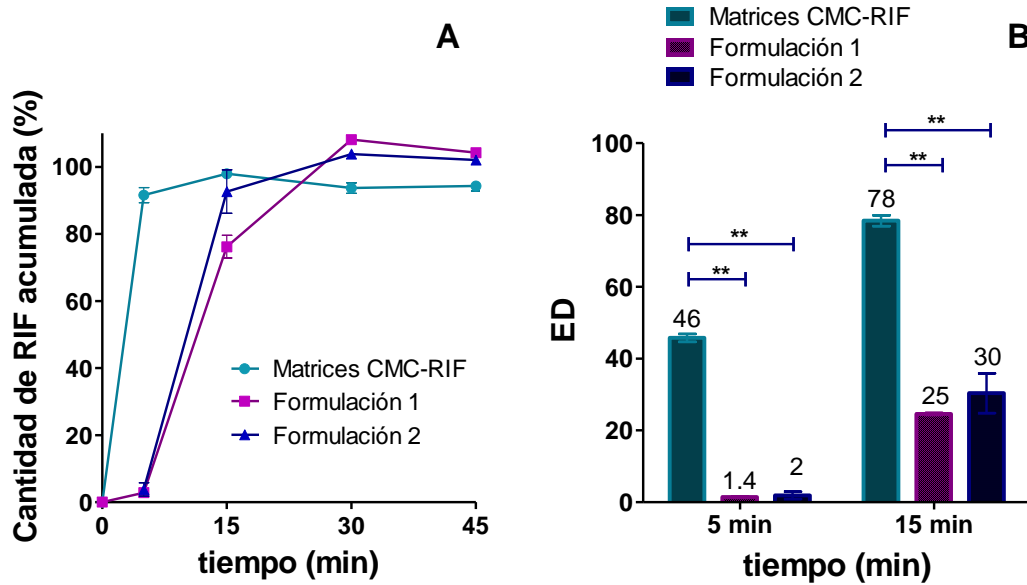


Figura 2.9. A. Perfil de liberación de RIF en HCl 0,1M a partir de matrices CMC-RIF, Formulación 1 y Formulación 2. B. Eficiencia de disolución (ED) a 5 y 15 minutos en HCl 0,1M. Los resultados se expresan como media \pm EE.

2.5. DISCUSIÓN

Usualmente, los complejos PE-fármaco se obtienen mezclando un PE con un fármaco de carga opuesta en un medio adecuado (agua o etanol), capaz de disolver uno o ambos componentes (10,22). Los materiales sólidos resultantes son dispersiones moleculares amorfas del fármaco unido iónicamente al portador polimérico. Contrariamente, CMC-RIF es un material cristalino con picos agudos observados por DRXP. En consecuencia, no se pudo demostrar la interacción iónica entre los grupos ácidos de CMC y los grupos amino de RIF en CMC-RIF, en el cual las partículas de CMC están cubiertas por RIF zwitteriónica. Por lo tanto, CMC-RIF es una dispersión sólida cristalina, ya que los cristales RIF coexisten con partículas CMC. Los perfiles DRXP de CMC-RIF_{0,8} y CMC-RIF_{0,6} presentaron picos agudos en los mismos ángulos que CMC-RIF, lo que sugiere que tales dispersiones cristalinas pueden obtenerse usando otras relaciones CMC: RIF (**Anexo 4**). Teniendo en cuenta que CMC-RIF permite una mayor capacidad de carga de RIF, éste fue seleccionado para continuar los estudios.

CMC se seleccionó como portador, ya que los complejos con CMC han mostrado previamente una liberación muy rápida de algunos fármacos básicos en medio ácido (10). La CMC ácida es insoluble en agua así como también en otros disolventes farmacéuticos. RIF es insoluble e inestable en agua, pero es ligeramente soluble en etanol (USP 39), el cual se seleccionó como medio de interacción. A diferencia de los complejos PE-fármaco convencionales, sólo una fracción de RIF se disolvió en etanol durante la preparación de CMC-RIF.

La caracterización exhaustiva, utilizando espectros de RMN de ^{13}C y ^{15}N y FTIR, confirmó la ausencia de interacción iónica entre RIF y CMC. Sin embargo, las diferencias observadas en el análisis térmico indicaron que posiblemente se han producido otras interacciones no covalentes, tales como del tipo puente hidrógeno o hidrofóbicas. A partir de los espectros de RMN de ^{13}C y ^{15}N , se puede concluir que, en CMC-RIF, RIF cristaliza en una forma zwitteriónica que interactúa con la superficie de las partículas de CMC. Esto fue confirmado por el RMN de ^1H - ^{15}N SCT CP/MAS y los espectros FTIR refuerzan estos resultados. Cabe señalar que la forma I de RIF, que se usó como material de partida, se transformó completamente en cristales zwitteriónicos altamente ordenados, que fue la única fase cristalina presente en CMC-RIF.

Es conocido que, en disolventes próticos (como el etanol), el protón del grupo fenólico en O8 se transfiere al átomo de N43 para formar la especie zwitteriónica, que prevalece en solución (24). En la preparación de CMC-RIF, la reorganización cristalina pudo vincularse a la existencia de una interacción tipo puente de hidrógeno entre la fracción disuelta de RIF y los grupos de ácido carboxílico en la superficie de las partículas de CMC, que conllevó a una orientación preferencial de moléculas zwitteriónicas de RIF y favoreció la formación del núcleo de RIF zwitteriónico en partículas CMC. Adicionalmente, las moléculas de RIF remanentes pudieron haber cristalizado como un zwitterion cuando se evaporó el etanol utilizado en la preparación de CMC-RIF (**Figura 2.10**). La inducción de orientaciones preferenciales de sólidos cristalinos en presencia de polímeros se ha descrito previamente (25,26). Aunque no se puede descartar una interacción ácido-base entre los grupos ácido carboxílico en la superficie de CMC y los grupos amino de moléculas RIF no zwitteriónicas en solución, esto no da lugar a la formación de núcleos cristalinos, ya que RIF zwitterionica es la única fase cristalina presente en el sólido.

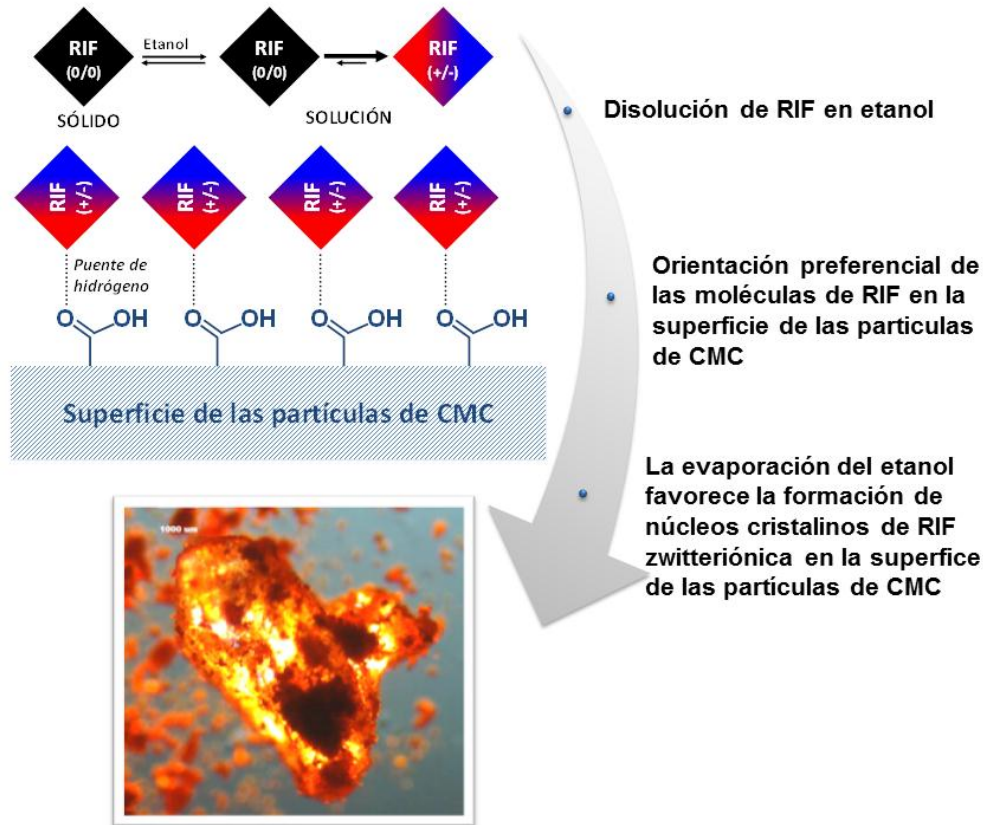


Figura 2.10. Mecanismo propuesto para la formación de la dispersión sólida cristalina de CMC-RIF.

Cabe destacar que la interacción entre RIF y CMC ocurriría sólo en la superficie de CMC y por lo tanto, la relación de equivalentes carboxílicos en CMC: grupos amina de RIF no es un aspecto importante. De hecho, la DRXP de CMC-RIF_{0,8} y CMC-RIF_{0,6} mostraron el mismo perfil cristalino que CMC-RIF. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis, para la cual se debieran utilizar proporciones de RIF y CMC diferentes de las utilizadas en nuestro estudio.

Es ampliamente conocido que RIF es hidrofóbica (7), lo que podría afectar seriamente los procesos de disolución. Se pudo observar una diferencia notable en la captación de agua de CMC-RIF en comparación con RIF pura. Este comportamiento estaría adjudicado a que los cristales de RIF unidos a la superficie de CMC forman un único material particulado, donde la alta capacidad de hidratación de CMC mejoró la humectabilidad de RIF. Un sistema de este tipo es similar a las dispersiones sólidas obtenidas por una metodología de unión superficial, en la que un vehículo hidrofílico se une al fármaco, aumentando así su humectabilidad (27–29). De hecho, Ramírez Rigo, et al. (10) informaron que, en matrices que contienen CMC, el agua difunde rápidamente a través de los poros de la matriz y la moja completamente. La

captación de agua en CMC-RIF fue mayor que la de la mezcla física. Esta diferencia puede estar relacionada con la cristalización del RIF como un zwitterión, lo que contribuyó a la hidrofiliidad del sistema. Además, la velocidad de captación más lenta observada en CMC-RIF durante los primeros 5 minutos está probablemente asociada con el hecho de que CMC estaría cubierta por cristales de RIF (componente principal), que puede ocluir parcialmente algunos de los poros de la matriz y por lo tanto producir un retraso en la entrada del agua.

Las matrices CMC-RIF liberaron RIF con muy rápida velocidad de disolución, siendo la velocidad de liberación y ED de RIF significativamente superiores a las observadas para las formulaciones comerciales evaluadas. Tal comportamiento puede relacionarse tanto a la alta capacidad de hidratación de CMC como a la forma zwitteriónica de RIF. Como se informó anteriormente, la especie zwitteriónica de un fármaco es más hidrófila y también más soluble que su homólogo no zwitteriónico (30).

La capacidad de CMC-RIF de liberar RIF de manera muy rápida facilita la disposición de una mayor cantidad de RIF en el sitio de absorción, lo cual es altamente deseable para mejorar la biodisponibilidad de RIF (31). Adicionalmente, la liberación completa de RIF está garantizada, ya que la interacción entre RIF y CMC es reversible. Esto es importante, en vista de que existen reportes de algunas formulaciones comerciales que liberaron sólo el 80% de la dosis declarada de RIF en 45 min, debido a su interacción con algunos excipientes ácidos.

El hecho de que RIF presente una solubilidad dependiente del pH, conlleva a la necesidad de disolver su dosis completamente a pHs menores a 3. En consecuencia, la disolución de RIF dependerá de la acidez del estómago. En situaciones en las que el pH del estómago aumenta (efectos de los alimentos, coadministración de los inhibidores de la bomba de protones, enfermedad, edad) se observará un impacto negativo en su tasa de disolución y biodisponibilidad, de manera impredecible e incontrolada (32). En este contexto, la disolución muy rápida observada con CMC-RIF podría ayudar a reducir el impacto de tales factores proporcionando un corto tiempo de residencia en el estómago. Adicionalmente, la inestabilidad de RIF en medio ácido puede verse reducida al ser rápidamente absorbida por la mucosa gástrica (2).

Varios autores han reportado sistemas para mejorar el desempeño de las formulaciones de RIF (33–37). Sin embargo, sólo algunos aumentaron la velocidad de disolución de RIF y de éstos, ninguno la optimizó tanto como las matrices CMC-RIF. Por ejemplo, Yadav et al. (38) obtuvieron gránulos de RIF usando polietilenglicol y poloxamer como aglutinantes, lo que

mejoró la velocidad de disolución de RIF hasta un 80% en 15 min en HCl 0,1 M. En otro estudio, Schianti et al. (39) obtuvieron nanopartículas de RIF que incrementaron de un 60 a un 80% la liberación de RIF con respecto al fármaco puro, cuando se disolvieron los polvos en una solución reguladora de pH 7,4, durante 45 min.

CMC-RIF, al igual que otros materiales coprocesados, es una mezcla homogénea que no se segregaría como las mezclas convencionales. En las mezcla físicas elaboradas, las diferencias de tamaño de partícula y de densidad de los polvos de CMC y RIF, puede hacer que los sólidos se segreguen en los procedimientos de formulación convencionales. Por ejemplo, en el proceso de compresión, se podrían formar comprimidos con más o menos proporción de CMC y por lo tanto estos serán más o menos hidrofílicos. Esta variabilidad no sería deseable para asegurar la adecuada disolución de RIF. Por lo tanto, se deberían aplicar otras estrategias farmacotécnicas para mejorar la homogeneidad, tal como el agregado de altas proporciones de excipientes.

CMC-RIF presenta propiedades de flujo mejoradas y puede ser utilizado para la obtención de comprimidos por compresión directa, con el sólo agregado de pequeñas proporciones de excipientes (lubricantes, ligantes). Por lo tanto, la formulación de comprimidos a partir de CMC-RIF puede ser un método de producción simple, económico y versátil. Además, CMC-RIF puede ser útil para desarrollar sistemas orales en CDF de administración segregada de RIF e ISO.

En vista de que la tuberculosis es una enfermedad fuertemente asociada a la pobreza, existe una alta incidencia en los países subdesarrollados y en desarrollo. Por lo tanto, es esencial que los sistemas desarrollados tengan una relación costo-beneficio aceptable para que el producto esté disponible para los sistemas de salud pública de estos países (40). Respecto a esto, cabe destacar que CMC está incluida en varias farmacopeas (Farmacopea Argentina (41), Farmacopea Japonesa (42)) y su sal sódica es catalogada por la FDA como un compuesto Reconocido Generalmente como Seguro (más conocido por su término en inglés *Generally Recognized as Safe, GRAS*) (43).

2.6. CONCLUSIONES

CMC-RIF es una dispersión sólida cristalina que puede ser preparada utilizando componentes y metodologías accesibles a los sistemas de salud de las comunidades con recursos limitados. Las relaciones estructura-propiedad que subyacen a su comportamiento de muy rápida disolución han sido exploradas y los resultados muestran que CMC-RIF es un nuevo material

que puede ser útil para la formulación de formas farmacéuticas sólidas, ya sea sola o en combinación con otros fármacos antituberculosos. Este desarrollo podría ser un paso interesante para abordar la problemática de la biodisponibilidad inaceptable de RIF.

2.7. REFERENCIAS

1. Panchagnula R, Gulati I, Varma MVS, Ashok Raj Y. Dissolution Methodology for Evaluation of Rifampicin-Containing Fixed-Dose Combinations Using Biopharmaceutic Classification System Based Approach. *Clin Res Regul Aff* [Internet]. 2007;24(2–4):61–76. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10601330701683305>
2. Mariappan TT, 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.
3. Becker C, Dressman JB, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Rifampicin. *J Pharm Sci*. 2009;98(7):2252–67.
4. Elard G a, Fourie PB. Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 1999;3(11 Suppl 3):S301-8-21. Available from: <http://pubget.com/paper/10593709/rifampicin-bioavailability-a-review-of-its-pharmacology-and-the-chemotherapeutic-necessity-for-ensuring-optimal-absorption%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593709>
5. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1980;121(6):939–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6774638>
6. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993;341(8846):647–50.
7. Henwood SQ, Liebenberg W, Tiedt LR, Villiers MM De. Characterization of the Solubility and Dissolution Properties of Several New Rifampicin Polymorphs, Solvates and Hydrates. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2001;27(10):1017–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1081/DDC-100108364>
8. Pandey R, Ahmad Z. Nanomedicine and experimental tuberculosis: Facts, flaws, and future. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;7(3):259–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2011.01.009>
9. Ramírez Rigo M, Allemandi D, Manzo R. A Linear Free Energy Relationship Treatment of the Affinity between Carboxymethylcellulose and Basic Drugs. *Mol Pharm*. 2004;1(5):383–6.
10. Ramírez Rigo M, Allemandi D, Manzo R. Swellable drug-polyelectrolyte matrices of drug-carboxymethylcellulose complexes. Characterization and delivery properties. *Drug Deliv*. 2009;16(2):108–15.
11. United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia, The National Formulary [USP 39 NF 34]*. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2016.
12. Son YJ, McConville JT. A new respirable form of rifampicin. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;78(3):366–76. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2011.02.004>

13. Lynch JM, Barbano DM. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *J AOAC Int* [Internet]. 1999;82(6):1389–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10589493>
14. Sankar R, Sharda N, Singh S. Behavior of Decomposition of Rifampicin in the Presence of Isoniazid in the pH Range 1–3. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2003;29(7):733. Available from: <http://ezproxy.lib.vt.edu:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=bth&AN=10223024&site=ehost-live&scope=site>
15. Chadha R, Arora P, Bhandari S, Bala M. Thermomicroscopy and its pharmaceuticals applications. *Curr Microsc Contrib to Adv Sci Technol*. 2012;1013–24.
16. Fung BM, Khitrin AK, Ermolaev K. An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids. *J Magn Reson* [Internet]. 2000;142(1):97–101. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090780799918967>
17. Przybylski P, Pyta K, Klich K, Schilf W, Kamieński B. ¹³C and ¹⁵N CP/MAS, ¹H-¹⁵N SCT CP/MAS and FTIR spectroscopy as tools for qualitative detection of the presence of zwitterionic and nonionic forms of ansa-macrolide 3-formylrifamycin SV and its derivatives in solid state+. *Magn Reson Chem*. 2014;52(1–2):10–21.
18. Agrawal S, Ashokraj Y, Bharatam PV, Pillai O, Panchagnula R. Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *Eur J Pharm Sci*. 2004;22(2–3):127–44.
19. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, Council of Europe. *European Pharmacopoeia*. 8th ed. 7 allée Kastner, CS 30026.; 2013.
20. Nogami H, Nagai T, Fukuoka E, Sonobe T. Desintegration of the aspirin tablets containing potato starch and microcrystalline cellulose in various concentrations. *Chem Pharm Bull*. 1969;17:1450–5.
21. Ramírez-Rigo M V., Olivera ME, Rubio M, Manzo RH. Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100. *Eur J Pharm Sci*. 2014;55(1):1–11.
22. Guzmán ML, Manzo RH, Olivera ME. Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine. *Mol Pharm*. 2012;9(9):2424–33.
23. Bermúdez JM, Jimenez-Kairuz AF, Olivera ME, Allemanni D a, Manzo RH. A ciprofloxacin extended release tablet based on swellable drug polyelectrolyte matrices. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(3):924–30.
24. Pyta K, Przybylski P, Wicher B, Gdanieca M, Stefańska J. Intramolecular proton transfer impact on antibacterial properties of ansamycin antibiotic rifampicin and its new amino analogues †. *Org Biomol Chem*. 2012;10:2385–8.
25. Curcio E, López-Mejías V, Di Profio G, Fontananova E, Drioli E, Trout BL, et al. Regulating nucleation kinetics through molecular interactions at the polymer-solute interface. *Cryst Growth Des*. 2014;14(2):678–86.
26. Pfund LY, Price CP, Frick JJ, Matzger AJ. Controlling pharmaceutical crystallization with

- designed polymeric heteronuclei. *J Am Chem Soc.* 2015;137(2):871–5.
27. Joe JH, Lee WM, Park YJ, Joe KH, Oh DH, Seo YG, et al. Effect of the solid-dispersion method on the solubility and crystalline property of tacrolimus. *Int J Pharm.* 2010;395(1–2):161–6.
 28. Park YJ, Ryu DS, Li DX, Quan QZ, Oh DH, Kim JO, et al. Physicochemical characterization of tacrolimus-loaded solid dispersion with sodium carboxymethyl cellulose and sodium lauryl sulfate. *Arch Pharm Res.* 2009;32(6):893–8.
 29. Yan Y, Sung J, Kim K, Kim D, Kim J, Lee B, et al. Novel valsartan-loaded solid dispersion with enhanced bioavailability and no crystalline changes. *Int J Pharm.* 2012;422:202–10.
 30. Olivera ME, Ramírez Rigo MV, Chattah AK, Levstein PR, Baschini M, Manzo RH. Solution and solid state properties of a set of procaine and procainamide derivatives. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18(5):337–48.
 31. Agrawal S, Panchagnula R. Dissolution test as a surrogate for quality evaluation of rifampicin containing fixed dose combination formulations. *Int J Pharm.* 2004;287(1–2):97–112.
 32. Elsevier. Rifampin [Internet]. *Clinical Pharmacology.* 2016 [cited 2016 Jul 22]. p. 40. Available from: <http://www.clinicalpharmacology.com/Forms/Monograph/monograph.aspx?cpnum=545&sec=monindi&t=0>
 33. Wang Y, Liu H, Liu K, Sun J, He Z. Design and evaluation of enteric-coated tablets for rifampicin and isoniazid combinations. *Pharm Dev Technol [Internet].* 2013;18(2):401–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339279>
 34. Gohel MC, Sarvaiya KG. A novel dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *AAPS PharmSciTech.* 2007;44(1):22–7.
 35. Singh C, Bhatt TD, Gill MS, Suresh S. Novel rifampicin-phospholipid complex for tubercular therapy: Synthesis, physicochemical characterization and in-vivo evaluation. *Int J Pharm [Internet]. Elsevier B.V.;* 2014;460(1–2):220–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.10.043>
 36. Prabakaran D, Singh P, Jaganathan KS, Vyas SP. Osmotically regulated asymmetric capsular systems for simultaneous sustained delivery of anti-tubercular drugs. *J Control Release.* 2004;95(2):239–48.
 37. Pund S, Joshi A, Vasu K, Nivsarkar M, Shishoo C. Gastroretentive delivery of rifampicin: In vitro mucoadhesion and in vivo gamma scintigraphy. *Int J Pharm [Internet]. Elsevier B.V.;* 2011;411(1–2):106–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.048>
 38. Yadav V, Nigute A, Yadav A, Bhise S. Enhancement of solubility and dissolution rate of Rifampicin by melt granulation technique. *J Pharm Res.* 2009;2(2):230–5.
 39. Schianti JN, Cerize NNP, de Oliveira AM, Derenzo S, Seabra AC, Góngora-Rubio MR. Rifampicin Nanoprecipitation using Flow Focusing Microfluidic Device. *J Nanomed Nanotechnol [Internet].* 2013;4(4):4–9. Available from: <http://www.omicsonline.org/rifampicin-nanoprecipitation-using-flow-focusing-microfluidic-device-2157-7439-4-172.php?aid=16575>

40. Goldberg A. Sociocultural factors in the health care process of patients with tuberculosis, of Vaccarezza Institute of Muñiz Hospital, 2009. *Rev Argentina Salud Pública*. 2010;1(5):13–21.
41. Ministerio de Salud, Secretaría de Políticas Regulación e Institutos, Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, Instituto Nacional de Medicamentos. *Farmacopea Argentina* [Internet]. 7th ed. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, editor. Farmacopea Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; 2003. Available from: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna_pdfs.asp
42. Society of Japanese Pharmacopoeia. *The Japanese Pharmacopoeia*. Tokyo: Yakuji Nippo; 1996.
43. U.S. Government Publishing Office. *Electronic Code of Federal Regulations: PART 182—SUBSTANCES GENERALLY RECOGNIZED AS SAFE* [Internet]. 2016 [cited 2016 Mar 31]. Available from: <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?c=ecfr&sid=3efaad1b0a259d4e48f1150a34d1aa77&rgn=div5&view=text&node=14:2.0.1.3.10&idno=14#14:2.0.1.3.10.3.7.6>

CAPÍTULO 3

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES PORTADORES DE ISONIACIDA-ACIDO ALGÍNICO

3.1. INTRODUCCIÓN

RIF e ISO son administradas en CDF principalmente para favorecer la adherencia al tratamiento y reducir el riesgo de desarrollo de resistencia microbiana. En las formulaciones comercialmente disponibles, ambos fármacos se liberan de manera inmediata y concomitante. En estas condiciones, la degradación ácida de RIF está acelerada por la presencia de ISO, en una magnitud proporcional a su concentración.

Con el propósito de optimizar la farmacoterapia de la tuberculosis, se plantea el desarrollo de una formulación en CDF de RIF e ISO de liberación sitio-específica y segregada, que mejore la estabilidad y la biodisponibilidad de RIF.

En la etapa anterior se desarrollaron las matrices CMC-RIF, capaces de liberar RIF con muy rápida velocidad de disolución. En esta etapa se plantea la necesidad de generar una formulación de ISO de liberación modificada para combinar con el sistema CMC-RIF, ya sea en forma de comprimidos bicapa, comprimidos con cubierta compactada u otros sistemas multiunitarios. De esta manera, se pretende minimizar la exposición concomitante de ambos fármacos.

ISO es un fármaco con buena solubilidad acuosa pero los datos sobre su absorción oral y su permeabilidad no son concluyentes, por lo que este fármaco está clasificado como clase I/III *borderline*, según el SCB (1).

En estudios en ratas, se ha reportado que ISO es poco permeable en el estómago y que su principal sitio de absorción se encuentra en el intestino (2). En función del sitio de mayor permeabilidad gastrointestinal, la formulación de un sistema de ISO de liberación sostenida, con mayor liberación del fármaco en intestino, sería una estrategia adecuada.

Ácido Algínico (AA) es un polielectrolito (PE) aniónico capaz de asociarse con fármacos con grupos básicos o zwitteriónicos, formando complejos PE-fármaco. En nuestro grupo de investigación existe amplia experiencia en el desarrollo y evaluación de las propiedades de relevancia farmacotécnica y biofarmacéutica de estos complejos, tanto en forma de dispersiones y como productos sólidos (3–5).

Los productos sólidos con AA son, generalmente, complejos iónicos amorfos estables, los cuales pueden ser fácilmente manipulados mediante operaciones farmacotécnicas convencionales. Las matrices obtenidas mediante compactación directa de los polvos presentan perfiles de liberación modificada, adecuados para la vía oral (3).

Las matrices de AA o alginato de sodio (AANa) generan sistemas que modulan la liberación de fármacos mediante la formación de una capa hidrogel, que presenta una solubilidad dependiente del pH. La presencia de grupos carboxílicos y carboxilatos en AA y AANa, respectivamente, pueden aceptar o liberar protones ante el cambio de pH del medio, lo que conlleva a la formación de una capa más o menos rígida. Así, en medio ácido AANa se convierte a AA, el cual tiene menor solubilidad. Esta capa insoluble reduce la liberación de fármacos a pHs ácidos y también modula la liberación en el medio intestinal, ya que el AA formado demora un tiempo en convertirse en AANa (6). La capa hidrogel que forma el AANa, más soluble, libera los fármacos con mayor velocidad.

Los fármacos se liberan desde las matrices de AA o AANa con una cinética de orden cero. Esta cinética se explica sobre la base de que, en contacto con el medio de disolución, ocurre un equilibrio entre la expansión y la erosión de la capa de hidrogel, lo que da como resultado un área superficial casi constante de la matriz (3). Sin embargo se ha descrito que, el gel insoluble de AA puede generar problemas de laminación o *cracking* en las matrices, lo que puede comprometer la integridad de la barrera de difusión de fármacos y dar como resultado la pérdida de liberación controlada del fármaco desde las matrices (6).

3.1.1. OBJETIVOS

El objetivo del trabajo fue obtener un material portador de ISO por asociación con AA, que permita minimizar su disolución en medio ácido y que sea capaz de liberarla de forma completa y sostenida en fluidos intestinales. Se busca que este sistema sea potencialmente útil en el desarrollo de formulaciones sólidas en CDF junto con RIF.

3.2. MATERIALES

Se utilizaron KBr y los medios de disolución descritos en el capítulo 2.

ISO, grado farmacéutico, fue adquirida en Parafarm®-Argentina. AA (calidad pro-análisis) y alginato de sodio (AANA; calidad USP-NF) fueron adquiridos en Sigma®-Argentina e ISP®-Reino Unido, respectivamente.

Los equivalentes de grupos carboxílicos por gramo de AA se determinaron mediante titulación potenciométrica ácido-base tal como lo describe Ramirez-Rigo et al. (3), para lo cual se disolvieron 50,0 mg de AA en 40 mL de agua destilada. El sistema se tituló con NaOH 0,0500 M hasta el punto equivalente. Los equivalentes de grupos carboxílicos por gramo de AA fueron $(4,47 \pm 0,03) \times 10^{-3}$. Este ensayo se realizó por triplicado.

Los demás reactivos fueron de calidad farmacéutica o analítica y se utilizaron tal como se recibieron.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. PREPARACIÓN DE COMPLEJOS AA-ISO

A los fines de seleccionar un método de preparación adecuado de complejos de AA con ISO, se realizaron estudios preliminares utilizando proporciones variables de agua y etanol e incorporando sodio como contraión. Estas condiciones se tuvieron en cuenta, ya que ISO es poco soluble en etanol.

Se obtuvieron complejos AA-ISO_x por mezclado en un mortero de 380,0 mg de ISO y 620,0 mg de AA, y la adición de 2 mL de etanol (AA-ISO_x)_{et} o agua (AA-ISO_x)_{agua}. El sufijo X representa la neutralización con ISO del 80 o 100% de los grupos de AA capaces de interactuar iónicamente. A continuación, la masa se extruyó utilizando un tamiz con tamaño de poro de 600 μm (ASTM, Zonytest, Argentina) para obtener gránulos que se secaron hasta peso constante en un horno a 40 °C.

Los complejos AA-ISO_x-Na₂₅ se obtuvieron mediante un procedimiento similar después de una neutralización inicial del 25% de los grupos carboxílicos de AA con NaOH 1M, para lo cual se añadió 1,1 mL de esta solución a 1,00 g de AA. A este sólido, se añadió 1,9 mL de una solución hidroalcolica de ISO (proporción de etanol: agua 70:30), cuya concentración fue 24,3, 19,5 o 14,6 % p/v. Estas soluciones contuvieron una cantidad de ISO, tal que se neutralizaran el 45, 60

o 75% de los grupos de AA capaces de interactuar iónicamente. La cantidad de medio de dispersión incorporada fue de 3 mL/g de sólido. De la misma manera que para los complejos $(AA-ISO_x)_{et}$ y $(AA-ISO_x)_{agua}$, los gránulos se obtuvieron por tamizado a través de una malla de 600 μm y posterior secado a 40 °C hasta peso constante. Los complejos $AA-ISO_x-Na_{25}$ contienen un 25% p/p adicional de AA, en forma de AANA, respecto a los complejos $AA-ISO_x$.

A los fines comparativos, se preparó una mezcla física (AA+ISO), mediante la interposición y mezcla de AA e ISO en una proporción equivalente a $(AA-ISO_{100})_{et}$ o $(AA-ISO_{100})_{agua}$.

3.3.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ISO EN LOS COMPLEJOS

Para valorar el contenido de ISO en los productos sólidos se pesaron con exactitud 30,0 mg de complejo, previamente secado a peso constante en desecador con vacío, que se llevaron a un matraz de 50 mL y se enrasó con agua destilada. Luego de la formación de una dispersión homogénea y translúcida, se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó hasta 10 mL con agua destilada. ISO se cuantificó por espectroscopía UV-Visible en un espectrofotómetro UV-Vis Evolution 300, a 261 nm, contra curva de calibración de ISO en el mismo medio de disolución ($E = 4123,1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). El ensayo se realizó por duplicado.

3.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS $AA-ISO_x$ Y $AA-ISO_x-Na_{25}$ EN ESTADO SÓLIDO

A los fines de determinar la interacción iónica entre AA e ISO, la serie de productos $AA-ISO_x$ y $AA-ISO_x-Na_{25}$, los materiales de partida y la mezcla física se caracterizaron por microscopía de luz polarizada, DRXP, FTIR, análisis térmico, utilizando las condiciones experimentales descritas en el Capítulo 2 (secciones 2.3.4.1; 2.3.4.2; 2.3.4.3 y 2.3.4.5). En esta etapa se seleccionó el producto que haya demostrado acomplejamiento iónico y mayor capacidad de carga, ya que este material sería potencialmente útil para combinar con CMC-RIF en un sistema multiunitario.

3.3.4. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LOS GRÁNULOS DE $AA-ISO_{75-Na_{25}}$

Las propiedades de flujo del complejo seleccionado en la etapa anterior fueron caracterizadas usando el método descrito en la Farmacopea Europea (Sección 2.9.15-16). Los parámetros determinados se detallan en el capítulo 2, sección 3.5.

3.3.5. EVALUACIÓN DE CAPTACIÓN DE AGUA

La sorción de agua por parte de AA-ISO₇₅-Na₂₅ se evaluó con la metodología descrita en el Capítulo 2, sección 3.6. A los fines comparativos, se evaluaron ISO y la mezcla física AA+ISO. Las cantidades de sólidos pesados para la preparación de los discos se resumen en la **Tabla 3.1**. Los ensayos se realizaron por triplicado y la absorción de agua se expresó en mL por gramo de sólido.

Tabla 3.1. Cantidad de polvo de ISO o AA usado para preparar los discos de los ensayos de captación de agua.

Disco	mg de ISO	mg de AA
ISO	449 ± 4	---
Mezcla física AA+ISO	172 ± 1	267 ± 2
AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	161 ± 2	363 ± 4

3.3.6. LIBERACIÓN DE ISO DESDE MATRICES DE AA-ISO₇₅-Na₂₅

Se obtuvieron matrices que contuvieron 150 mg de ISO, por compactación de la cantidad adecuada de AA-ISO₇₅-Na₂₅ en una comprimidora monopunzón (Talleres Sánchez, CS3-GMP, Argentina). Las matrices obtenidas presentaron una dureza promedio de $(9 \pm 2) 10^4$ Pa ($n = 10$, AVIC, Argentina).

Las matrices ($n=6$) se sometieron a estudios de liberación en medios biorrelevantes, de pH 1,20±0,05 y 6,80±0,05. Todos los estudios se llevaron a cabo en un equipo Disolutor USP Hanson SR6, aparato 1, a 100 rpm. El volumen del medio de disolución fue de 900 mL (a 37,0 ± 0,5 °C).

Además se realizó un ensayo de liberación secuencial para simular las condiciones del tracto gastrointestinal. En este caso, las matrices ($n=3$) contenidas en los canastillos se trasladaron desde el medio pH 1,20 al de pH 6,80 a las 2 horas de iniciado el experimento, según lo establecido en el capítulo 711 *Dissolution* USP 39-NF34, para formas farmacéuticas de liberación retardada (método B).

A tiempos predeterminados, se tomaron muestras de 2 mL (sin reposición de medio), que fueron analizadas por espectroscopia UV (espectrofotómetro UV-Vis Evolution 300), a 266 nm (pH 1,20) y 263 nm (pH 6,80) contra curvas de calibración preparadas en el mismo medio ($E: 5038,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $4164,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, respectivamente).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. CONTENIDO DE ISO EN LOS SÓLIDOS

El porcentaje de ISO en AA-ISO₇₅-Na₂₅ fue (30,70±0,03) % p/p. Por lo tanto, para la preparación de las matrices conteniendo 150 mg ISO, se pesaron 0,4890 g de complejo que fueron posteriormente comprimidos en una comprimidora monopunzón.

3.4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS AA-ISO_x Y AA-ISO_x-NA₂₅ EN ESTADO SÓLIDO

ISO es un sólido cristalino, de estructura ortorrómbica, que presenta birrefringencia en toda la gama cromática, mientras que AA es un sólido amorfo. Respecto a su capacidad ácido-base, ISO es un zwitterión. En la **Figura 3.1** se describen los equilibrios ácido-base y los pKa que presenta ISO.

Como sucede con otros complejos PE-Fármaco, sólo las especies ionizadas del fármaco son las capaces de interaccionar con los PE. Las especies de ISO capaces de interaccionar con AA son los cationes mono y divalentes, principalmente presentes en soluciones acuosas a pHs menores a 3,5. (1). En estas condiciones AA se encuentra parcialmente dissociado, ya que tiene un pKa que oscila entre 3,40 (ácido manurónico) y 3,70 (ácido gulurónico) (7).

Por lo tanto, es de esperarse que el agua favorezca la interacción entre AA e ISO, ya que aumenta la capacidad de formación de especies dissociadas en ambos compuestos.

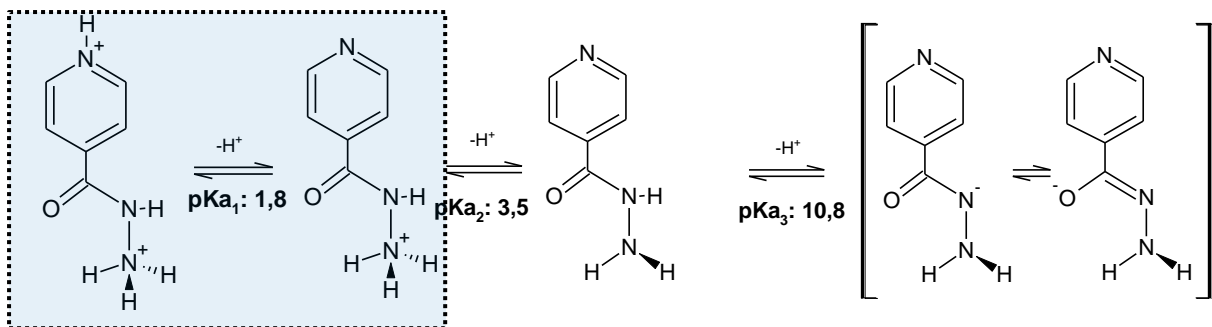


Figura 3.1. Equilibrios ácido-base de ISO. El fármaco es una base débil, que a pH 3,5 se encuentra 50% dissociada.

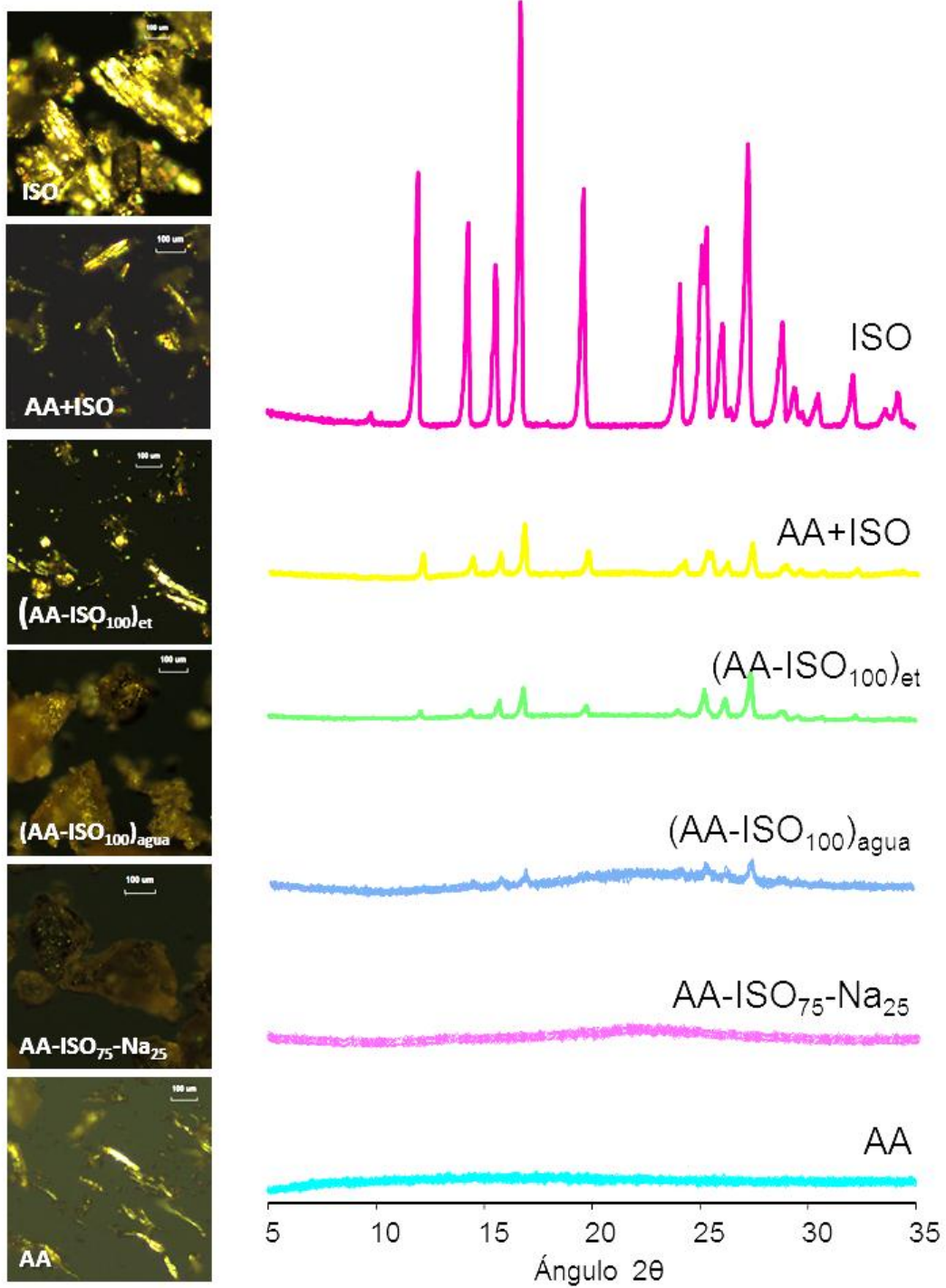


Figura 3.2. Imágenes (100x) obtenidas por microscopía óptica de luz polarizada (izquierda) y patrones de DRXP (derecha) de ISO, la mezcla física AA+ISO, la serie de complejos AA-ISO_x y AA-ISO₇₅-Na₂₅ y AA.

Las imágenes obtenidas por microscopía óptica de luz polarizada y los patrones de DRXP (Figura 3.2) muestran que las propiedades cristalinas de ISO se redujeron en los complejos, a medida que se usa agua como medio de dispersión y se aumenta la proporción de ISO disuelta

en el medio (agua/etanol), ya que se favorece la interacción. De hecho, estudios preliminares en nuestro laboratorio, mostraron que la interacción con ISO fue incompleta cuando se agregó una solución alcohólica de ISO a AA. La birrefringencia y las reflexiones cristalinas se pierden por completo en AA-ISO₇₅-Na₂₅, lo cual se atribuye a la dispersión molecular de ISO en éste material, lo que sugiere completa interacción de ISO con AA.

En el caso de AA-ISO₇₅-Na₂₅, el agregado de NaOH al AA, aumentó la solubilidad del polímero, lo que podría favorecer la interacción con ISO. Este fenómeno se ha observado con otros PE, tales como Carbomer (8) y Eudragit E100 (9,10), que presentaron un aumento de solubilidad e hidrofiliidad cuando se les adicionó un contraión pequeño (Na⁺ o Cl⁻). Adicionalmente, para la obtención de AA-ISO₇₅-Na₂₅, el fármaco se disolvió en el medio de reacción, lo que favoreció la interacción con AA.

El análisis FTIR se centró en las bandas indicativas de la interacción ácido-base entre AA e ISO. Las regiones de vibración asociadas con el grupo carboxilo de AA (ν C=OOH y la vibración simétrica y asimétrica de los grupos COO⁻) y las del grupo N-NH₂ de ISO se analizaron para la serie de complejos, sus precursores y la mezcla física AA+ISO.

Tal como lo muestra la **Figura 3.3**, los espectros FTIR de los complejos mostraron diferencias marcadas en comparación con los precursores puros.

Los espectros de (AA-ISO_x)_{agua} y AA-ISO_x-Na₂₅ mostraron una disminución relativa y progresiva de las bandas intensas a 1741 y 927 cm⁻¹, atribuidas a la vibración de tensión C=OOH y la vibración de flexión fuera del plano COO-H de AA (11), en función de su porcentaje de neutralización. Las bandas mencionadas desaparecieron en las muestras de AA-ISO_x-Na₂₅. Contrariamente, en este espectro aparecieron las señales correspondientes al estiramiento asimétrico del grupo COO⁻ a 1619 y 1417 cm⁻¹, de manera análoga a las señales de AANa. La modificación de intensidad de estas bandas fue relativa a la banda a 1031 cm⁻¹, asignada a la vibración de estiramiento de los enlaces C-O, C-C y C-OH de AA (12).

Las señales características de ISO fueron las bandas de vibración amida I y amida II a 1650 y 1620 cm⁻¹, respectivamente(13). Estas señales del grupo C=ONH- están vinculadas a las interacciones de puente hidrógeno intermoleculares que se establecen en la celda cristalina (14). En el caso de (AA-ISO_x)_{et} y en la mezcla física AA+ISO, se observaron las señales de ISO sin modificaciones. Sin embargo, las bandas de ISO desaparecieron completamente en los sistemas (AA-ISO_x)_{agua} y AA-ISO_x-Na₂₅.

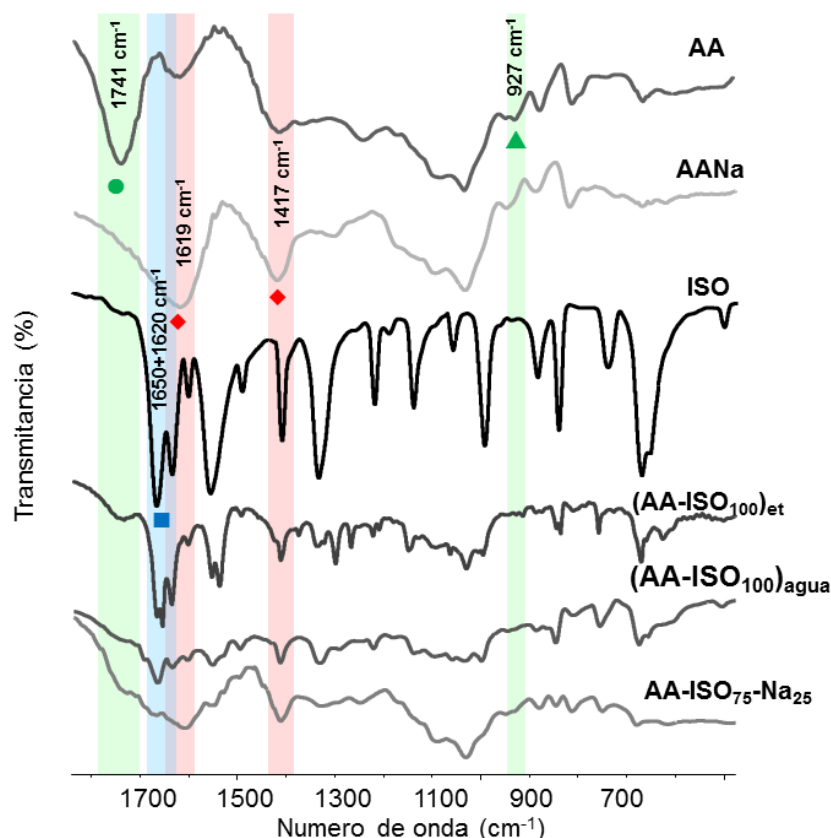


Figura 3.3. Espectros de FTIR de AA, alginato de sodio (AANa), ISO, complejos $(AA-ISO_{100})_{et}$, $(AA-ISO_{100})_{agua}$ y $AA-ISO_{75}-Na_{25}$. Bandas correspondientes a: ● estiramiento del enlace C=OOH del grupo ácido de AA (1741 cm^{-1}); ▲ vibración de flexión fuera del plano del enlace COO-H de AA (927 cm^{-1}); ◆ estiramiento asimétrico del grupo COO⁻ de AANa (1619 y 1417 cm^{-1}); ■ estiramiento del enlace C=O de ISO (amida I: 1650 cm^{-1} y amida II: 1620 cm^{-1}). Para mayor claridad, se incluyeron en la Figura sólo algunos espectros representativos.

La reducción de la intensidad relativa de las bandas propias de AA y de ISO en los materiales $AA-ISO_x-Na_{25}$ se adjudicó a la interacción iónica entre ISO y AA. Este comportamiento es similar al observado en otras dispersiones de AA-fármaco (3,15) y otros complejos iónicos PE-fármaco (16,17), y está asignado a una interacción a nivel molecular entre el fármaco y el polímero. En este caso, la interacción estuvo fuertemente asociada al agregado de agua como medio de interacción, a la disolución de ISO en dicho medio y al agregado de sodio al AA.

Cabe destacar que el acomplejamiento se observó en todos los porcentajes de carga de $AA-ISO_x-Na_{25}$. Además, AA soportó la neutralización completa de sus grupos funcionales, ya que no se observaron señales propias de ISO libre en $AA-ISO_{75}-Na_{25}$.

Mediante el análisis térmico (**Figura 3.4**) se confirmó la completa interacción entre AA e ISO, previamente establecida por las técnicas antes descriptas. A partir de los perfiles de TGA, se

puede observar que ISO no perdió peso al ser calentada desde temperatura ambiente hasta 164 °C, después de lo cual se observó una reducción significativa de la masa, relacionada con su descomposición (máxima a 211 °C). En concordancia, el DSC no reveló ningún evento hasta el punto de fusión característico, alcanzándose un máximo a 171,5 °C (inicio 170,4 °C, recuperación 181,6 °C; $\Delta H = 229,6$ J/g). Adicionalmente, por MPC se detectó la fusión completa de ISO.

Para AA, el perfil de TGA mostró pérdida de peso gradual y sostenida (4,6 %) desde temperatura ambiente hasta 168 °C, resultante de la deshidratación. A partir de 172 °C se observa una disminución abrupta de la masa, adjudicada a un proceso de descomposición, el cual alcanzó un máximo a 210 °C. El DSC de AA reveló un amplio pico endotérmico (máximo a los 111 °C) adjudicado al proceso de deshidratación; luego se observaron un pico endotérmico agudo seguido por un evento exotérmico amplio con máximos a 189 y 240 °C, respectivamente. Tales procesos se atribuyeron a la descomposición del polímero, en concordancia con los resultados del TGA y con lo informado por Soares et al. (18).

Los perfiles de la mezcla física AA+ISO y $(AA-ISO_{100})_{et}$ mostraron un comportamiento consistente con la suma de los precursores. Los termogramas de TGA muestran pérdida gradual de peso, entre 30 y 110 °C, seguida de una pérdida abrupta de peso, con máximo a 185 °C. Adicionalmente, los DSC de éstos materiales presentaron fusión parcial de ISO a 164 °C. Los ΔH de éste evento para la mezcla física AA+ISO y $(AA-ISO_{100})_{et}$ fueron 50,9 y 64,7 J/g, respectivamente, lo que indicó la presencia de 58 y 72 % de ISO libre en cada caso. Los perfiles mostraron, además, endotermas con máximos a 206 y 222 °C, asignadas a transiciones de fase sólido-sólido relacionadas con la degradación del material. Mediante MPC se observó que la mezcla física AA+ISO a fundió parcialmente a los 170 °C, y de manera análoga, en $(AA-ISO_{100})_{et}$ se observó una fusión parcial a 160-170 °C y descomposición después de los 176 °C.

Los termogramas de TGA de $AA-ISO_{75}Na_{25}$ mostraron pérdida del 5,6% del peso entre 30 y 150°C, seguida de una pérdida abrupta del peso (máximo 206 °C). En concordancia, su DSC presentó una endoterma amplia, con un máximo a 105 °C, relacionada con la deshidratación; luego se observaron endotermas a 165 y 176 °C, vinculadas con la degradación del material, tal como se observó para AA. Mediante MPC se corroboró ausencia de fusión de ISO en el complejo AA- $AA-ISO_{75}Na_{25}$, donde sólo se detectó descomposición a partir de 190 °C.

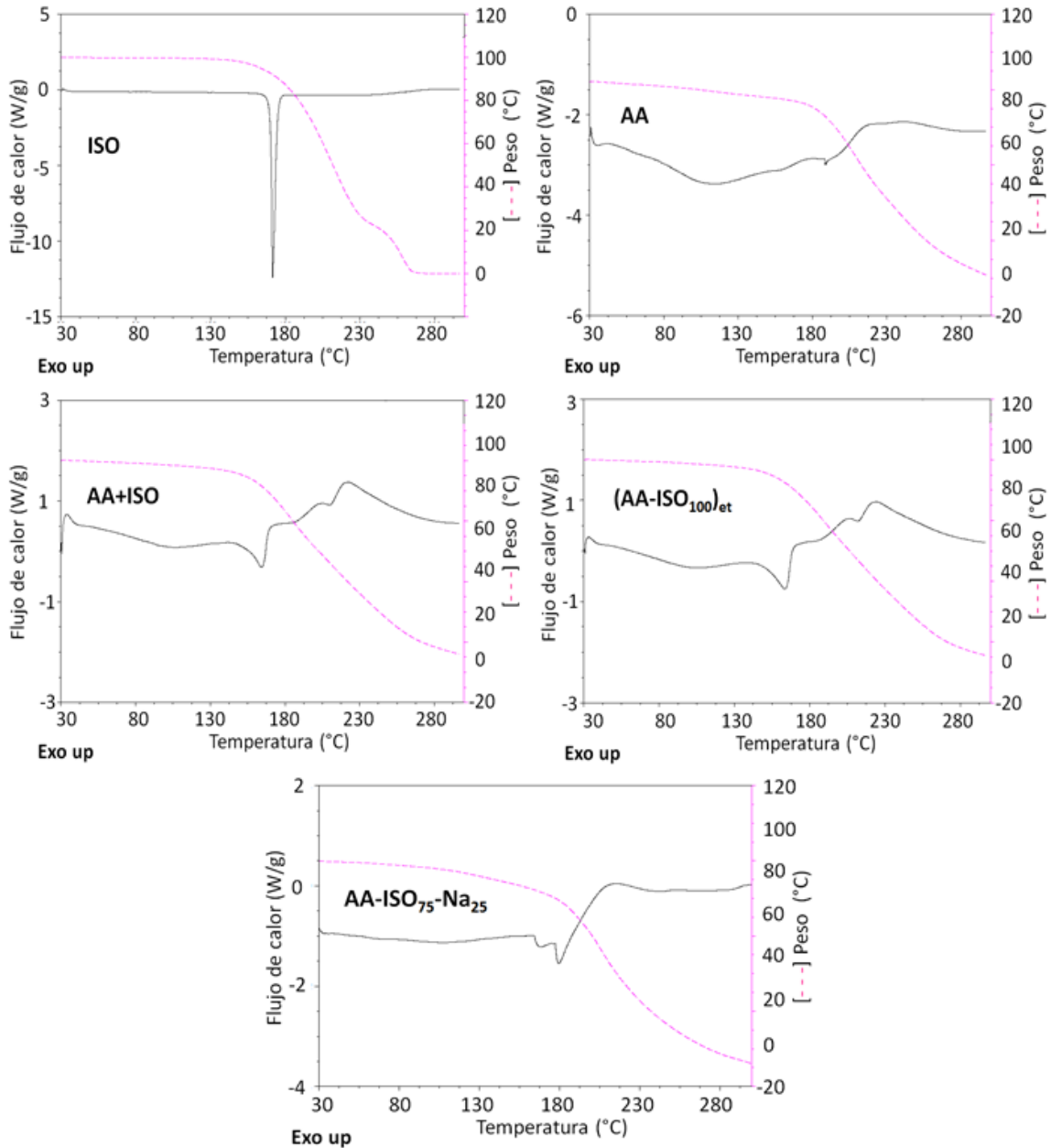


Figura 3.4. Termogramas de DSC (línea sólida negra) y TGA (línea discontinua rosa) de ISO, AA, la mezcla física AA+ISO, y los materiales (AA-ISO₁₀₀)_{et} y AA-ISO₇₅-Na₂₅.

En vista de los resultados obtenidos, se seleccionó AA-ISO₇₅-Na₂₅ para la preparación de las matrices, porque este sólido tiene la mayor cantidad de fármaco por gramo de polvo. Esta consideración es importante, debido a las altas dosis de fármacos antituberculosos presentes en las formulaciones en CDF.

3.4.3. CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE GRÁNULOS DE AA-ISO₇₅-Na₂₅

La **Tabla 3.2** muestra las propiedades reológicas de ISO y AA-ISO₇₅-Na₂₅. Como puede observarse, AA-ISO₇₅-Na₂₅ presentó propiedades de flujo mejoradas respecto a las de ISO. De hecho, según las puntuaciones de la Farmacopea Europea, el ángulo de reposo en AA-ISO₇₅-Na₂₅ pasó de muy pobre a bueno, lo cual es importante para asegurar uniformidad de contenido. Sin embargo, el CH y el IC no mejoraron sustancialmente, ya que sus categorías cambiaron de muy pobres a pobres. Por ello, para la producción de comprimidos sería necesario el agregado de excipientes para mejorar la compresibilidad, principalmente.

Tabla 3.2. Propiedades reológicas de ISO y AA-ISO₇₅-Na₂₅

Muestra	Angulo de reposo (°)	DG (g/mL)	DE (g/mL)	IC	CH
ISO	57 ± 1	0,492 ± 0,005	0,74 ± 0,01	33 ± 1	1,49 ± 0,03
AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	36 ± 3	0,25 ± 0,03	0,35 ± 0,04	29 ± 2	1,40 ± 0,04

3.4.4. CAPTACIÓN DE AGUA

La **Figura 3.5** muestra la captación de agua por parte de los discos de ISO, el complejo AA-ISO₇₅-Na₂₅ y la mezcla física AA+ISO. ISO es altamente hidrofílico. De hecho, el material absorbió agua rápidamente y, luego de 10 min, alcanzó una meseta. En el proceso el disco de ISO incorporó aproximadamente 0,2 veces su peso de agua. Aunque las matrices del complejo AA-ISO₇₅-Na₂₅ y la mezcla física AA+ISO también fueron capaces de retener una alta cantidad de agua, lo hicieron lentamente, requiriendo aproximadamente 120 min para capturar una masa de agua equivalente a la mitad del peso inicial de la matriz. La cantidad de sodio incorporada al disco de AA-ISO₇₅-Na₂₅ favoreció el proceso de captación de agua, manteniendo la velocidad de sorción casi constante a lo largo del tiempo, respecto de la mezcla física. Este resultado estuvo en concordancia con lo reportado por otros autores (3,6).

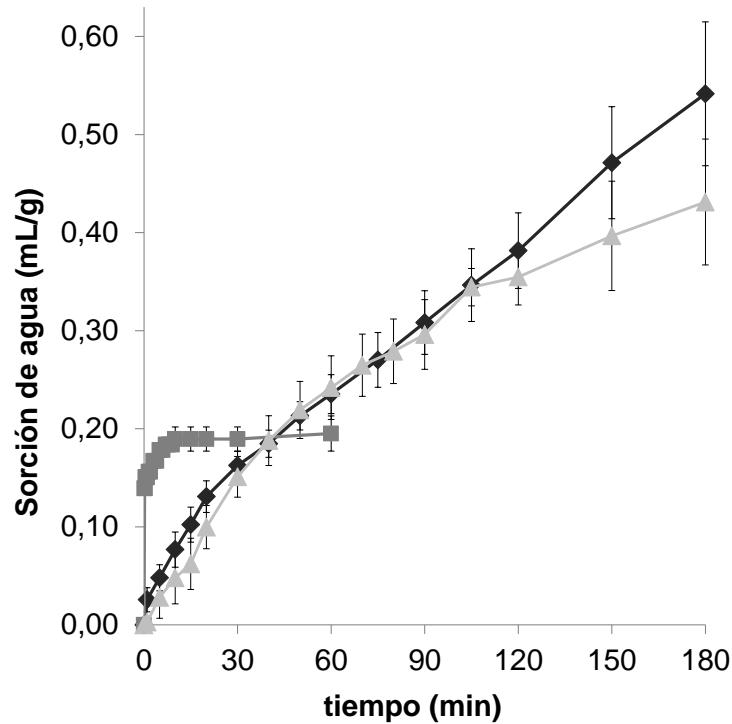


Figura 3.5. Captación de agua (mL) por gramo de sólido en discos de AA-ISO₇₅-Na₂₅ (◆), mezcla física AA+ISO (▲) e ISO (■) en función del tiempo. La cantidad de ISO es la misma en todos los sistemas.

3.4.5. LIBERACIÓN DE ISO DESDE MATRICES DE AA-ISO₇₅-Na₂₅

La liberación de ISO desde las matrices se estudió a pH 1,20 y 6,80. En medio ácido, las matrices mostraron una liberación lenta debido a la formación de una capa externa insoluble de AA que regula la velocidad de liberación de ISO del sistema (**Figura 3.6A**). En esta etapa, la cinética de liberación fue de orden cero, ajustando a la siguiente ecuación: $y = 0,3507x + 8,715$, con un $R^2 = 0,9661$. Se utilizaron los 8 puntos de la curva para la construcción de la ecuación.

A pH 6,80, la velocidad de liberación aumentó, siguiendo una cinética de orden cero, ajustando a la siguiente ecuación: $y = 0,9952x + 4,8973$, con un $R^2 = 0,9938$, considerando los primeros 7 puntos de la curva (**Figura 3.6A**). En este caso, su comportamiento se asoció con la prevalencia de mecanismos de erosión de la capa viscosa que rodea el núcleo seco del sistema matricial (3,19). En la erosión sucede un fenómeno de dispersión del complejo en el medio de disolución, el cual posteriormente se disocia a AA e ISO. Cabe destacar que la metodología analítica utilizada para determinar la concentración de fármaco en el medio de liberación no discrimina entre ISO que se encuentra formando parte del complejo AA-ISO₇₅-Na₂₅ disperso e ISO libre en el medio de disolución.

Finalmente, el estudio de liberación secuencial con cambio de pH (**Figura 3.6B**) reveló el perfil esperable para la liberación de ISO desde las matrices en el TGI, donde luego de la liberación lenta en medio ácido, se continúa con una liberación incrementada, que se completa al cabo de 3 horas a pH 6,80. En la **Figura 3.6B** se observa también un tiempo de latencia en medio intestinal. Este comportamiento se asocia al tiempo que requiere el sistema para revertir la capa de AA insoluble formada en la primera etapa.

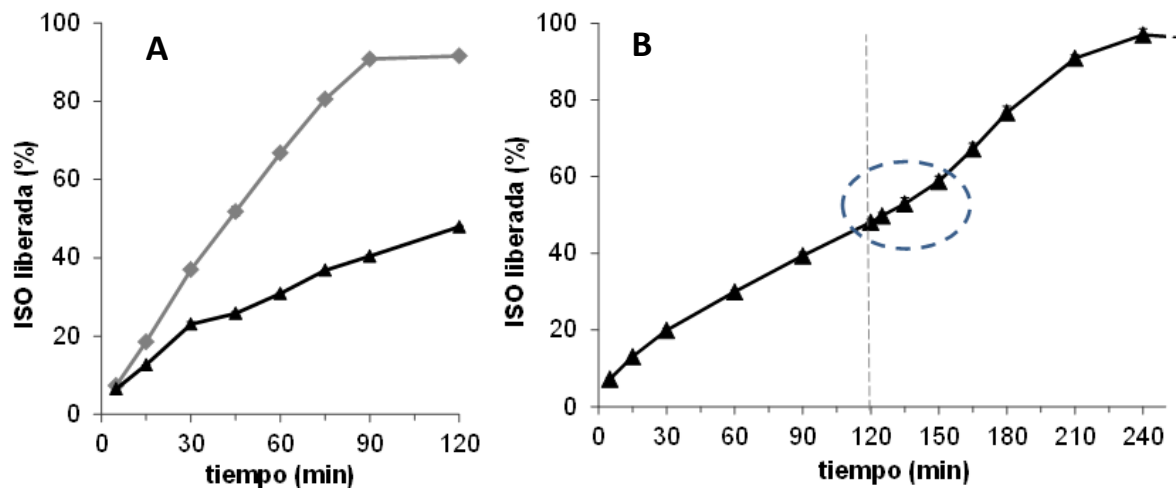


Figura 3.6: Perfiles de liberación de ISO: **A-** desde matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅ en soluciones acuosas de pH 1,20 (▲) y 6,80 (◆), **B-** desde matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅ en solución de pH 1,20 (▲, 0–120 min) y seguidamente en solución de pH 6,80 (◆, 120–240 min). La línea intermitente en **B** destaca el tiempo de latencia, en el cual la velocidad de disolución de ISO está reducida, hasta que se disuelve la capa de AA, formada en medio ácido.

3.5. DISCUSIÓN

Los sistemas portadores AA-ISO_x y AA-ISO_x-Na₂₅ se prepararon usando materiales accesibles y métodos simples, equivalentes a una granulación húmeda. Se conoce que estas operaciones son fácilmente escalables, de manera que ésta tecnología es potencialmente transferible a los sistemas de atención de la salud de las comunidades con recursos limitados, algunas de cuáles son las más afectadas por la tuberculosis (20).

La utilización de una solución de ISO (agua:etanol 70:30) y el agregado de NaOH en la preparación de complejos AA-ISO₇₅-Na₂₅, permitió la completa interacción de los componentes en el estado sólido. Los complejos obtenidos son dispersiones sólidas amorfas con alta capacidad de carga. Estos resultados se condicen con los obtenidos por Ramirez Rigo et al. (3) en complejos con fármacos básicos modelo. Debido a que ISO es una base débil, la interacción

con AA se incrementó en presencia de agua, donde la formación de especies ionizadas de ISO estuvo favorecida.

La liberación de ISO desde matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅ presentó una cinética de liberación de orden cero. Esto se encuentra vinculado, según lo reportado previamente, con un mecanismo de liberación de fármaco regido por el proceso de erosión (3,21).

La concentración nominal de ISO se liberó en menos de un 50 % al cabo de 2 h en un medio que simuló las condiciones gástricas y alcanzó una disolución completa luego de 2 h adicionales en un medio que simuló las condiciones intestinales. Teniendo en cuenta el desempeño del fármaco en estas condiciones *in vitro*, y que es un fármaco de alta solubilidad, es probable que el sistema se comporte de similar manera en el tracto gastrointestinal.

En vista que el desarrollo de formulaciones de liberación sitio-específica y segregada de RIF e ISO mejoraría la biodisponibilidad y estabilidad de RIF, se han reportado escasos sistemas multiunitarios conteniendo ISO de liberación modificada asociados a RIF de liberación inmediata.

Gohel et al. (22) diseñaron un sistema multiunitario que consistió en una cápsula de gelatina rígida de tamaño 00 conteniendo dos comprimidos gastroretentivos de RIF y una cápsula de gelatina rígida (tamaño n° 4) de ISO recubierta entéricamente. La concentración nominal de RIF e ISO fue de 300 y 150 mg, respectivamente. La cápsula de ISO contuvo, como excipiente, 75 mg de fosfato de calcio dihidrato. ISO no se liberó en medio ácido durante dos horas de ensayo, mientras que, en medio intestinal simulado, se liberó el 91 % del fármaco al cabo de 30 min. El sistema obtenido mostró menor degradación de RIF en medio ácido por la segregación de la liberación de los fármacos.

Avachat y Bhise (23) formularon un comprimido bicapa de RIF e ISO, conteniendo una capa de RIF (150 mg) de liberación inmediata y una capa de ISO (100 mg, 33 % más de la dosis aprobada en la CDF) de liberación sostenida. La capa de ISO contuvo un 30 % p/p de AANA y mostró una liberación similar a las matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅, ya que liberó del 40 % de ISO en 1 h en medio ácido y completó la liberación al cabo de 2 h adicionales en solución reguladora pH 6,80. El sistema evaluado en voluntarios sanos, mostró un desempeño adecuado, con un área bajo la curva (ABC) del 130 % respecto de lo cuantificado en la CDF de referencia comercial, relacionado con el exceso de dosis incorporado a la formulación. La concentración máxima alcanzada (C_{max}) estuvo dentro del 80-120%, y el tiempo en el que se alcanzó dicha concentración (t_{max}) fue 3 veces mayor a la referencia comercial. En base a esta experiencia, es

de esperarse que las matrices de AA-ISO₇₅-Na₂₅, muestren una adecuada biodisponibilidad oral.

El desempeño de las matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅ resulta interesante para asociar a matrices de CMC-RIF de muy rápida velocidad de disolución. De hecho, se ha determinado que la combinación de los fármacos en proporciones de RIF: ISO menores o iguales a 1:0,25 no afecta la degradación de RIF a los 30 min (23). Considerando que a los 30 min la cantidad de RIF disuelta en las matrices CMC-RIF es 6,7 veces mayor a la de ISO en las matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅, es de esperarse que este sistema formulado, por ejemplo, como un comprimido bicapa, sea prometedor para optimizar la farmacoterapia de la tuberculosis.

3.6. CONCLUSIONES

AA-ISO₇₅-Na₂₅ es un nuevo material, obtenido por el co-procesado de AA con ISO usando agua y etanol como medios de interacción. La caracterización del polvo indicó que los materiales son complejos iónicos y que sus compactos presentan una liberación de ISO modulada y dependiente del pH. Estas matrices pueden ser útiles en la formulación de formas farmacéuticas sólidas, ya sea sola o en combinación con RIF, para el tratamiento de la tuberculosis.

3.7. REFERENCIAS

1. Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Isoniazid. *J Pharm Sci.* 2007;96(3):522–31.
2. Mariappan TT, 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.
3. Ramírez Rigo M V., Allemandi DA, Manzo RH. Swellable drug-polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid. Characterization and delivery properties. *Int J Pharm.* 2006;322(1–2):36–43.
4. Ramirez Rigo MV. Preparación y estudio de sistemas portadores de fármacos. Universidad Nacional de Córdoba; 2006.
5. Bermúdez JM. Desarrollo de Nuevos Sistemas de Liberación Modificada de Fármacos Utilizando Matrices Hidrofílicas Polielectrolito-Fármaco. Universidad Nacional de Córdoba; 2008.
6. Ching AL, Liew CV, Chan LW, Wan P, Heng S. Modifying matrix micro-environmental pH to achieve sustained drug release from highly laminating alginate matrices. 2008;3:361–70.
7. Repka M, Singh A. Alginic Acid. In: *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. Washington DC, USA: The Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical Association; 2009. p. 20–2.
8. Bermúdez JM, Jimenez-Kairuz AF, Olivera ME, Allemandi D a, Manzo RH. A ciprofloxacin extended release tablet based on swellable drug polyelectrolyte matrices. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(3):924–30.
9. Quinteros DA, Rigo VR, Kairuz AFJ, Olivera ME, Manzo RH, Allemandi DA. Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2008;33(1):72–9.
10. Guzmán ML, Manzo RH, Olivera ME. Eudragit E100 as a drug carrier: The remarkable affinity of phosphate ester for dimethylamine. *Mol Pharm.* 2012;9(9):2424–33.
11. Huang RYM, Pal R, Moon GY. Characteristics of sodium alginate membranes for the pervaporation dehydration of ethanol–water and isopropanol–water mixtures. *J Memb Sci [Internet].* 1999 Jul 15;160(1):101–13. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037673889900071X>
12. van Hoogmoed CG, Busscher HJ, de Vos P. Fourier transform infrared spectroscopy studies of alginate-PLL capsules with varying compositions. *J Biomed Mater Res A.* 2003;67(1):172–8.
13. Rastogi R, Sultana Y, Aqil M, Ali A, Kumar S, Chuttani K, et al. Alginate microspheres of isoniazid for oral sustained drug delivery. *Int J Pharm.* 2007;334(1–2):71–7.
14. Borba A, Gómez-Zavaglia A, Fausto R. Molecular structure, infrared spectra, and photochemistry of isoniazid under cryogenic conditions. *J Phys Chem A.* 2009;113(32):9220–30.

15. Ceschan NE, Bucalá V, Ramírez-Rigo MV. New alginic acid-atenolol microparticles for inhalatory drug targeting. *Mater Sci Eng C* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;41:255–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2014.04.040>
16. Jimenez-Kairuz AF, Allemandi DA, Manzo RH. The improvement of aqueous chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes. *Int J Pharm.* 2004;269(1):149–56.
17. Ramírez Rigo M, Allemandi D, Manzo R. Swellable drug-polyelectrolyte matrices of drug-carboxymethylcellulose complexes. Characterization and delivery properties. *Drug Deliv.* 2009;16(2):108–15.
18. Soares JP, Santos JE, Chierice GO, Cavalheiro ETG. Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclét Quim.* 2004;29(2):57–63.
19. Ughini F, Andrezza IF, Ganter JLMS, Bresolin TMB. Evaluation of xanthan and highly substituted galactomannan from *M. scabrella* as a sustained release matrix. *Int J Pharm.* 2004;271(1–2):197–205.
20. World Health Organization. Global tuberculosis report 2014 [Internet]. WHO. Geneva, Switzerland; 2014. 171 p. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf
21. Liew CV, Chan LW, Ching AL, Heng PWS. Evaluation of sodium alginate as drug release modifier in matrix tablets. *Int J Pharm.* 2006;309(1–2):25–37.
22. Gohel MC, Sarvaiya KG. A novel dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *AAPS PharmSciTech.* 2007;44(1):22–7.
23. Avachat AM, Bhise SB. Tailored release drug delivery system for rifampicin and isoniazid for enhanced bioavailability of rifampicin. *Pharm Dev Technol* [Internet]. 2011;16(2):127–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105081>

CAPÍTULO 4

EVALUACION DE LA ESTABILIDAD DE RIF EN MEDIO ACIDO

4.1. INTRODUCCIÓN

Es de particular importancia determinar la estabilidad de RIF en condiciones del tracto gastrointestinal, ya que está ampliamente descrito que su inestabilidad en medio ácido condiciona su biodisponibilidad (1–3). De hecho, se ha reportado que una disminución del 10% o más de la dosis está asociado a fallas en el tratamiento y al desarrollo de resistencia (4), lo que conlleva a casos más severos de tuberculosis, como la tuberculosis resistente a RIF, la tuberculosis multi-resistente y la tuberculosis extremadamente-resistente, cuyo tratamiento es mucho más complejo y costoso, así como también menos efectivo.

En medio ácido, RIF se hidroliza a 3-formil rifampicina (3FRSV). Esta degradación es acelerada por la presencia concomitante de ISO, que reacciona con 3FRSV para formar isonicotinil hidrazona (IH) (**Figura 4.1**), en una magnitud proporcional a la concentración de ISO y al tiempo de exposición en medio ácido (3,5,6). Este comportamiento se explica sobre la base de una compleja reacción consecutiva. Inicialmente RIF se convierte a 3FRSV mediante una reacción irreversible con una cinética de primer orden, cuya velocidad es máxima a pH 2. Luego sigue una reacción más rápida, que se ajusta a una cinética de segundo orden, que lleva a la formación de IH. En vista de que IH es inestable, éste revierte lentamente a ISO y 3FRSV, lo que resulta en la recuperación parcial de ISO. Esto explica por qué el problema de estabilidad se limita a RIF sola y no a ISO (5).

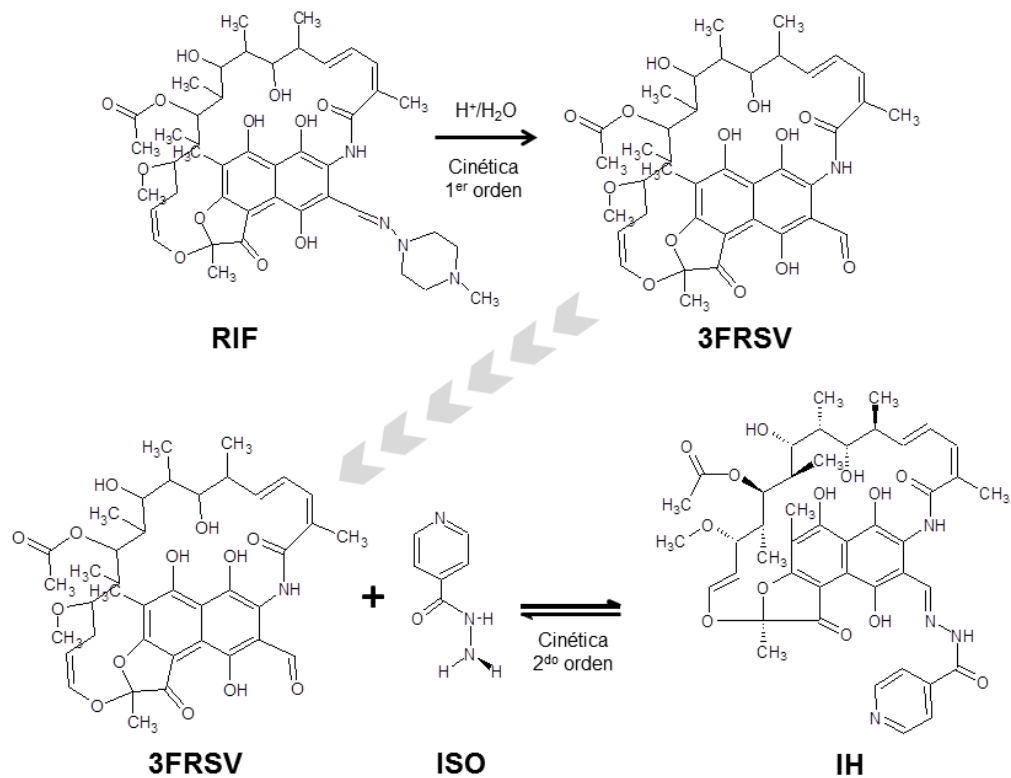


Figura 4.1: Mecanismo de degradación ácida de RIF en presencia de ISO, adaptado de Singh *et al.* 2001(1)

Tanto IH como 3FRSV tienen efecto antibacteriano *in vitro*, sin embargo no tienen efecto farmacológico *in vivo*, ya que son insolubles a todos los pHs del tracto gastrointestinal y son pobremente absorbidos (7). Por otra parte, RIF tiene buena absorción en el estómago y el duodeno, donde su solubilidad es mayor, mientras que ISO tiene mayor absorción en el intestino y su permeabilidad no está influenciada por la presencia de RIF (8).

A nivel mundial, las formulaciones en CDF con autorización para su comercialización, son de liberación inmediata y concomitante. Estas liberan la dosis completa de ISO en el entorno gástrico, por lo que la reacción de degradación de RIF está ampliamente favorecida. Para la asociación, estudios *in vitro* han observado una reducción de la dosis de RIF del 8,5% a los 15 min de exposición en HCl 0,1M. Esta degradación se incrementó al 50% de la dosis luego de 3 h de exposición en el mismo medio (5).

La degradación de RIF también se ha descrito durante el almacenamiento, cuando están presentes pirazinamida y etambutol. Estos fármacos pueden formar parte de la CDF (cuádruple asociación) y son higroscópicos. El aumento de humedad en la forma farmacéutica sólida

genera un entorno de hidrólisis ácida, lo que favorece la reacción entre RIF e ISO (3). Por ello, también resulta importante la separación física de RIF e ISO en la forma farmacéutica de la cuádruple asociación.

Si bien la administración independiente de RIF e ISO mejoraría la estabilidad de RIF *in vivo*, duplicaría la cantidad de comprimidos a ser administrados, que actualmente son entre 2 a 8 por día, durante 6 a 9 meses. Este aumento considerable en la cantidad de comprimidos, pondría en riesgo el cumplimiento de la terapia. De hecho, las principales ventajas que presentan las formulaciones en CDF son la mejora la adherencia al tratamiento y la reducción en el riesgo de desarrollo de resistencia (9). Por ello, la estrategia de segregación física y de la liberación de RIF e ISO en una formulación en CDF, sería interesante para evitar la interacción entre los fármacos en estado sólido y en condiciones fisiológicas, lo que podría repercutir en un aumento de la biodisponibilidad oral de RIF.

En Argentina, se dispone de las formulaciones en CDF de referencia (RIFINAH®, Sanofi Aventis, Argentina) y también de aquellas provistas en el ámbito público por el Programa Nacional para el Control de la Tuberculosis y la Lepra (PNCTyL). Se han descrito faltas de equivalencia a nivel mundial y local.

Por ejemplo, Pillai et al. (10) evaluaron la biodisponibilidad relativa de RIF en diversas formulaciones en CDF utilizadas en los programas de control de la tuberculosis de Sudáfrica y disponibles en el mercado internacional. En el trabajo se realizaron diez ensayos clínicos, donde determinaron los niveles plasmáticos de RIF liberada desde las CDF de doble, triple o cuádruple asociación, en comparación con la administración independiente de los fármacos, en dosis equivalentes. De los diez ensayos realizados, siete demostraron bioinequivalencia de RIF, lo cual estuvo adjudicado a la ausencia de estudios de bioequivalencia como requisito para el registro de las formulaciones antituberculosas en CDF.

Agrawal et al. (11) compararon, mediante ensayos clínicos llevados a cabo en la India, la biodisponibilidad de los fármacos contenidos en formulaciones en CDF en relación a las formulaciones individuales. De las ocho formulaciones en CDF comparadas, seis fueron bioequivalentes para RIF, mientras que una estuvo por encima y otra estuvo por debajo de los límites establecidos para su bioequivalencia. Esta mayor variabilidad en los niveles de RIF fue atribuida a la mayor complejidad en la elaboración de una formulación combinada. Además, una formulación de RIF (capsulas rígidas) mostró niveles plasmáticos inesperadamente bajos, indicando la importancia de la caracterización física del material a granel. Otros componentes

de formulaciones en CDF, tales como ISO y PIR, mostraron una variabilidad muy inferior y son bioequivalentes a las formulaciones separadas, incluso en las formulaciones en las que RIF falló. Esto se encuentra relacionado a la alta solubilidad y permeabilidad de ISO y PIR.

Como ejemplo de inequivalencia a nivel local, Olivera *et al.* (12) realizaron ensayos de disolución en medios biorrelevantes a la formulación en CDF de ISO (150 mg) y RIF (300 mg), provistos por el PNCTy L en el año 2009. En este estudio, se detectó la falta de cumplimiento de los requerimientos codificados, de forma tal que podrían comprometer su eficacia.

Las matrices de CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅ obtenidas en este trabajo de Tesis mostraron propiedades de liberación específica y segregada, ya que RIF se liberó rápidamente desde la matriz en medio ácido. Por otra parte, ISO se liberó lentamente en medio ácido, completándose su liberación al cabo de 2 h en el medio intestinal simulado. En esta etapa, es de interés evaluar si la estrategia de segregación de RIF planteada el sistema de matrices, permite mejorar su estabilidad en medio ácido, considerando que la degradación de RIF hacia 3FRSV es inevitable.

Para evaluar la estabilidad de RIF, se requiere contar con métodos indicativos de estabilidad validados. Esto implica, según lo establecido por la FDA (13), que se deberían poder identificar y cuantificar con precisión y exactitud los principios activos y los productos relacionados tales como impurezas y productos de degradación. Para ello, es necesario contar con estándares de los productos de degradación de calidad conocida, los cuales no se encuentran comercialmente disponibles.

El método de HPLC descrito por USP 39 para la cuantificación de RIF e ISO, ha sido altamente criticado por no ser indicativo de estabilidad. Varios autores han propuesto métodos alternativos de cuantificación por HPLC que permiten la identificación de RIF, ISO, sus productos de degradación ácida y otras sustancias relacionadas (4,14,15). Sankar *et al.* (4) utilizó un método isocrático que permitió identificar en una misma corrida cromatográfica RIF, ISO, 3FRSV, IH y rifampicin quinona. Sin embargo se desconoce los alcances cuantitativos de la técnica, especialmente para los productos de degradación. Además, se desconoce la estabilidad de las muestras en las condiciones de la corrida.

Respecto a la obtención de los productos de degradación ácida de RIF, se han descrito métodos de síntesis de 3FRSV e IH (5,16), que se basan en someter a RIF a condiciones de hidrólisis ácida, en ausencia o en presencia de ISO. La purificación de los productos ha sido descrita por diferentes técnicas, tales como HPLC preparativo y TLC en dos dimensiones.

Además se conoce que, a diferencia de RIF, los productos de degradación son insolubles en medio ácido. Esta propiedad puede servir para separarlos de los reactivos.

En la determinación de la estabilidad de un principio activo, el balance de masa entre la cantidad remanente de éste y la cantidad formada de producto de degradación, debe ser cercano al 100% del contenido original.

Las especificaciones del contenido de las cápsulas o comprimidos de RIF varían ampliamente de acuerdo a las diferentes farmacopeas, por ejemplo, para un valor nominal de 300 mg de RIF/comprimido, la masa puede variar entre 270 y 330 mg según la Farmacopea Internacional (FI) y entre 270 y 390 mg según la USP (17,18). Este amplio rango de aceptación, se encuentra probablemente asociada al hecho de que RIF se descompone y por ello se agrega un exceso (1). En vista que las diferencias en la cantidad inicial de RIF de cada formulación pueden ser considerables, es necesario valorar el contenido de RIF de los sistemas utilizados para poder compararlos.

4.1.1. OBJETIVOS

El objetivo de esta etapa fue determinar si la reducción de la coexposición de RIF e ISO lograda por la asociación de matrices CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅ permite reducir la degradación de RIF asociada a ISO, es decir la formación de IH.

A tales fines resulta necesario:

- Sintetizar, purificar y caracterizar los productos de degradación ácida de RIF, 3FRSV e IH.
- Validar la metodología analítica de cuantificación conjunta de RIF, ISO, 3FRSV e IH.
- Valorar el contenido de RIF desde las formulaciones utilizadas.

4.2. MATERIALES

RIF, ISO y ácido ascórbico (grado farmacéutico) se adquirieron en Parafarm®, Argentina. Las soluciones de NaOH y HCl 1 M valoradas fueron marca Anedra®. El fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) y el fosfato dibásico de potasio (K₂HPO₄), calidad pro-análisis, fueron adquiridos en Cicarelli®, Argentina. El cloroformo deuterado (CDCl₃; 99,8 % átomos de deuterio) fue adquirido en Sigma-Aldrich® y el metanol grado HLPC fue adquirido en Sintorgan®.

La solución de ácido ascórbico 0,5 % se preparó en agua destilada, se utilizó en el transcurso de no más de 2 h, y durante su uso se protegió de la luz, con papel aluminio. La solución de HCl 0,01 M, pH $2,00 \pm 0,05$, se obtuvo por dilución de la solución valorada de HCl 1 M. La solución reguladora de fosfato 0,27 M, pH 7,6 se preparó disolviendo 5,04 g de KH_2PO_4 y 40,72 g de K_2HPO_4 en 1000 mL de agua destilada. La solución reguladora de fosfato 0,01M, pH $7,00 \pm 0,05$, se preparó disolviendo 1,36 g de KH_2PO_4 en 1000 mL de agua milliQ y ajustando el pH con NaOH 1 M. La solución reguladora de fosfato pH 7,4 se preparó de acuerdo a la FI 6^{ta} Ed. (17). La solución de HCl/KCl pH 1,20 se preparó según lo descrito por USP 39 (18).

Los ensayos de valoración y de estabilidad en medio ácido se realizaron sobre las matrices de CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅, conteniendo 300 mg de RIF y 150 mg de ISO respectivamente, obtenidas por compactación directa en comprimidora monopunzón (Talleres Sanchez, Modelo CS3-GMP), utilizando un punzón n° 11 plano, tal como se describió en los Capítulos 2 y 3 (secciones 2.3.7 y 3.3.6 respectivamente). A fines comparativos se utilizaron cápsulas en CDF de RIF+ISO de referencia (RIFINAH®; Sanofi-Aventis Argentina), como ejemplo de un sistema de liberación concomitante. Además, se hicieron ensayos con cápsulas de RIF de referencia (RIFADIN®; Sanofi-Aventis Argentina) asociadas a matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅, para destacar si el desempeño del sistema de liberación inmediata de CMC-RIF es superador. Todos los sistemas contuvieron el mismo contenido declarado de RIF e ISO.

4.3. METODOLOGÍA

4.3.1. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE 3FRSV

Se disolvieron 1,09 g de RIF en 100 mL de HCl 0,01 M y se conservó la solución en frasco de vidrio inactínico a temperatura ambiente. Luego de 24 h, se observó la formación de una dispersión fina que se separó del sobrenadante por centrifugación a 5°C (para favorecer la precipitación de los productos de degradación), 120 Hz, durante 30 min en ultracentrífuga HERMLE Z36HK (LaborTechnik, Alemania). Luego de descartar el sobrenadante, el precipitado se disolvió en 50 mL de acetato de etilo y se sometió a sucesivas particiones con HCl 0,01 M (volumen de cada alícuota: 30-50 mL) para extraer la RIF remanente, soluble en ácido. Por cuantificación UV de la fase acuosa ($\lambda=475$ nm), se observó que luego de 5 particiones los niveles de RIF extraídos eran despreciables ($<0,02$ mM). El sólido se obtuvo luego de evaporar el acetato de etilo bajo flujo de nitrógeno a temperatura ambiente.

4.3.2. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE IH

Se disolvieron 0,56 g de RIF en 100 mL de HCl 0,01M junto con un exceso de ISO (0,33 g). La solución se conservó en frasco de vidrio inactínico a temperatura ambiente. Luego de 24 h, se observó la formación de un sólido que se separó y purificó de la misma manera que para 3FRSV. Se necesitaron 6 particiones con HCl 0,01 M (30-40 mL cada alícuota) hasta determinar ausencia de RIF en la fase acuosa. El sólido se obtuvo luego de evaporar el acetato de etilo bajo flujo de nitrógeno a temperatura ambiente.

4.3.3. CARACTERIZACIÓN DE 3FRSV E IH

3FRSV e IH fueron caracterizados mediante espectrometría de masa de alta resolución, RMN de ^{13}C y HPLC, los que permitieron confirmar su identidad. Adicionalmente, el HPLC se empleó para determinar la pureza de las muestras.

4.3.4. ESPECTROMETRÍA DE MASA DE ALTA RESOLUCIÓN

Se prepararon soluciones de 3FRSV e IH en metanol, de concentración aproximada 10 $\mu\text{g/mL}$, y se inyectaron en un espectrómetro de masas de alta resolución con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo-QTOF (MicroTOF Q II Bruker Daltonics, Estados Unidos). Las muestras se sometieron a ionización por electrospray positiva (ESI+) y negativa (ESI-) y se registraron los espectros de masa en modo de ión negativo y positivo en el rango entre 50 y 1000 m/z.

Las condiciones de trabajo de la fuente de ionización fueron las siguientes: tensión capilar, 4500 V; presión del gas nebulizador, 2,0 bar; flujo de gas de secado, 4,0 L/min; y temperatura de gas de secado, 180 °C. Nitrógeno y argón se utilizaron como gases de nebulización y de colisión, respectivamente. El detector de MS se programó para llevar a cabo una exploración de MS/MS de los tres iones más abundantes, utilizando la energía de colisión de 30,0 eV.

La identificación de 3FRSV se basó en la medición exacta de la masa de los iones $[\text{M}]^-$: 725,3 m/z y $[\text{MH}]^+$: 726,3 m/z). Para IH, se midió la masa exacta de los iones $[\text{M}]^-$: 843,3 m/z; $[\text{MH}]^+$: 845,3 m/z y $[\text{MNa}]^+$: 867,3 m/z). El error de masa fue menor a 5 ppm. Los datos se compararon contra espectros simulados obtenidos desde el software *Compass DataAnalysis*.

4.3.5. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR EN SOLUCIÓN (RMN) DE ^{13}C

Espectros de RMN de ^{13}C en solución se llevaron a cabo a 25 °C en un espectrómetro Bruker Advance II Ultra Shield TM operado a 400,16 MHz. Muestras de IH y 3FRSV en concentraciones

de 41 y 26 mM, respectivamente, se disolvieron en CDCl_3 . Los corrimientos químicos fueron referenciados al carbono del CDCl_3 ($\delta=77,7\text{ppm}$). Las asignaciones de IH y 3FRSV se hicieron por comparación con valores informados en la literatura(5).

4.3.6. HPLC

Se utilizó la técnica descrita por Sankar *et al.* (4), para cuantificar 3FRSV, IH, RIF e ISO en una misma corrida cromatográfica.

4.3.6.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida Waters, software Empower PRO, columna C18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex Luna 5 μm , con precolumna), volumen de inyección: 20 μL , flujo 1 mL/min, fase móvil metanol: solución reguladora de fosfato 0,01 M pH 7,00, en proporción 65:35. La detección se realizó por espectrofotometría UV-Vis con detector de arreglo de diodos (Waters 2475) en el rango de 200 a 550 nm, lo que permitió observar la curva espectral de todos los compuestos y seleccionar las longitudes de onda más adecuadas para la cuantificación de los analitos.

4.3.6.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN POR HPLC

La *selectividad* de RIF e ISO fue determinada como la ausencia de interferencias en la cuantificación de las señales de los fármacos, ante la presencia de sustancias relacionadas o incompatibles (3FRSV, IH e ISO/RIF) o bien sustancias con tiempos de retención cercano. En el caso de RIF se comparó el área de la señal obtenida en una solución de RIF 198 μM , respecto de la que se obtiene a partir de una solución de igual concentración enriquecida con concentraciones conocidas de ISO, 3FRSV e IH. Para el caso de ISO, se comparó el área de la señal obtenida a partir de una solución 595 μM enriquecida con concentraciones conocidas de RIF, 3FRSV e IH o bien de ácido ascórbico (sustancia utilizada en el ensayo de estabilidad en medio ácido y con t_r cercano a ISO). Los resultados se expresaron como el porcentaje de recuperación de cada fármaco, y se aceptó un error estándar (EE%) <2%.

Para establecer *linealidad* se realizaron curvas de calibración por triplicado de RIF e ISO (junto con ácido ascórbico 0,5%) en solución reguladora de fosfato 0,27 M, pH 7,6. Se calculó el coeficiente de correlación (R^2) entre las respuestas (áreas) con las concentraciones de los analitos estándar en los rangos entre 6 y 979 μM de RIF y 2 y 758 μM de ISO, considerándose lineales aquellas curvas con $R^2 > 0,99$.

La *exactitud* se determinó para cada punto de las curvas de calibración realizadas. El método se consideró exacto si el EE% de las muestras fue $\leq 15\%$. La *precisión*, informada a través de la *repetibilidad intra-día e inter-día* se calculó a partir del coeficiente de variación (CV%) de cada punto de las curvas de calibración realizadas en un mismo día o en diferente día, respectivamente. El método se consideró preciso si el CV% $\leq 15\%$ (19).

La *estabilidad* de los fármacos se determinó a partir de soluciones de RIF e ISO de composición análoga a las muestras y de concentración 395 y 3560 μM , respectivamente. Para determinar la *estabilidad a corto plazo* las soluciones se conservaron a temperatura ambiente y al abrigo de la luz y se cuantificaron en inyecciones periódicas cada 4 h al cabo de 36 h. A los fines de evaluar la *estabilidad tras un ciclo de congelado y descongelado*, las soluciones se sometieron a un ciclo de congelado por 24 h y posterior descongelado durante 1h a temperatura ambiente, cuantificándose antes y después del congelado. Para ambos casos, se estableció como aceptable un EE% $\leq 15\%$ (19).

3FRSV e IH se identificaron por comparación de los tiempos de retención relativos con los informados por Sankar *et al.* (4)

Para determinar la pureza de 3FRSV, se pesaron exactamente 5,00 mg sólido obtenido y se llevaron a un volumen final de 5 mL con metanol. Dicha solución fue cuantificada por HPLC, por el método previamente descrito. RIF, considerada la impureza principal de esta muestra, fue determinada y descontada de la masa del sólido. A partir de 3FRSV de pureza conocida se determinaron los parámetros previamente enumerados en el rango de concentraciones del 0,6 a 93,9 μM .

Para determinar la pureza de IH, se pesaron exactamente 5,00 mg sólido obtenido y se llevaron a un volumen final de 5 mL con metanol. Dicha solución fue cuantificada por HPLC, por el método previamente descrito. RIF y 3FRSV, consideradas las impurezas principales de esta muestra, fueron determinadas y descontadas de la masa del sólido. A partir de IH de pureza conocida se determinaron los parámetros previamente enumerados en el rango de concentraciones del 0,6 a 99,1 μM .

4.3.7. VALORACIÓN DE RIF DESDE LAS FORMULACIONES

El contenido de RIF de las matrices CMC-RIF y las cápsulas (RIFADIN® y RIFINAH®) se valoró por el método descrito por la FI para los comprimidos de RIF y las CDF (Método B) (17).

Para ello, se pesó y mezcló el contenido de 20 cápsulas. En el caso de las matrices CMC-RIF, cuyo contenido ha demostrado ser homogéneo, se pesaron y trituraron 6 unidades. Se transfirió una cantidad exactamente pesada de polvo, conteniendo 0,10 g de RIF, a un matraz aforado de 100 mL, se añadió 80 mL de metanol y se agitó para favorecer la disolución de RIF. Se llevó a volumen final con metanol, se mezcló y filtró, descartándose los primeros 20 mL para saturar el filtro. Luego, se tomaron 2 mL del filtrado y se llevó a volumen final de 100 mL con solución reguladora de fosfato, pH 7,4. Se determinó la absorbancia de esa solución (475 nm) en un espectrofotómetro UV-Vis (Evolution 300, Thermo Electron Corporation EE.UU), utilizando como blanco la solución reguladora de fosfato de pH 7,4. El contenido de RIF fue calculado utilizando como referencia una solución metanólica de RIF al 0,1%, posteriormente diluida en idénticas condiciones.

4.3.8. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE RIF EN MEDIO ÁCIDO

Se realizaron ensayos de liberación de los sistemas matrices en 900 mL de solución reguladora HCl/KCl de pH 1,20 (pH del estómago vacío (20)) durante 2 h de acuerdo a lo codificado en la USP 39, para los ensayos de disolución de las cápsulas CDF de RIF e ISO (aparato 1; 100 rpm; $37\pm 0,5$ °C). A los 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 min de ensayo, se tomaron muestras de 15 mL utilizando cánulas filtrantes. A los fines de saturar el filtro, se descartaron los primeros 10 mL (que fueron devueltos al vaso) y se repusieron 5 mL con medio fresco. A cada muestra extraída (5 mL) se le agregaron 500 μ L de la solución de ácido ascórbico y se llevó a volumen final de 10 mL con buffer fosfato 0,27 M, pH=7,6. Estas soluciones se agregaron para evitar la degradación oxidativa y la hidrólisis ácida de RIF (pH final alcanzado $6,61\pm 0,07$). Las muestras fueron inmediatamente cuantificadas por HPLC. Los experimentos se realizaron por sextuplicado.

A los fines comparativos, se preparó una solución de RIF+ISO, conteniendo una concentración equivalente a las dosis de ambos fármacos disueltas en el medio de disolución. Esta concentración (405 μ M de RIF y 1210 μ M de ISO) representa la máxima cantidad de los fármacos capaz de disolverse. La solución de RIF+ISO se mantuvo en idénticas condiciones a las descritas previamente y las muestras, tomadas a los mismos tiempos preestablecidos, fueron inmediatamente cuantificadas por HPLC. Este ensayo se realizó por triplicado.

4.3.8.1. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los valores se expresaron como la media \pm error estándar (EE). Se aplicó un ANOVA de una vía seguido del Test de Tukey, a los fines de establecer diferencias significativas ($p < 0,05$), usando el software Prism Graph Pad, versión 5.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE 3FRSV E IH

4.4.1.1. ESPECTROMETRÍA DE MASA DE ALTA RESOLUCIÓN

Esta técnica, tal como ha sido programada, permite la identificación de sustancias pero no puede detectarse la presencia de impurezas.

La **Figura 4.2** muestra los espectros, en modo ESI-, de los iones M^- de 3FRSV e IH, junto con los espectros simulados por el mismo software (Compass DataAnalysis). Tal como puede observarse, las señales obtenidas son idénticas a las simuladas, por lo que se confirma la identidad de los productos de degradación. En el modo ESI+, no fue perceptible el ión $[MH]^+$ de ninguno de los productos, y sólo se observó el ión $[MNa]^+$ a 867,3285 m/z de IH, también presente en el espectro simulado a 867,3423 m/z.

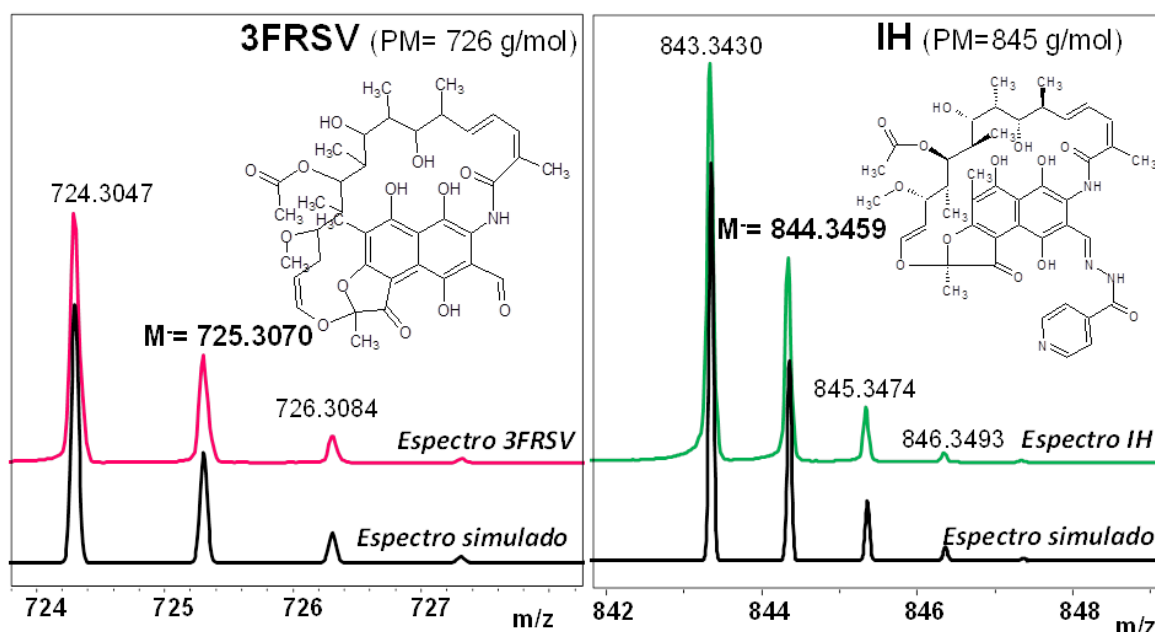


Figura 4.2. Espectros de masa de 3FRSV e IH, obtenidos en el modo ESI-. Se observan los iones moleculares $[M]^-$ de 3FRSV e IH, los cuales correlacionan con los espectros simulados, generados con el software Compass DataAnalysis.

4.4.1.2. RMN DE ^{13}C

El RMN es una técnica muy útil, ya que permite identificar un analito con alto grado de exactitud, sin la necesidad de contar con sustancias de referencia. La **Figura 4.3** muestra el RMN de ^{13}C de IH, 3FRSV y RIF. En coincidencia con lo informado en la literatura (5), los productos de degradación mostraron señales características de la estructura conservada de RIF, tales como el C15, C35 y C11, que aparecieron a 170,69; 172,54 y 194,12 ppm, respectivamente. Las señales de los carbonos de la metil piperazina a 53,86; 50,14 y 45,82 ppm, no se observaron en los espectros de ambos productos de degradación. En 3FRSV, desapareció, además, la señal a 132,48 propia del (-C38H=N) de RIF. Nuevas señales a 196,61 ppm correspondiente al grupo aldehído en 3FRSV y a 150,7 y 122,6 correspondientes a los carbonos piridínicos en IH, proporcionaron amplia evidencia de la formación de los productos de degradación.

Nótese que el espectro de IH presenta una señal a 196,61 ppm, propia de 3FRSV, lo que sugiere que la muestra está contaminada con este analito, en una proporción que no puede ser determinada por esta técnica.

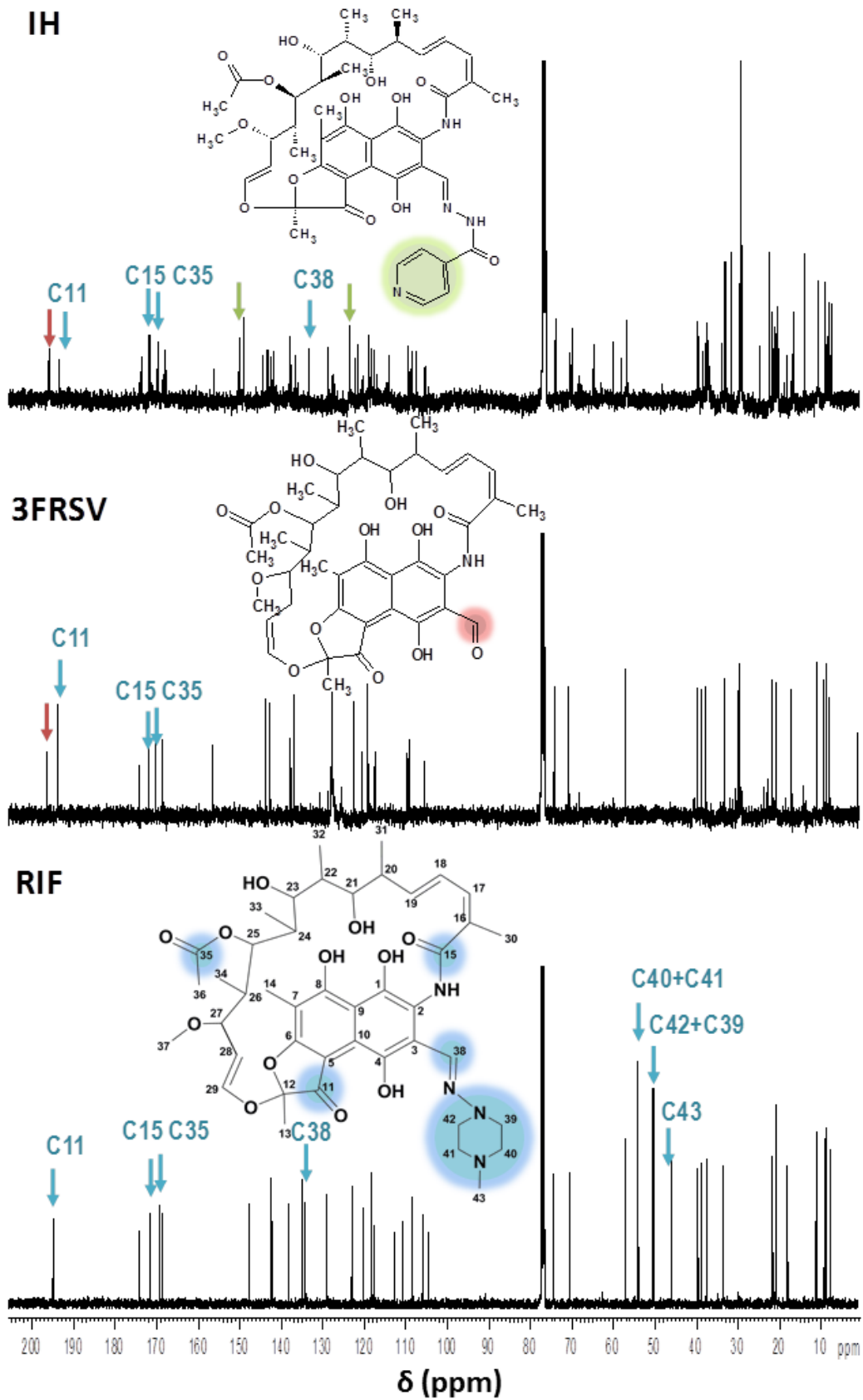


Figura 4.3. Espectros de RMN de ^{13}C de IH, 3FRSV y RIF. Las bandas propias a los carbonos de cada estructura química se destacan con flechas verdes (\downarrow) para IH, flechas rojas (\downarrow) para 3FRSV y flechas azules (\downarrow) para RIF.

4.4.1.3. HPLC

Como se muestra en la **Figura 4.4**, a partir de muestras conteniendo RIF, ISO, 3FRSV e IH pudieron identificarse por HPLC los cuatro analitos, a tiempos de retención relativos similares a los informados por Sankar et al. (4).

Los compuestos RIF, 3FRSV e IH se cuantificaron a 254 nm, ya que a esa longitud de onda existe una mayor diferencia entre la señal y el ruido. ISO se cuantificó a 215 nm para lograr una mejor resolución respecto del ácido ascórbico, el cual fue interferente a 254 nm.

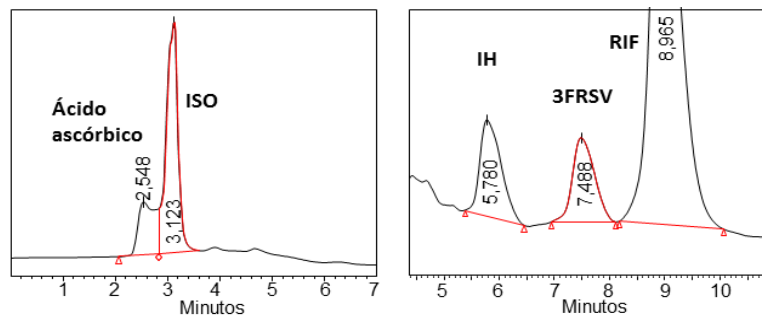


Figura 4.4. Cromatogramas de ISO (λ 215 nm), IH, 3FRSV y RIF (λ 254 nm).

El método de HPLC para la cuantificación de RIF fue selectivo porque, ante el agregado de concentraciones conocidas de ISO, 3FRSV e IH, las cantidades de RIF se cuantificaron con un EE% de 0,48%. Además, el método fue lineal (**Tabla 4.1**), preciso y exacto (**Tabla 4.2**) para todo el rango establecido. Como límite inferior de cuantificación se estableció la menor concentración de la curva de calibración (6 μ M), determinada con exactitud y precisión. Las muestras de RIF fueron estables por 36 h a temperatura ambiente (EE%= 0,02-13,44%). Sin embargo, no soportaron un ciclo de congelado, ya que las muestras sometidas a este ensayo presentaron un EE%>15%.

El método de HPLC para la cuantificación de ISO fue selectivo, ya que su cuantificación desde muestras enriquecidas, ya sea con ácido ascórbico o con RIF, 3FRSV e IH, presentaron valores de EE% de 1,02 y 0,50 %, respectivamente. Además, la cuantificación de ISO fue lineal en todo el rango establecido (**Tabla 4.1**), $R^2 > 0,99$, y los datos fueron precisos y exactos (**Tabla 4.2**). Se estableció como límite inferior de cuantificación la menor concentración de la curva de calibración (2 μ M), determinada con exactitud y precisión. Nótese que, a pesar de que la señal de ISO no vuelve a la línea de base, su cuantificación fue adecuada, en un amplio rango de concentraciones. Las muestras de ISO fueron estables hasta por 24 h a temperatura ambiente (EE%= 0,3-10,8%), pero no soportaron un ciclo de congelado, ya que las muestras sometidas a este ensayo presentaron un EE%>15%.

A partir de los datos de estabilidad de las muestras de RIF e ISO, se estableció que éstas no pueden ser congeladas y que la cuantificación conjunta de los fármacos debe realizarse dentro del plazo de estabilidad determinado (≤ 24 h).

Tabla 4.1. Resultados de linealidad del método de HPLC para la cuantificación de RIF, ISO, 3FRSV e IH.

Analito	R ²	Rango de concentraciones (μM)	Absortividad ($[\mu\text{M cm}]^{-1}$)
RIF	0,99998	6 a 979	34933
ISO	0,9927	2 a 758	6700,0
IH	0,9999	2,5 a 99,1	26651
3FRSV	0,9998	2,4 a 93,9	11062

Tabla 4.2. Resultados de precisión y exactitud del método de HPLC para la cuantificación de RIF, ISO, 3FRSV e IH en el rango evaluado (n=3). El método fue considerado preciso y exacto cuando el CV% es ≤ 15 % y el EE% es ≤ 15 %, respectivamente.

Analito	Concentración (μM)	Precisión		Exactitud (EE%)
		Repetibilidad intra-día (CV%)	Repetibilidad inter-día (CV%)	
RIF	6	1,4	1,2	0,9
	12	0,7	3,5	2,7
	26	1,1	3,2	2,4
	49	0,8	2,4	1,8
	196	0,1	2,3	1,8
	979	0,1	0,1	0,1
ISO	2	4,8	6,8	3,9
	5	5,4	0,2	1,9
	15	4,4	3,0	2,5
	38	2,2	1,3	1,2
	152	1,1	1,2	0,8
	758	2,0	2,0	1,3
3FRSV	2,4	11,68	14,21	8,63
	9,4	13,31	10,19	7,84
	18,8	4,38	4,08	2,82
	37,6	3,06	2,20	1,75
	93,9	0,03	0,03	0,02
IH	0,6	33,8	26,3	20,02
	2,5	9,8	15,2	8,35
	9,9	7,2	6,3	4,51
	19,8	1,2	1,4	0,88
	39,6	2,2	2,0	1,38
	99,1	0,7	0,7	0,45

El estándar obtenido de 3FRSV presentó una pureza del 96 %, superior a la de productos comerciales, cuya pureza informada es $\geq 90\%$. El 4 % contaminante correspondió a RIF (**Figura 5**), el cual es el reactivo de partida. Cabe destacar que esta cantidad no fue detectada por RMN.

Mediante la inyección de una solución conteniendo una cantidad exactamente pesada del estándar de IH obtenido, se observó la contaminación del sólido con 3FRSV y RIF, en porcentajes de 34,8 y 0,6 %, respectivamente (**Figura 4.5**). Por lo tanto, el 64,7% del sólido obtenido fue IH. Es de esperar que 3FRSV sea el contaminante mayoritario de IH debido a la reversibilidad de la reacción entre el producto (IH) y los reactivos de partida (3FRSV e ISO), favorecida por la disminución de los niveles de ISO en el proceso de purificación de IH.

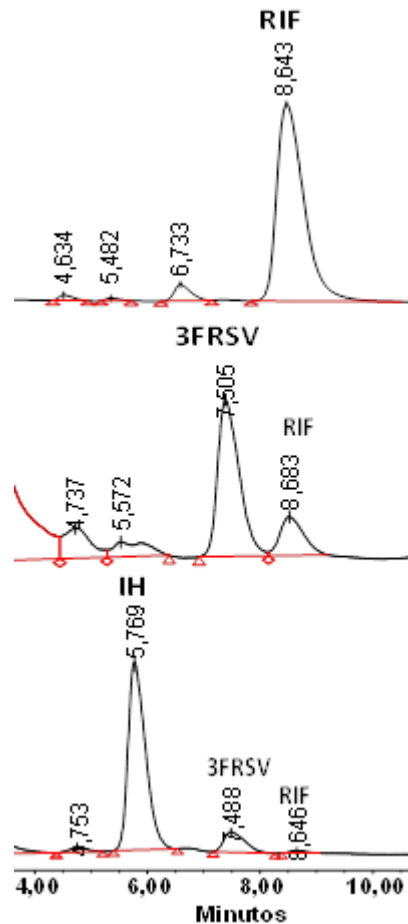


Figura 4.5. Cromatogramas de HPLC de RIF, 3FRSV e IH. RIF es la principal impureza en 3FRSV, mientras que 3FRSV es la principal impureza en IH.

El método de cuantificación de 3FRSV fue lineal (**Tabla 4.1**), preciso y exacto (**Tabla 4.2**) en el rango entre 2,4 a 93,9 μM . Esta concentración de 3FRSV es equivalente a la degradación de

RIF entre el 1,2 y el 46,4 %. Este rango de degradación es consistente con lo informado para ensayos de degradación de RIF en similares condiciones (4). El límite inferior de cuantificación que se estableció fue de 2,4 μM , por ser la menor concentración de la curva de calibración determinada con exactitud y precisión.

El método de cuantificación de IH fue lineal (**Tabla 4.1**), preciso y exacto (**Tabla 4.2**) en el rango entre 2,5 a 99,1 μM . Esta concentración de IH es equivalente a la degradación de RIF entre el 1,2 y el 48,9 %. Al igual que en el caso de 3FRSV, el rango de degradación fue consistente con lo informado para ensayos de degradación de RIF en similares condiciones (4). El límite inferior de cuantificación fue de 2,5 μM , dado a que muestras de concentraciones menores presentaron CV% y EE% >15%.

4.4.2. VALORACIÓN DE RIF DESDE LAS FORMULACIONES

Como se mencionó previamente, las formulaciones comerciales en CDF de RIF+ISO pueden seguir las especificaciones de distintas farmacopeas, las que proponen diferentes rangos de cantidades para el contenido de RIF. Por lo tanto, se hace imprescindible valorar las formulaciones utilizadas para conocer cuánta es la cantidad de RIF a tiempo cero en el ensayo de estabilidad. En la **Tabla 4.3** se informan los resultados obtenidos. Nótese que todos los sistemas tienen un contenido de RIF entre 90 y 110 %.

Tabla 4.3: Contenido de RIF en las formulaciones estudiadas.

Sistema	Contenido teórico	Valoración de RIF (% dosis)
CMC-RIF	300 mg RIF	94,0
RIFINAH®	300 mg RIF + 150 mg ISO	104,6
RIFADIN®	300 mg RIF	101,1

4.4.2.1. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE RIF EN MEDIO ÁCIDO

Los resultados de este estudio demostraron que RIF, en las matrices de CMC-RIF asociadas a AA-ISO₇₅-Na₂₅, presentó una significativa reducción en la degradación en relación a la observada en las formulaciones convencionalmente disponibles, especialmente respecto de RIFINAH.

El ensayo de disolución es comúnmente utilizado para determinar el desempeño en la liberación de un fármaco desde una dada forma farmacéutica sólida. En esta instancia, se utilizó para determinar, adicionalmente, la cantidad de 3FRSV e IH formado en función del tiempo, en condiciones que simulaban el entorno gástrico. Cabe destacar que estas

condiciones fueron de máxima exigencia, ya que la permanencia de los principios activos en medio ácido fue forzada para que la degradación sea máxima.

La solución de RIF+ISO, que no sufrió proceso de disolución, es la referencia de la degradación producida exclusivamente por la co-exposición de los fármacos. En el caso de las formulaciones, los procesos de disolución y la interacción con excipientes, pueden modificar el grado de degradación.

La **Figura 4.6** muestra los perfiles de liberación de RIF e ISO y de formación de 3FRSV e IH en función del tiempo.

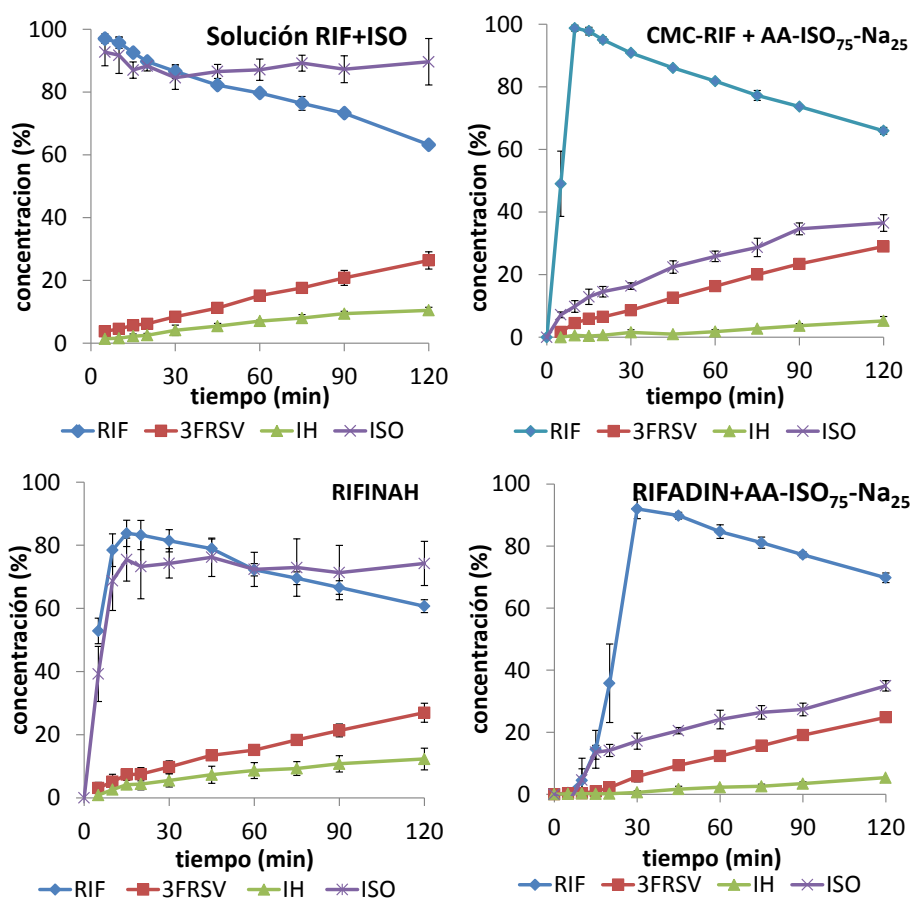


Figura 4.6. Concentración de RIF, ISO, 3FRSV e IH en función del tiempo, cuando los sistemas estudiados se liberan en una solución de HCl/KCl, pH 1,20. Cada curva representa la media \pm EE del sextuplicado de ensayos.

A partir de estos perfiles, se calculó la relación entre las integrales de la concentración de RIF y la concentración de IH en función del tiempo, que se resumen en la **Tabla 4.4**. Adicionalmente, se determinó la cantidad de 3FRSV e IH formados y cantidad de RIF degradada a los 30 min y 2 h de ensayo (**Figura 4.7**).

El tiempo de 30 min se seleccionó considerando que la absorción de RIF ocurre principalmente en el estómago (8,21). Por lo tanto, la cantidad de productos de degradación formada a 30 min de exposición en medio ácido es una representación más cercana a lo que ocurre *in vivo*. Además se consideró comparar los niveles de productos de degradación formados al cabo de 2 h, porque es el tiempo máximo de residencia gástrica promedio, y, por lo tanto, es la máxima degradación que puede sufrir RIF en esas condiciones.

Tabla 4.4. Relación entre las integrales de la concentración de RIF y la concentración de IH en función del tiempo, luego de 2 h de ensayo.

Sistema	$\int_{t=0}^{t=2\text{ h}} [RIF] / \int_{t=0}^{t=2\text{ h}} [IH]$
Solución RIF+ISO	12,50
CMC-RIF + AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	34,41
RIFINAH®	8,91
RIFADIN® + AA-ISO ₇₅ -Na ₂₅	30,51

Tal como puede observarse en la **Tabla 4.4**, CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅ y RIFADIN® + AA-ISO₇₅-Na₂₅ presentaron una relación de áreas de concentración de RIF vs IH de 3,8 y 3,4 veces mayor a RIFINAH. Esto demuestra que, donde la liberación de ISO fue segregada respecto a RIF, la proporción de IH formada fue significativamente menor. De hecho, tanto a los 30 min como a las 2 h de ensayo, las matrices CMC-RIF+ AA-ISO₇₅-Na₂₅ y las cápsulas RIFADIN® asociadas a AA-ISO₇₅-Na₂₅ presentaron niveles de IH significativamente menores a los observados en la solución de RIF+ISO ($p < 0,05$). Por el contrario, RIFINAH® presentó valores similares estadísticamente a los observados para la solución de RIF+ISO.

Los niveles de 3FRSV, a los 30 min y a las 2 h de ensayo (**Figura 4.7**), fueron similares en todos los sistemas estudiados respecto de la solución de RIF+ISO ($p > 0,05$). Esto se relacionó con las condiciones estáticas del ensayo, donde la descomposición de RIF hacia 3FRSV estuvo favorecida.

Además, los niveles de RIF en CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ y en RIFINAH fueron similares a los de la solución de RIF+ISO al cabo de 2 h. Para RIFADIN+AA-ISO₇₅-Na₂₅ la cantidad de RIF remanente fue mayor, lo cual estuvo asociado a la liberación lenta de RIF desde este sistema.

A los 30 min, la cantidad total de productos de degradación formados en CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ fue de 9,6 %. En RIFINAH, esta cantidad fue 65 % mayor ($p < 0,05$), ya que esta cifra se

incrementó al 15,8 %. Por lo tanto, en el sistema de matrices la estabilidad de RIF estuvo incrementada.

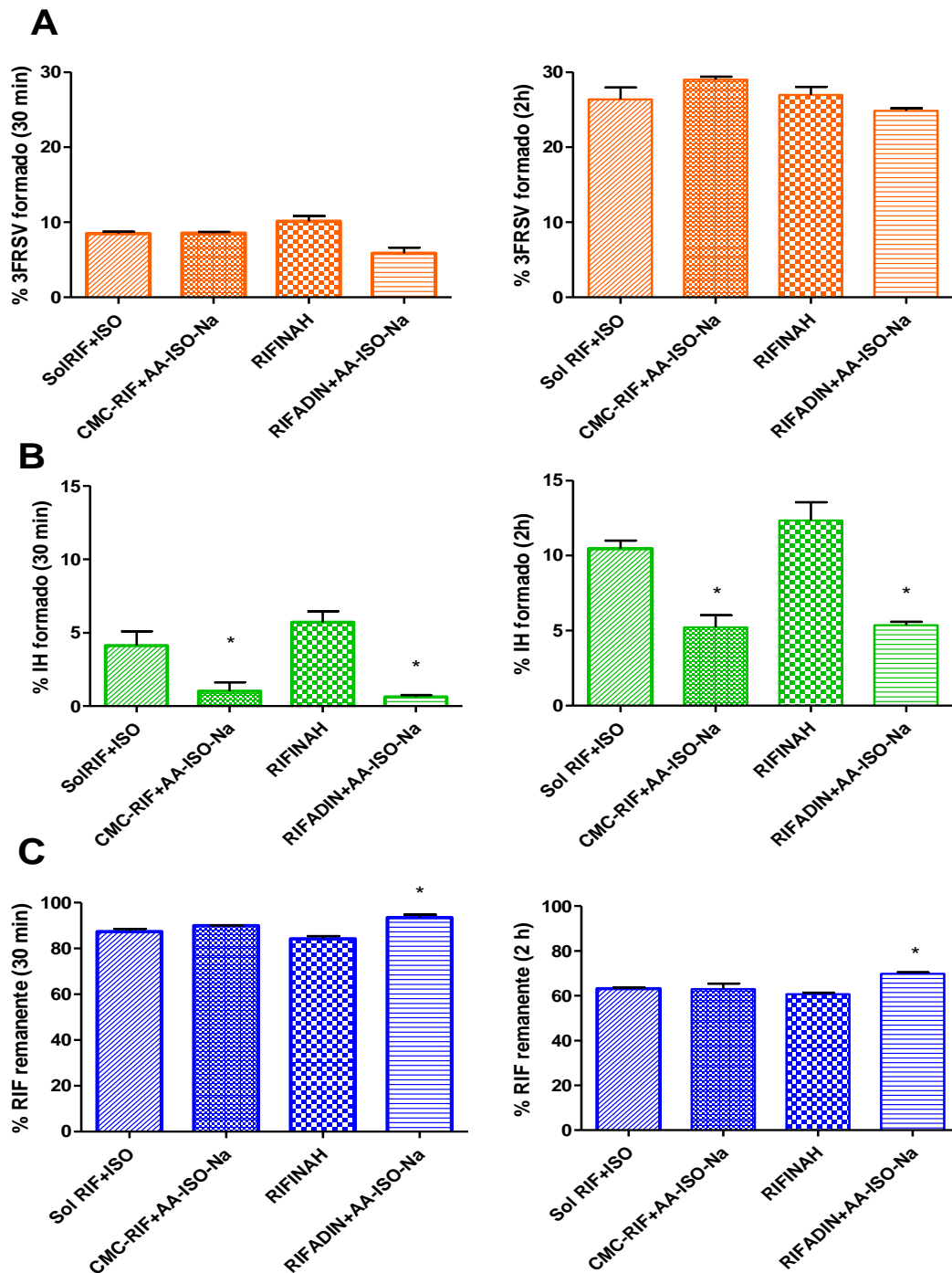


Figura 4.7: Concentración porcentual de 3FRSV (A) e IH (B) formados y RIF (C) remanente en solución reguladora de pH 1,20 al cabo de 30 min y 2 h de ensayo. Las columnas referenciadas con * presentan diferencias significativas respecto a la solución de RIF+ISO (p<0,05).

4.5. DISCUSIÓN

3FRSV e IH fueron obtenidos y caracterizados, confirmándose su identidad y pureza, así como también el grado y tipo de sustancias contaminantes, de manera que los productos obtenidos fueron confiables para su uso como estándares en la validación del método analítico indicativo de estabilidad.

A partir de un método de HPLC previamente descrito para la cuantificación de RIF e ISO, se pudo validar la metodología de cuantificación conjunta de RIF, ISO, 3FRSV e IH, necesaria para la cuantificación de las muestras del ensayo de estabilidad de RIF en medio ácido. El método fue selectivo, lineal, preciso y exacto en los rangos establecidos para cada analito.

Mediante la preparación de soluciones enriquecidas con sustancias potencialmente interferentes, se determinó la selectividad del método para RIF e ISO. En el caso de los productos de degradación, el equilibrio de formación reversible (**Figura 4.1**) no permite descartar que el agregado de IH, conlleve al incremento en la concentración de 3FRSV, cuando se preparan soluciones a partir de los estándares. Sin embargo, en las condiciones del ensayo de estabilidad, se han cuantificado los cuatro analitos en condiciones de equilibrio, lo que garantiza la confiabilidad de los resultados.

Finalmente, en vista de que las muestras fueron inestables tras el proceso de congelamiento, la cuantificación se realizó dentro del plazo de 24 h posterior a la obtención de las muestras.

Mediante el estudio de estabilidad, se pudo comprobar que la formación de IH estuvo relacionada a la concentración de ISO en el medio de disolución. RIFINAH presentó alta y similar proporción disuelta de ambos fármacos, y tuvo una mayor tendencia de formación de IH. A diferencia de esta formulación, las matrices de CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ con alto porcentaje de RIF disuelto y bajos niveles de ISO, presentó menor formación de IH, que dió en consecuencia, menor degradación de RIF.

De manera análoga a éste trabajo, Avachat y Bhise (22) evaluaron la estabilidad de RIF a pH 1,20, 2,00 y 3,00 en presencia de diferentes proporciones de ISO y determinaron que la combinación de RIF: ISO en proporciones menores o iguales a 1:0,25 no afectaba la degradación de RIF a los 30 min. A mayor tiempo y proporción de ISO se ve un aumento significativo en la degradación de RIF. Las matrices CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ proponen una liberación *in vitro* que, a los 30 min, presenta una relación de concentración RIF:ISO de 1:0,24,

lo cual confirma que la proporción de ISO disuelta no afecta significativamente la degradación de RIF.

RIFADIN mostró menor degradación de RIF al cabo de 2 h. Sin embargo, esto se vinculó con la baja velocidad de disolución de RIF, que presentó una concentración máxima a los 30 min, de manera que se redujo el tiempo de exposición de RIF al medio ácido en las condiciones del ensayo. Otros autores han obtenido formulaciones en CDF con baja velocidad de disolución de RIF en medio ácido, que demuestran mejorar la estabilidad *in vitro* de RIF (20,23–25). Sin embargo, sistemas con este desempeño no son deseables, ya que se ha reportado que la disolución completa de RIF en medio ácido es crítica para su adecuada biodisponibilidad (8,26).

A pesar de que varios autores han sostenido que para mejorar la biodisponibilidad de RIF es necesario que la liberación de RIF sea inmediata y segregada de la liberación de ISO (1–3), existen escasos reportes de desarrollo de este tipo de formulaciones (25,27,28), y sólo algunos evalúan la estabilidad *in vitro* de RIF.

Krishna et al. (25) determinaron que el porcentaje de RIF remanente al cabo de 2 h en HCl 0,1M se incrementó un 11 % cuando se evaluó la estabilidad de un comprimido de RIF (600 mg) asociado a un comprimido de ISO (300 mg) con cubierta entérica en comparación con el mismo comprimido de ISO sin cubierta entérica. Sin embargo, el diseño experimental planteado presenta varios puntos deficientes, entre los que se destacan en primer lugar, que la formulación obtenida presenta un desempeño biofarmacéutico de RIF por debajo del límite de aceptación de USP (75%), ya que el porcentaje de RIF disuelto al cabo de 45 min fue de 59%. En segundo lugar, el método de cuantificación es por espectrofotometría UV-visible a 336 nm, el cual no permite separar los principios activos disueltos ni discriminar la cuantificación entre RIF y los productos de degradación formados.

Mediante este estudio, se ha determinado con alta especificidad que las matrices CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ mejoran la estabilidad de RIF en medio ácido, disminuyendo significativamente los niveles de IH formados respecto a las formulaciones comerciales, por reducción de la interacción entre RIF e ISO. Además, CMC-RIF tiene una muy rápida velocidad de disolución en medio ácido, lo que asegura una mayor disponibilidad en el sitio de absorción.

Cabe destacar que la dinámica de degradación de RIF *in vivo* puede ser diferente, debido a múltiples factores. En primer lugar, el organismo se encuentra en un estado dinámico, por lo que hay un continuo ingreso y eflujo de fluidos gástricos que modifican el pH del medio. Adicionalmente, tanto RIF como ISO pueden estar sometidas a procesos de disolución y

absorción, de manera que la proporción de los dos fármacos puede estar cambiando en relación a su diferente velocidad de absorción. Finalmente, una porción de los fármacos podría pasar al intestino, lo que modifica su concentración en estómago (22). Por ello el estudio farmacocinético del sistema de matrices CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ en un modelo animal es una herramienta para evidenciar si la estrategia de segregación planteada mejora la biodisponibilidad de RIF.

4.6. CONCLUSIONES

Se validó una metodología de cuantificación conjunta de RIF, ISO, 3FRSV e IH, útil para la evaluación de la estabilidad en medio ácido de las diferentes formulaciones a desarrollar.

La reducción de la coexposición de RIF e ISO en el medio ácido, lograda por la asociación de matrices CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅, permitió reducir la formación de IH, que trae como consecuencia una menor degradación de RIF asociada a ISO.

Este aumento de estabilidad en las matrices CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅, junto con la mayor velocidad de disolución de RIF en CMC-RIF, debería reflejarse en una mayor biodisponibilidad de RIF en este sistema multiunitario.

4.7. REFERENCIAS

1. Singh S, Mariappan TT, Shankar R, Sarda N, Singh B. A critical review of the probable reasons for the poor/variable bioavailability of rifampicin from anti-tubercular fixed-dose combination (FDC) products, and the likely solutions to the problem. *Int J Pharm.* 2001;228(1–2):5–17.
2. Shishoo CJ, Shah SA, Rathod IS, Savale SS, Vora MJ. Impaired bioavailability of rifampicin in presence of isoniazid from fixed dose combination (FDC) formulation. *Int J Pharm.* 2001;228(1–2):53–67.
3. Singh S, Bhutani H, Mariappan TT. Quality Problems of Anti-Tuberculosis Fixed-Dose Combinations (Fdcs): a Way Forward. *Indian J Tuberc.* 2006;53:201–5.
4. Sankar R, Sharda N, Singh S. Behavior of Decomposition of Rifampicin in the Presence of Isoniazid in the pH Range 1–3. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2003;29(7):733. Available from: <http://ezproxy.lib.vt.edu:8080/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=bth&AN=10223024&site=ehost-live&scope=site>
5. Singh S, Mariappan TT, Sharda N, Kumar S, Chakraborti AK. The reason for an increase in decomposition of rifampicin in the presence of isoniazid under acid conditions. *Pharm Pharmacol Commun.* 2000;6(9):405–10.
6. Prasad B, Singh S. LC-MS/TOF and UHPLC-MS/MS study of in vivo fate of rifamycin isonicotinyl hydrazone formed on oral co-administration of rifampicin and isoniazid. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;52(3):377–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.014>
7. Shishoo CJ, Shah S a., Rathod IS, Savale SS, Kotecha JS, Shah PB. Stability of rifampicin in dissolution medium in presence of isoniazid. *Int J Pharm.* 1999;190(1):109–23.
8. Mariappan TT, 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.
9. Blomberg B, Spinaci S, Fourie B, Laing R. The rationale for recommending fixed-dose combination tablets for treatment of tuberculosis. *Bull World Health Organ.* 2001;79(1):61–8.
10. Pillai G, Fourie PB, Padayatchi N, Onyebujoh PC, McIlhleron H, Smith PJ, et al. Recent bioequivalence studies on fixed-dose combination anti-tuberculosis drug formulations available on the global market. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 1999;3(11 Suppl 3):S309–NaN–S321. Available from: <http://www.ingentaconnect.com/content/iuatld/ijtd/1999/00000003/A00311s3/art00008?token=004a17314548231275c277b42573a6766763f3425702a6e6d592f653b2a2d3a7c4e724770d>
11. Agrawal S, Panchagnula R. Dissolution test as a surrogate for quality evaluation of rifampicin containing fixed dose combination formulations. *Int J Pharm.* 2004;287(1–2):97–112.
12. Olivera ME, Ramirez Rigo MV, Romañuk CB, Lopez C. FARMACOTERAPIA DE LA TUBERCULOSIS (TB). EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y BIOEQUIVALENCIA DE LOS

- MEDICAMENTOS ANTI-TB PROVISTOS POR EL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA TB DURANTE EL TIEMPO DE ABASTECIMIENTO. DESARROLLO DE NUEVOS SISTEMAS FARMACOTERAPÉUTICOS. Córdoba, Argentina; 2010.
13. U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry. Drug Stability Guidelines. Food and Drug Administration Center; 2008.
 14. Liu J, Sun J, Zhang W, Gao K, He Z. HPLC determination of rifampicin and related compounds in pharmaceuticals using monolithic column. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;46(2):405–9.
 15. Mohan B, Sharda N, Singh S. Evaluation of the recently reported USP gradient HPLC method for analysis of anti-tuberculosis drugs for its ability to resolve degradation products of rifampicin. *J Pharm Biomed Anal.* 2003;31(3):607–12.
 16. Sorokoumova GM, Vostrikov V V., Selishcheva a. a., Rogozhkina E a., Kalashnikova TY, Shvets VI, et al. Bacteriostatic activity and decomposition products of rifampicin in aqueous solution and liposomal composition. *Pharm Chem J.* 2008;42(8):475–8.
 17. WHO Department of Essential Medicines and Health Products. The International Pharmacopoeia [internet] [Internet]. 6th ed. World Health Organization; 2016. Available from: <http://apps.who.int/phint/en/p/about/>
 18. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia, The National Formulary [USP 39 NF 34]. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2016.
 19. FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [Internet]. 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
 20. Singh H, Bhandari R, Kaur IP. Encapsulation of Rifampicin in a solid lipid nanoparticulate system to limit its degradation and interaction with Isoniazid at acidic pH. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;446(1–2):106–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.012>
 21. Becker C, Dressman JB, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Rifampicin. *J Pharm Sci.* 2009;98(7):2252–67.
 22. Avachat AM, Bhise SB. Tailored release drug delivery system for rifampicin and isoniazid for enhanced bioavailability of rifampicin. *Pharm Dev Technol* [Internet]. 2011;16(2):127–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105081>
 23. Gohel M, Sarvaiya K, Nagori S. Design and evaluation of novel solid dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *Indian J Pharm Educ Res* [Internet]. 2010;8(3):E68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17915818>
 24. Gohel MC, Sarvaiya KG. A novel dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *AAPS PharmSciTech.* 2007;44(1):22–7.
 25. Vamshi Krishna T, Girish Pai K, Naveen D, Reddy Sreenivasa M. Rifampicin and Isoniazid With Improved Rifampicin Stability. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013;5:431–3.
 26. Agrawal S, Ashokraj Y, Bharatam PV, Pillai O, Panchagnula R. Solid-state

characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance. *Eur J Pharm Sci.* 2004;22(2–3):127–44.

27. Silva A, Abrahim-Vieira B, do Carmo F, do Amaral L, Silva L, Escudini C, et al. Segregated Delivery of Rifampicin and Isoniazid from Fixed Dose Combination Bilayer Tablets for the Treatment of Tuberculosis. *Br J Pharm Res* [Internet]. 2014;4(14):1781–801. Available from: <http://www.sciencedomain.org/abstract.php?iid=593&id=14&aid=5386>
28. Panacea Biotec. Xeed [Internet]. 2000 [cited 2016 Jan 2]. Available from: <http://www.panaceabiotec.com/licensing/XEED.pdf>

CAPÍTULO 5

BIODISPONIBILIDAD ORAL DE MATRICES HIDROFÍLICAS POLIELECTROLITO-FÁRMACO DE CMC- RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅

5.1. INTRODUCCIÓN

Las matrices hidrofílicas de CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅ previamente caracterizadas, mostraron propiedades de liberación convenientes para el diseño de formulaciones de administración oral con cinética múltiple para liberación inmediata de RIF en estómago y sostenida de ISO en intestino (1,2). La reducción de la co-exposición indeseada de los fármacos se tradujo en un aumento de la estabilidad de RIF en medio ácido. Esto puede incidir favorablemente en la biodisponibilidad y estabilidad *in vivo* de RIF al administrar la CDF innovadora.

Por lo expuesto, resulta interesante explorar el desempeño *in vivo* de los productos desarrollados, en comparación con la formulación de referencia, por lo que, una opción adecuada es la determinación de la biodisponibilidad oral de RIF e ISO mediante perfiles de exposición sistémica en un modelo animal sano.

La evaluación farmacocinética requiere la utilización de metodologías bioanalíticas validadas. En este caso, a diferencia de los métodos analíticos, se necesita determinar la estabilidad y el porcentaje de recuperación desde la matriz biológica seleccionada.

5.1.1. OBJETIVOS

El objetivo de esta parte del trabajo es explorar la exposición sistémica de las matrices de CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅ y compararla con la CDF de referencia.

A tales fines, resulta necesario:

- Disponer de una metodología bioanalítica validada para la cuantificación de RIF e ISO desde plasma.

- Realizar un ensayo farmacocinético en animales de experimentación, mediante la administración oral de las matrices de CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ en comparación a la CDF de referencia.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RIF E ISO DESDE PLASMA

5.2.1.1. REACTIVOS

RIF e ISO de grado farmacéutico, fueron adquiridos en Parafarm® (Argentina) y Droguería Libertad (Argentina), respectivamente. El plasma humano fue gentilmente donado por el Laboratorio de Hemoderivados. Como estándares internos se utilizaron rifamicina (RIM) y atenolol (AT) grado farmacéutico, adquiridos en Parafarm® (Argentina). Para el procesamiento de las muestras y la cuantificación por HPLC se usó acetonitrilo (grado HPLC, Sintogran, Argentina), metanol (grado HPLC, Sintogran, Argentina) y agua calidad Milli Q. Los demás reactivos fueron calidad pro-análisis.

5.2.1.2. INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Las muestras fueron analizadas por HPLC (Waters 1525 pump), con horno termostatazador para columnas (Waters 1500 series *column heater*) y con un inyector automático (Waters 717 plus autosampler) acoplado a un detector PDA UV (PDA detector 2296). Para el procesamiento de los datos fue utilizado el software Empower® y Microsoft Excel® (versión 2010).

5.2.1.3. METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN DE RIF

Como fase móvil se utilizó metanol y solución reguladora de fosfato de potasio¹ pH=7 (75:25). Como estándar interno se utilizó RIM. La columna utilizada fue C18 de fase reversa (Phenomenex, Luna®; 250 x 4.6 mm; 5 µm de tamaño de partícula) con guardacolumna (Phenomenex®). La velocidad de flujo fue de 0,5 mL/min y la temperatura del horno fue de 30 °C.

¹Solución reguladora de fosfato de potasio: fosfato monobásico de potasio 0,02M ajustado a pH 7,0 con NaOH 1M

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se prepararon soluciones de trabajo de RIF en agua destilada, en concentraciones entre 0,16 y 200,00 µg/mL, que se utilizaron para ser adicionadas en alícuotas de 100 µL a 500 µL de plasma blanco, junto con 200 µL de agua Milli Q, 50 µL de solución de RIM (0,1%), 50 µL de solución de ácido ascórbico (0,5 %) y 1 mL de acetonitrilo. Adicionalmente se preparó una muestra cero (M cero), conteniendo la cantidad informada de cada componente, excepto RIF, y una muestra blanco (M blanco) que además no contuvo RIM.

Las muestras fueron agitadas con vortex durante 30 segundos y posteriormente centrifugadas a 120 Hz durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado utilizando membranas milipore de 0,45 µm. Cien microlitros fueron inyectados en el cromatógrafo y se registró el cromatograma a la longitud de onda de máxima de absorción ($\lambda = 339$ nm). La concentración de RIF en cada solución plasmática se informa en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1: concentración de RIF en las soluciones de plasma de la curva de calibración.

Concentración de RIF (µg/mL):	
0,03	Baja
0,08	
0,16	
0,31	
1,51	Media
4,68	
7,56	Alta
37,80	

5.2.1.4. METODOLOGÍA DE CUANTIFICACIÓN DE ISO

Se utilizaron las metodologías descritas por Gupta (3) y Agrawal et al. (4) con modificaciones menores. Se utilizó como fase móvil metanol: agua: ácido perclórico 70 % v/v: hidróxido de tetrabutylamonio 40 % v/v (20:80:0,05:0,05, v/v). AT se seleccionó como estándar interno. La columna utilizada fue C8 de fase reversa (Phenomenex, Luna®; 250 x 4.6 mm; 5 µm de tamaño de partícula) con guardacolumna (Phenomenex®). La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y la temperatura del horno fue de 25 °C.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se prepararon soluciones de trabajo de ISO en agua destilada, en concentraciones entre 0,57 y 230,00 µg/mL, que se utilizaron para ser adicionadas en alícuotas de 100 a 250 µL plasma blanco, junto con 100 µL de AT (0,16 % p/v), 200 µL de p-hidroxibenzaldehído (1,5 % p/v), 400 µL de solución de ácido trifluoroacético 10 % v/v y 1 mL de metanol. Adicionalmente se preparó una muestra cero (M cero), conteniendo la cantidad informada de cada componente, excepto ISO, y una muestra blanco (M blanco) que tampoco contuvo AT.

Las muestras fueron agitadas con vortex durante 30 segundos y posteriormente centrifugadas a 120 Hz durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado utilizando membranas milipore 0,45 µm. Cien microlitros fueron inyectados en el cromatógrafo y se registró el cromatograma a la longitud de onda de máxima de absorción ($\lambda = 273$ nm). La concentración de cada solución plasmática se informa en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2: concentración de ISO en las soluciones de plasma de la curva de calibración.

Concentración de ISO (µg/mL):	
0,18	Baja
0,89	
3,57	
8,92	Media
17,84	
35,68	Alta
71,36	
178,40	

5.2.2. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Se evaluó la selectividad, la precisión, la exactitud, la linealidad de la respuesta y el límite de cuantificación, la recuperación desde la matriz biológica y la estabilidad de las muestras. Los criterios de aceptación fueron los establecidos por la Guía de la Industria para la validación de métodos bioanalíticos(FDA) (5).

La *selectividad* fue determinada a través del análisis por triplicado de las M blanco, en comparación con muestras de la curva de calibración de la concentración más baja. Adicionalmente se determinó la *resolución (R)* como medida de separación entre los picos de interés, utilizando la siguiente ecuación:

$$R = \left| \frac{2 * (t_{rA} - t_{rEI})}{w_A - w_{EI}} \right|$$

Donde t_{rA} y t_{rEI} son los tiempos de retención relativos (en minutos) y w_A y w_{EI} son el ancho de pico (en minutos) del analito de interés (RIF o ISO) y su estándar interno, respectivamente.

La *exactitud* y la *precisión*, expresada como la repetibilidad interdía, fueron determinadas mediante un quintuplicado de soluciones plasmáticas a tres concentraciones (0,08, 1,51 y 37,80 µg/mL de RIF; 3,57, 17,84 y 71,36 µg/mL de ISO). Como límite de aceptación se consideró un error estándar (EE) $\leq 15\%$ para la exactitud y un coeficiente de variación (CV) $\leq 15\%$ para la precisión.

La *linealidad* de las curvas de calibración que relacionaron respuestas (áreas) con la concentración de RIF e ISO en plasma fue analizada calculando el coeficiente de correlación (R^2) y la desviación estándar (SD) del factor de respuesta para cada estándar. El intervalo de concentración de trabajo se estableció sobre reportes bibliográficos de niveles plasmáticos de los fármacos en ratas (6,7). El límite inferior de cuantificación (LIC) fue calculado como la mínima concentración de analito que resultara incluida en el rango de linealidad determinado, con un error estándar (EE) $\leq 20\%$.

Para determinar el porcentaje de *recuperación* de los analitos se prepararon muestras plasmáticas, conteniendo 1,67 y 41,79 $\mu\text{g/mL}$ de RIF y 4,41 y 88,11 $\mu\text{g/mL}$ de ISO. Las áreas de RIF e ISO obtenidas de éstas muestras, se compararon contra soluciones acuosas de RIF e ISO, de igual concentración, las que representaron la recuperación del 100% de cada fármaco.

Estabilidad

Se determinó la estabilidad luego de tres ciclos de congelado/descongelado, a corto plazo y post-preparativa.

La *estabilidad luego de tres ciclos de congelado-descongelado* fue determinada utilizando soluciones de plasma de concentración 1,67 y 41,79 $\mu\text{g/mL}$ para RIF y 4,41 y 88,11 $\mu\text{g/mL}$ para ISO. Las muestras fueron cuantificadas por triplicado a tiempo cero y luego de 1, 2 y 3 ciclos de congelado/descongelado. A tiempo cero, a continuación de tomar una alícuota para la cuantificación, el plasma enriquecido fue separado en tubos Eppendorf de 2 mL y congelado a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Luego de 24 h, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron al abrigo de la luz por aproximadamente 1h para asegurar el equilibrio de temperatura. Inmediatamente después, se tomó una alícuota que se procesó y cuantificó (primer ciclo de congelado/descongelado). Este ciclo se repitió dos veces, completando el segundo y el tercer ciclo de congelado/descongelado.

La *estabilidad a corto plazo* fue determinada a partir de las muestras de plasma de concentración 1,67 y 41,79 $\mu\text{g/mL}$ para RIF y 4,41 y 88,11 $\mu\text{g/mL}$ para ISO. Tras un ciclo de congelado/descongelado, las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 6 h (tiempo previsto para la duración del procesamiento de las muestras de cada día) y se cuantificaron por HPLC ($n=3$).

La *estabilidad post preparativa*, consistente en determinar el tiempo de residencia de las muestras en el inyector automático, se determinó a las 24 h posteriores al procesamiento,

sobre las soluciones preparadas a partir del plasma enriquecido con RIF o ISO, de concentración 1,67 y 41,79 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para RIF y 4,41 y 88,11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ISO.

Se compararon las respuestas obtenidas para las muestras frescas y las sometidas a los estudios de estabilidad, el parámetro de aceptación fue el EE menor al 15%.

5.2.3. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LAS MATRICES CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅

El estudio farmacocinético se realizó en el Hospital Veterinario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba (UCC) (**Figura 5.1**), en colaboración con el Dr. Nicolás Litterio y su grupo de investigación. El protocolo de trabajo estuvo aprobado por el comité de Bioética y Bienestar Animal (Ref CBBA 08.2014UCC).



Figura 5.1. Hospital Veterinario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCC , en la instancia de realización del estudio farmacocinético de las matrices CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅.

5.2.3.1. MODELO ANIMAL

El modelo animal seleccionado fue el perro, por su capacidad de deglutir comprimidos enteros, de contar con una volemia suficiente para el muestreo, ser ampliamente utilizado en ensayos farmacocinéticos y estar disponible. Los sujetos fueron perros sanos ($n=6$), de edad entre 3 y 6 años, con masa corporal de 15 ± 3 kg, libres de endo y ectoparásitos, mestizos, machos y hembras castradas.

El diseño del ensayo fue cruzado de dos ramas (**Figura 5.2**), en el cual los animales divididos en dos grupos (de $n=3$) recibieron una dosis única de RIFINAH® (tratamiento control) o matrices CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅ (tratamiento problema) en concentración de 5 y 2,5 mg/kg de RIF e

ISO y se sometieron a un muestreo durante 24 h. Luego de un período de lavado de 15 días, se invirtió el tratamiento de los grupos, y se realizó un idéntico esquema de muestreo.

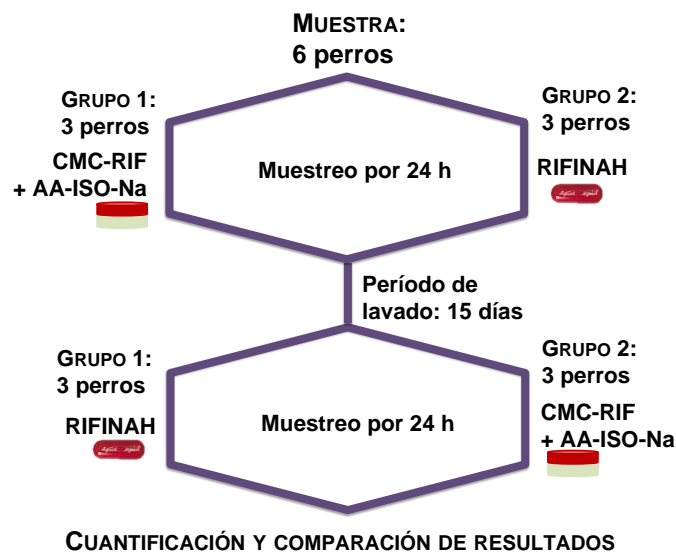


Figura 5.2. Esquema del diseño experimental: cruzado y de dos ramas.

Para contener la dosis según el peso de cada sujeto, las formulaciones originales se adaptaron mediante proporcionalidad de dosis, lo que aseguró el mantenimiento de la misma proporción de excipientes y fármacos. Estas formulaciones adaptadas fueron sometidas a ensayos de disolución en medios biorrelevantes, que corroboraron previamente, que el desempeño biofarmacéutico fuese idéntico al de las formulaciones originales.

5.2.3.2. ADMINISTRACIÓN Y MUESTREO

Las formulaciones se administraron colocándolas en la base de la lengua del perro, y se verificó que no fueran masticadas previo a su deglución.

Utilizando jeringas heparinizadas, se extrajeron muestras de sangre (3mL) de la vena yugular a los 0, 10, 20, 30 y 45 minutos, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h post-administración. Las muestras fueron centrifugadas a 48 Hz y el plasma obtenido fue congelado a -20 °C para su posterior procesamiento y análisis por HPLC.

5.2.3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS

Para el procesamiento de las muestras se procedió de similar manera respecto a lo descrito en las secciones 5.2.1.3. y 5.2.1.4 (*Procesamiento de las muestras plasmáticas para la curva de calibración*), reemplazando el volumen de solución de trabajo de RIF o ISO por un volumen equivalente de agua Milli Q.

5.2.3.4. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

A partir de los perfiles plasmáticos en función del tiempo se determinaron los puntos estadísticamente atípicos (*outliers*), mediante el test de Dixon y se evaluó la normalidad de los datos (test de Shapiro-Wilks; $p < 0,05$) (8). Se determinaron los parámetros farmacocinéticos tales como ABC_{0-24} , $ABC_{0-\infty}$, C_{max} y t_{max} , mediante un modelo no compartimental, PK Solutions 2.0 (Summit Research Services, OH, USA).

Se compararon estadísticamente el ABC y C_{max} de los tratamientos mediante un test de student apareado unilateral ($\alpha = 0,95$) y mientras que para el t_{max} se utilizó la prueba de Wilcoxon para muestras apareadas ($\alpha = 0,95$) (8).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE RIF E ISO DESDE PLASMA

5.3.1.1. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE RIF

El método desarrollado en esta etapa surgió como modificación del método validado en el Capítulo 4. La reducción del flujo de 1 a 0,5 mL/min permitió una mejor resolución de RIF respecto a RIM, manteniendo la simetría de los picos.

SELECTIVIDAD

Mediante la comparación de M blanco con muestras de plasma enriquecidas con RIF y RIM (**Figura 5.3**), se confirmó ausencia de interferencias provenientes de la matriz biológica por debajo del límite de cuantificación. RIF fue adecuadamente resuelta respecto a RIM, con una $R=6,5$.

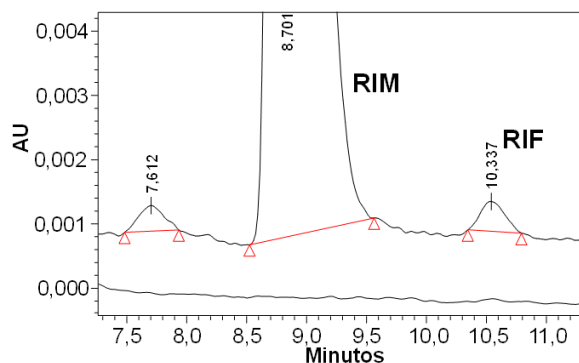


Figura 5.3. Cromatogramas de la solución en plasma de RIF (0,076 µg/mL; arriba) y la M blanco (abajo).

LINEALIDAD Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Tal como se grafica en la **Figura 5.4**, el método fue lineal en el rango 0,16-37,80 $\mu\text{g/mL}$ de RIF, ya que el R^2 fue mayor a 0,999. El límite de cuantificación fue de 0,16 $\mu\text{g/mL}$ de RIF.

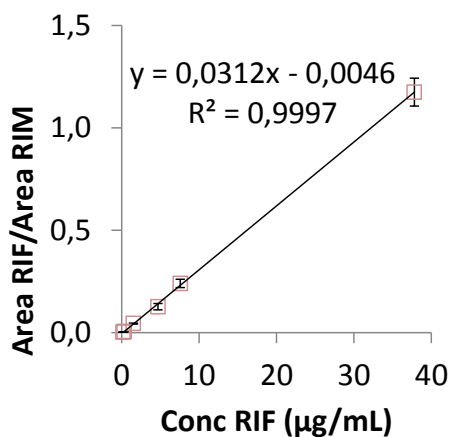


Figura 5.4. Curva de calibración de RIF en plasma humano.

PRECISION Y EXACTITUD

El método de cuantificación de RIF fue preciso y exacto en el intervalo de linealidad establecido, ya que los CV% y el EE% de las soluciones fueron menores al 15%, incluso a la concentración del límite inferior de cuantificación (**Tabla 5.3**).

Tabla 5.3. Precisión y exactitud de RIF en el intervalo evaluado (n=3). El criterio de aceptación para la precisión fue un $\text{CV} \leq 15\%$ y para la exactitud un $\text{EE} \leq 15\%$

Concentración de RIF	Precisión (CV%)	Exactitud (EE%)
Baja (0,16 $\mu\text{g/mL}$)	7,7	5,4
Media (1,51 $\mu\text{g/mL}$)	4,6	3,4
Alta (37,80 $\mu\text{g/mL}$)	5,8	4,7

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

El porcentaje de recuperación de RIF fue mayor al 97 % y el CV% fue menor al 15 % en las concentraciones analizadas (**Tabla 5.4**).

Tabla 5.4. Porcentaje de recuperación de RIF en el intervalo evaluado (n=3). El criterio de aceptación fue un $\text{CV} \leq 15\%$

Concentración RIF ($\mu\text{g/mL}$):	% recuperación (n=3)	CV%
0,86	99,6	11,1
10,97	97,3	11,2

ESTABILIDAD

Las muestras de plasma conteniendo RIF fueron estables tras 6h de disposición en la mesada y, luego de su extracción y conservación al abrigo de la luz, se mantuvieron inalteradas por 24h más. Además, permanecieron sin cambios luego de tres ciclos de congelado/descongelado (**Tabla 5.5**).

Tabla 5.5. Estabilidad de RIF en el intervalo evaluado (n=3). El criterio de aceptación fue de $EE \leq 15\%$

Concentración RIF ($\mu\text{g/mL}$)	A corto plazo (EE%)	Ciclos de congelado (EE %)			Post preparativa (EE%)
		Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	
0,86	0,23	0,12	0,08	0,00	0,01
10,97	0,01	2,48	2,96	4,19	0,35

5.3.1.2. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ISO

En el método seleccionado, se realiza una derivatización de ISO hacia un compuesto más hidrofóbico, el cual aparece a tiempos de retención mayores que las impurezas del plasma(4).

Inicialmente, por encontrarse descripto en bibliografía, se utilizó pirazinamida como estándar interno. Sin embargo, su pico cromatográfico no se resolvió bien respecto al frente de solvente, ya sea utilizando una columna de 150 mm o de 250mm, o variando las proporciones de metanol:agua en la fase móvil desde la relación (85:15) a (70:30). En consecuencia, se seleccionaron otros estándares internos, de solubilidad y Log P similar al derivado de ISO, tales como paracetamol, ácido isonicotínico, hidroclorotiazida y AT. El único compuesto que no reaccionó con el p-hidroxibenzaldehído y presentó una señal única y simétrica a tiempos de retención apropiados fue el AT, permitiendo la adecuada cuantificación de ISO en las condiciones establecidas.

SELECTIVIDAD

Mediante la comparación de M blanco con muestras de plasma enriquecidas con ISO y AT, se confirmó ausencia de interferencias provenientes de la matriz biológica por debajo del límite de cuantificación (**Figura 5.5**). Adicionalmente, ISO fue adecuadamente resuelta respecto a AT ($R= 42$).

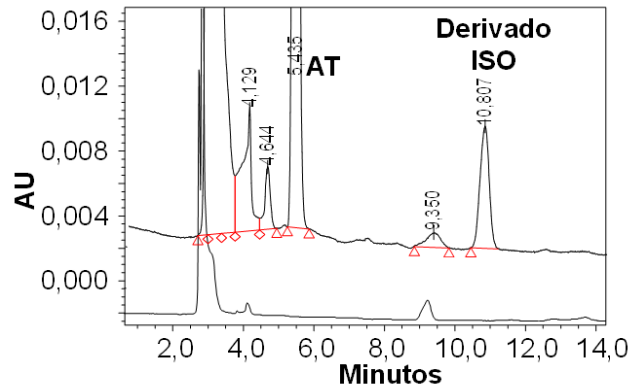


Figura 5.5. Cromatogramas de la solución en plasma de ISO (0,178 µg/mL; arriba) y la M blanco (abajo).

Como se observa en la **Figura 5.6**, el método fue lineal en el rango 0,18-35,68 µg/mL de ISO, ya que el R^2 fue mayor a 0,999. El límite de cuantificación fue de 0,18 µg/mL de ISO.

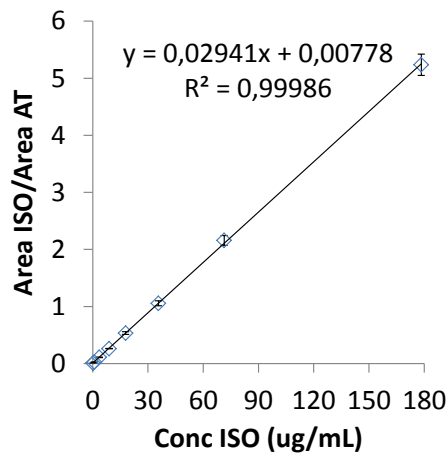


Figura 5.6. Curva de calibración de ISO en plasma humano.

PRECISION Y EXACTITUD

El método de cuantificación de ISO fue preciso y exacto en el intervalo de linealidad establecido, ya que los CV% y el EE% de las soluciones fueron menores al 15%, incluso a la concentración del límite inferior de cuantificación (**Tabla 5.6**).

Tabla 5.6. Precisión y exactitud de ISO en el intervalo evaluado (n=3). El criterio de aceptación para la precisión fue un $CV \leq 15\%$ y para la exactitud un $EE \leq 15\%$

Concentración de ISO	Precisión (CV%)	Exactitud (EE%)
Baja (3,57 µg/mL)	4,2	3,1
Media (17,84 µg/mL)	4,4	3,5
Alta (71,36 µg/mL)	4,0	3,1

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

El porcentaje de recuperación fue mayor al 89% y el CV% fue menor al 15% en las concentraciones analizadas (**Tabla 5.7**).

Tabla 5.7: porcentaje de recuperación de ISO en el intervalo evaluado (n=3). El criterio de aceptación fue un CV≤15%

Concentración ISO (µg/mL):	% recuperación (n=3)	CV%
4,41	96,6	10,4
88,11	89,8	2,6

ESTABILIDAD

Las muestras de plasma conteniendo ISO fueron estables tras 6 h de disposición en la mesada. Luego de su extracción y conservación al abrigo de la luz, se mantuvieron inalteradas por 24 h más. A diferencia de las muestras conteniendo RIF, sólo soportaron dos ciclos de congelado/descongelado (**Tabla 5.8**), ya que el EE en el ciclo 3 para las muestras de ISO de menor concentración fue mayor al 15%.

Tabla 5.8: estabilidad de ISO en el intervalo evaluado (n=3). El criterio de aceptación fue un EE≤15%

Concentración ISO (µg/mL)	A corto plazo (EE%)	Ciclos de congelado (EE %)			Post preparativa (EE%)
		Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	
4,41	8,6	12,5	15,4	18,6	13,3
88,11	4,2	0,3	3,6	4,4	12,2

5.3.2. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE LAS MATRICES CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅

La **Figura 5.7** muestra el perfil de concentración plasmática de RIF en función del tiempo, luego de la administración oral de los sistemas estudiados. En las curvas se distinguen los procesos de absorción, metabolismo y eliminación.

La constante de absorción (k_{abs}) de RIF en las matrices CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅ fue 1,41 veces superior respecto a RIFINAH® (-0,802 vs -0,568 h⁻¹). La mayor velocidad de absorción de RIF desde las matrices impactó en un aumento significativo de su biodisponibilidad (p<0,05). La **Figura 5.8** muestra el ABC₀₋₂₄, C_{max} y t_{max} de RIF determinados desde los dos sistemas estudiados. En las matrices CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅ el ABC_{0-∞} calculado (53,2 vs 38,7 µgh/mL) fue 1,37 veces mayor, lo que estuvo en concordancia con una mayor C_{max} (4,2 vs 3,7 µg/mL; p<0,05), la que se alcanzó a un t_{max} significativamente más corto (2 vs 6 h; p<0,01).

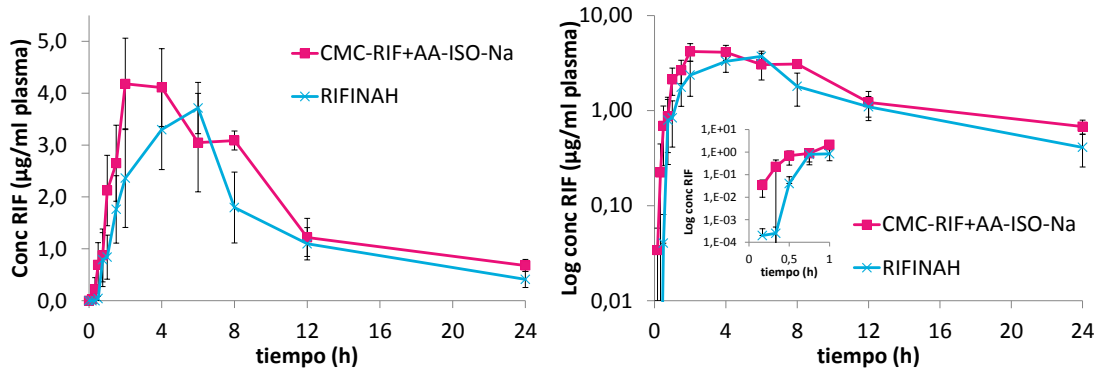


Figura 5.7. Perfiles de concentración plasmática de RIF en función del tiempo en escala normal y logarítmica, luego de la administración oral de los sistemas estudiados, representados como la media \pm EE.

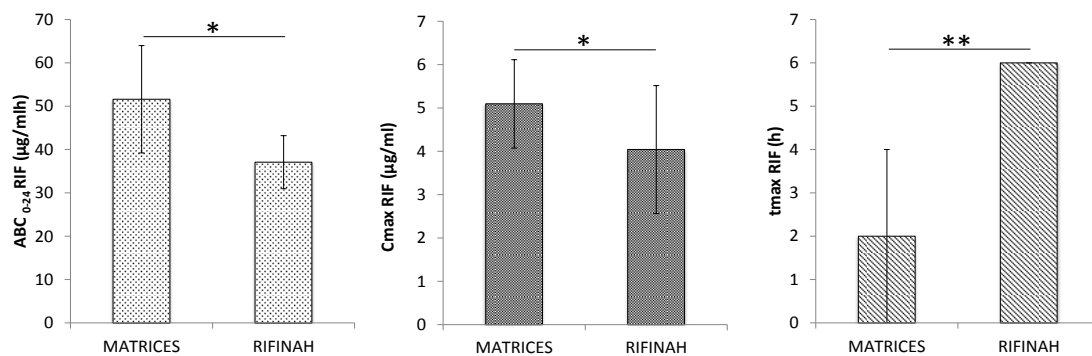


Figura 5.8. ABC_{0-24} , C_{max} y t_{max} de RIF determinados desde las MATRICES (CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅) y las cápsulas de RIFINAH®. En todos los casos la diferencia fue significativa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

La **Figura 5.9** muestra el perfil de concentración plasmática de ISO en función del tiempo, luego de la administración oral de los sistemas estudiados. En las curvas se distinguen los procesos de absorción, distribución y eliminación. Tal como se espera de un sistema de liberación prolongada, la k_{abs} de ISO en las matrices CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅ fue 1,3 veces menor respecto a RIFINAH® (-0,325 vs -0,517 h^{-1}). La k_{el} de ISO fue 3,4 veces mayor para las matrices que para RIFINAH® (-0,325 vs -0,097 h^{-1}). La menor velocidad de absorción y la mayor velocidad de eliminación de ISO desde las matrices impactó negativamente en su biodisponibilidad, que estuvo significativamente reducida ($p < 0,01$). La **Figura 5.10** muestra el ABC_{0-24} , C_{max} y t_{max} de ISO determinados desde los dos sistemas estudiados. En las matrices CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅ se observó una menor $ABC_{0-\infty}$ (2,4 vs 10,7 $\mu g h / mL$), una menor C_{max} (0,5 vs 1,8 $\mu g / mL$) y un t_{max} significativamente mayor (4 vs 1 h).

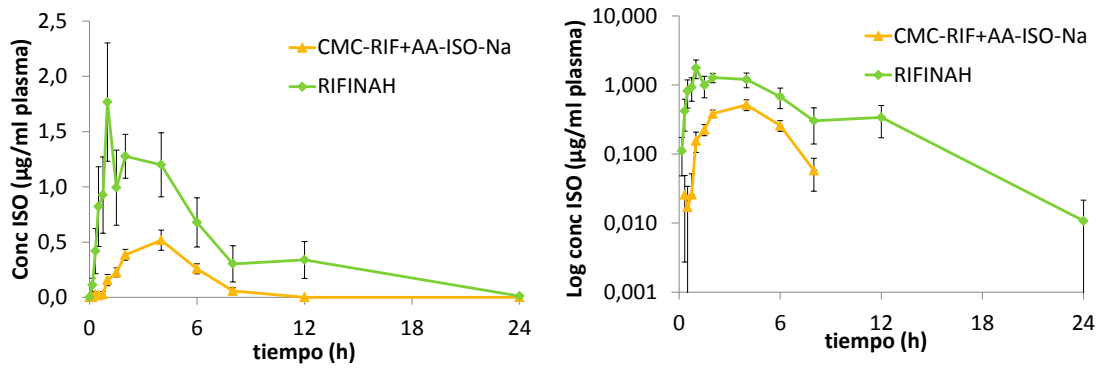


Figura 5.9. Perfiles de concentración plasmática de ISO en función del tiempo en escala normal y logarítmica, luego de la administración oral de los sistemas estudiados, representados como la media \pm EE.

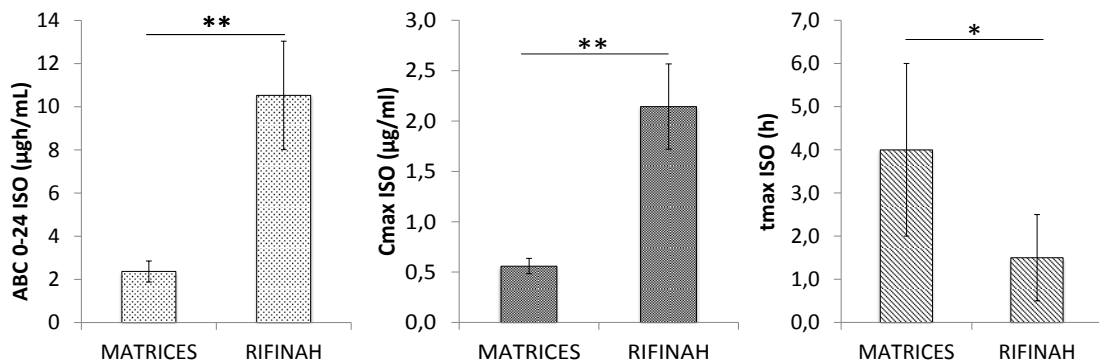


Figura 5.10. ABC_{0-24} , C_{max} y t_{max} de ISO determinados desde las MATRICES (CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅) y las cápsulas de RIFINAH®. En todos los casos la diferencia fue significativa (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

5.4. DISCUSIÓN

Si bien la metodología analítica desarrollada en el capítulo 3 permitió cuantificar RIF, ISO y los productos de degradación de RIF, ésta no pudo ser utilizada para cuantificar los fármacos en plasma por la superposición de las señales de ISO con las impurezas de la matriz biológica. A pesar de que se hicieron intentos por validar una metodología para la cuantificación conjunta de RIF e ISO para esta etapa, en todos los casos las señales de ISO se superponían con las impurezas del plasma, por lo que fue necesario desarrollar y validar una metodología independiente para la cuantificación de ISO, mediante la derivatización de esta a un compuesto más hidrofóbico, lo que aumentó su tiempo de retención en la columna (4).

Los métodos desarrollados fueron una herramienta analítica útil para la cuantificación de las muestras del ensayo farmacocinético, el cual requirió alta precisión, selectividad y estabilidad, utilizando pequeños volúmenes de plasma.

De particular importancia, la determinación de la estabilidad de RIF e ISO en las muestras de plasma en las diversas condiciones de trabajo aseguró el mantenimiento de su calidad en los plazos habituales de procesamiento y cuantificación, así como también que la cuantificación de RIF puede realizarse en días diferentes a la de ISO. A diferencia de lo que sucede en soluciones acuosas ácidas, RIF fue más estable en el plasma, debido a que está unida en gran medida a las proteínas (9) y a que, este medio presenta un pH en el cual la hidrólisis de RIF estaría minimizada. Incluso, RIF soportó un ciclo de congelado/descongelado más que ISO, por lo que se consideró realizar en primer lugar la cuantificación de ISO y posteriormente, en un día diferente, la cuantificación de RIF.

El modelo animal seleccionado presentó múltiples ventajas. Además de ser uno de los pocos animales de fácil acceso y con una volemia adecuada para realizar múltiples muestreos a lo largo del tiempo, presentó una fisiología de su estómago muy semejante al humano en el estado de ayuno, con patrones similares de motilidad, vaciamiento gástrico de líquidos y sólidos no digeribles, y pH gástrico (10). Esto fue muy conveniente para la determinación de la biodisponibilidad de RIF, que es indicativa de la mejora aportada por la formulación propuesta.

Como desventajas, el modelo animal presenta un intestino con mayor pH y un menor tiempo de tránsito gastrointestinal, lo que podría resultar en una absorción variable o incompleta en esta región, especialmente en fármacos con una ventana de pH de máxima absorción intestinal entre 5 y 7 o en formas farmacéuticas de liberación modificada (11). Bajo estas condiciones, el modelo fue de alta exigencia en cuanto a la etapa de liberación de ISO, pero fue apropiado en esta etapa de estudio, ya que si la formulación tiene una adecuada biodisponibilidad de ISO en perros, probablemente también la tendría en humanos.

Como se ha señalado previamente, el principal problema de la terapia de la tuberculosis es la baja y variable biodisponibilidad oral de RIF, ocasionada por su baja solubilidad y su degradación en medio ácido, entre otras razones (12–14). Obtener formas farmacéuticas sólidas que aseguren una biodisponibilidad aceptable de RIF es importante para evitar la resistencia al tratamiento, en vista de que su acción es dosis-dependiente y el mecanismo de resistencia se desarrolla en un único paso (15–17).

Cumpliendo con la estrategia de liberación sitio-específica y segregada de los fármacos, las matrices CMC-RIF+AA-ISO₇₅-Na₂₅ mostraron una muy rápida velocidad de disolución *in vitro* de RIF y menor degradación de RIF en medio ácido. En línea con lo observado *in vitro*, el desempeño de RIF *in vivo* mostró un aumento en la biodisponibilidad oral de RIF. Esto se debe a que, en las condiciones dinámicas de tránsito gastrointestinal, la cantidad de RIF disuelta es rápidamente absorbida, lo cual fue corroborado por el menor t_{max} observado. Adicionalmente, la degradación de RIF podría haber sido reducida, en parte porque se ha reducido significativamente el tiempo de residencia gástrica y porque están minimizados los niveles concomitantes de ISO en medio ácido.

Si bien la estrategia de liberación segregada de ISO desde las matrices de AA-ISO₇₅-Na₂₅ ayudó a mejorar la biodisponibilidad de RIF, los parámetros farmacocinéticos evidenciaron que la absorción de ISO fue incompleta. El incremento significativo del t_{max} de ISO estuvo asociado a una muy baja velocidad de liberación. A pesar de que este resultado es desfavorable, se tiene en cuenta que el perro es un modelo de máxima para sistemas de liberación modificada y que ISO, siendo un fármaco clase I/III (18), presenta como única limitante de su absorción, su velocidad de difusión y de disgregación de la matriz. Por ello, una buena alternativa a la formulación matricial es el desarrollo de un sistema conteniendo ISO de liberación retardada, cuya liberación en intestino sea inmediata, y de esta manera se incremente la disponibilidad de ISO en el lumen intestinal.

A pesar de que existen varios reportes de formas farmacéuticas sólidas que mejoran el desempeño de RIF e ISO (19–22), muy pocos de estos sistemas han sido evaluados *in vivo*. A su vez existen numerosos estudios de sistemas nanotecnológicos para la administración oral de fármacos antituberculosos de primera línea, los cuales han sido evaluados en animales pequeños, tales como ratones y cobayos, y han demostrado mayor permanencia en la sangre que los fármacos libres (23–25). A pesar de estos resultados alentadores, no se ha avanzado en la evaluación de la estabilidad de estas formulaciones nanotecnológicas combinadas ni se ha evaluado su farmacocinética en humanos.

El limitado desarrollo de otras formulaciones innovadoras muestra una relación directa con el desinterés de la industria en el tratamiento de la tuberculosis, la cual es una enfermedad asociada a la pobreza (26).

Abajo se resumen algunos desarrollos de formas farmacéuticas sólidas de administración oral, que han sido evaluadas en modelos animales grandes o humanos. Cabe destacar que ninguna formulación ha sido superadora de la biodisponibilidad de RIF como CMC-RIF.

Wang et al. (27) obtuvieron comprimidos de RIF e ISO en CDF de liberación retardada y los evaluaron en un modelo canino. Con la intención de mejorar la solubilidad de RIF, se utilizó un sólido de tamaño de partícula menor a 120 μm , que se sometió junto a ISO y excipientes convencionales, a un proceso de granulación seca. Llama la atención el uso del 20% de lactosa, el cual es un excipiente desaconsejado en este caso, porque presenta reportes de interacción con ISO (18). Dos comprimidos recubiertos entéricamente, conteniendo 150 mg de RIF y 75 mg de ISO cada uno, fueron evaluados contra una referencia de un comprimido con cubierta cosmética de 300 mg de RIF y 150 mg de ISO. En este estudio, la formulación innovadora aumentó la biodisponibilidad, en valores de 17% para RIF y 13% para ISO, y el t_{max} fue considerablemente mayor para los dos fármacos, pasando de 3,17 a 7,33 h para el caso de RIF. Es inusual observar que un modelo canino mantenga niveles plasmáticos considerables luego de este período de tiempo por la rápida motilidad intestinal reportada. Igualmente, el desempeño de CMC-RIF fue superador, no sólo por presentar mayor porcentaje de biodisponibilidad sino también porque el t_{max} estuvo significativamente reducido.

Avachat y Bhise (28), en concordancia con la estrategia planteada en esta tesis, formularon un comprimido bicapa de RIF e ISO, conteniendo una capa de RIF (150 mg) de liberación inmediata y una capa de ISO (100 mg, 33% más de la dosis aprobada en la CDF) de liberación sostenida. La cantidad de excipientes utilizados en esta formulación es considerablemente alta. De hecho, si se extrapola la dosis de ambos fármacos a la recomendada por la OMS el tamaño del comprimido sería de 1,12 g. La capa de RIF requirió el agregado del 20% de crospovidona como desintegrante y 5% de lauril sulfato de sodio como solubilizante, para lograr una rápida velocidad de disolución (89% de RIF a los 30 min en HCl 0,1N). Esta formulación fue evaluada en voluntarios sanos, y mostró un aumento de más del 18% en la C_{max} de RIF y un incremento del 20% en su ABC, comparada con la formulación en CDF de referencia comercial. El sistema de matrices CMC-RIF + AA-ISO₇₅-Na₂₅ presentó un incremento del ABC de RIF del 37 %, por lo que se destaca el desempeño superior de CMC-RIF respecto al logrado con excipientes convencionales.

En el sistema bicapa planteado por Avachat y Bhise (28), la capa de ISO contuvo un 30% de AANA y mostró una liberación similar a las matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅, ya que liberó del 40% de ISO en 1h en medio ácido y completó la liberación al cabo de 2h adicionales en solución reguladora pH 6,8. Debido al 33% de exceso de dosis de ISO, el ABC de éste fármaco fue del 130% respecto de lo cuantificado en la CDF de referencia comercial. Sin embargo la C_{max} estuvo dentro del 80-120%, y el t_{max} fue 3 veces mayor a la referencia comercial. En base a esta

experiencia, las matrices de AA-ISO₇₅-Na₂₅, que en el modelo canino mostraron una liberación incompleta, deberían mostrar un buen desempeño en humanos.

El mayor avance ha sido dado por el laboratorio Panacea-Biotec que ha patentado, bajo la marca comercial Xeed®, comprimidos con cubierta compactada conteniendo un núcleo de ISO (75 mg) de liberación retardada y una capa externa conteniendo RIF (150 mg), pirazinamida (400 mg) y etambutol (275 mg). Esta formulación, según estudios realizados por la misma empresa, presentó un aumento del 42% en la biodisponibilidad de RIF, respecto de las formulaciones en CDF convencionales. Bajo el mismo formato de comprimido con cubierta compactada, disponen de la doble y triple asociación, manteniendo las mismas dosis de fármacos (29). Estas formulaciones no se encuentran comercialmente disponibles en Latinoamérica ni España (30).

El desarrollo de formulaciones utilizando CMC-RIF e ISO de liberación segregada sería una alternativa superadora al tratamiento actualmente disponible en la región, factible de ser transferida al sector de producción pública de medicamentos, con un incremento positivo en tecnología de productos e innovación.

5.5. CONCLUSIONES

Los métodos desarrollados para la cuantificación de RIF e ISO en plasma humano fueron adecuados, robustos y reproducibles.

Las matrices CMC-RIF son adecuadas para el desarrollo de una formulación de RIF con biodisponibilidad incrementada. Sin embargo, las matrices de AA-ISO₇₅-Na₂₅ no cumplieron con el desempeño esperado y deben ser reformuladas, hacia formulaciones de liberación retardada. Una buena alternativa a la formulación matricial bicapa sería el desarrollo de comprimidos con cubierta compactada.

5.6. REFERENCIAS

1. Luciani-Giacobbe LC, Ramírez-Rigo M V., Garro-Linck Y, Monti GA, Manzo RH, Olivera ME. Very fast dissolving acid carboxymethylcellulose-rifampicin matrix: Development and solid-state characterization. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;96:398–410. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.013>
2. Olivera ME, Luciani Giacobbe LC, Ramirez Rigo MV, Romañuk CB. Desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada y administración oral para el tratamiento de la tuberculosis. *Rev Argentina Salud Pública*. 2011;2(9):11–7.
3. Gupta RN. Determination of isoniazid in plasma by liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Appl*. 1988;425:441–3.
4. Agrawal S, Kaul CL, Panchagnula R. Bioequivalence of isoniazid in a two drug fixed dose combination and in a single drug dosage form. *Pharmazie*. 2001;56(8):636–9.
5. FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [Internet]. 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
6. Doan TVP, Grégoire N, Lamarche I, Gobin P, Marchand S, Couet W, et al. A preclinical pharmacokinetic modeling approach to the biopharmaceutical characterization of immediate and microsphere-based sustained release pulmonary formulations of rifampicin. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48(1–2):223–30.
7. Jayaram R, Shandil RK, Gaonkar S, Kaur P, Suresh BL, Mahesh BN, et al. Isoniazid pharmacokinetics-pharmacodynamics in an aerosol infection model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(7):2951–7.
8. de la Torre RD. Probabilidad y estadística para ciencias e ingenierías [Internet]. Delta; 2007. Available from: <https://books.google.com.ar/books?id=xbiCKj0vV6kC>
9. Boman G, Ringberger VA. Binding of rifampicin by human plasma proteins. *Eur J Clin Pharmacol* [Internet]. 1974;7(5):369–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00558209>
10. KARARLI TT. COMPARISON OF THE GASTROINTESTINAL ANATOMY, PHYSIOLOGY, AND BIOCHEMISTRY OF HUMANS AND COMMONLY USED LABORATORY ANIMALS. *Biopharm Drug Dispos*. 1995;16:351–80.
11. Dressman JB. Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharm Res*. 1986;3(3):123–31.
12. Panchagnula R, Agrawal S. Biopharmaceutic and pharmacokinetic aspects of variable bioavailability of rifampicin. *Int J Pharm*. 2004;271(1–2):1–4.
13. Becker C, Dressman JB, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Rifampicin. *J Pharm Sci*. 2009;98(7):2252–67.
14. Singh S, Bhutani H, Mariappan TT. Quality Problems of Anti-Tuberculosis Fixed-Dose Combinations (Fdcs): a Way Forward. *Indian J Tuberc*. 2006;53:201–5.
15. Ellard G a, Fourie PB. Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. *Int J Tuberc Lung Dis*

- [Internet]. 1999;3(11 Suppl 3):S301-8-21. Available from: <http://pubget.com/paper/10593709/rifampicin-bioavailability-a-review-of-its-pharmacology-and-the-chemotherapeutic-necessity-for-ensuring-optimal-absorption%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593709>
16. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1980;121(6):939–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6774638>
 17. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993;341(8846):647–50.
 18. Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Isoniazid. *J Pharm Sci*. 2007;96(3):522–31.
 19. Vamshi Krishna T, Girish Pai K, Naveen D, Reddy Sreenivasa M. Rifampicin and Isoniazid With Improved Rifampicin Stability. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2013;5:431–3.
 20. Gohel MC, Sarvaiya KG. A novel dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *AAPS PharmSciTech*. 2007;44(1):22–7.
 21. Silva A, Abraham-Vieira B, do Carmo F, do Amaral L, Silva L, Escudini C, et al. Segregated Delivery of Rifampicin and Isoniazid from Fixed Dose Combination Bilayer Tablets for the Treatment of Tuberculosis. *Br J Pharm Res* [Internet]. 2014;4(14):1781–801. Available from: <http://www.sciencedomain.org/abstract.php?iid=593&id=14&aid=5386>
 22. Singh H, Bhandari R, Kaur IP. Encapsulation of Rifampicin in a solid lipid nanoparticulate system to limit its degradation and interaction with Isoniazid at acidic pH. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;446(1–2):106–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.012>
 23. Ahmad Z, Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic behaviour of antitubercular drugs encapsulated in alginate nanoparticles at two doses. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(5):409–16.
 24. Pandey R, Sharma S, Khuller GK. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. *Tuberculosis* [Internet]. 2005;85(5–6):415–20. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979205000703>
 25. Sosnik A, Carcaboso ÁM, Glisoni RJ, Moretton M a., Chiappetta D a. New old challenges in tuberculosis: Potentially effective nanotechnologies in drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;62(4–5):547–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.023>
 26. Planeta Salud. I + D para la tuberculosis. Adaptarse a los retos de una emergencia mundial. Planeta Salud. Barcelona; 2009.
 27. Wang Y, Liu H, Liu K, Sun J, He Z. Design and evaluation of enteric-coated tablets for rifampicin and isoniazid combinations. *Pharm Dev Technol* [Internet]. 2013;18(2):401–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22339279>
 28. Avachat AM, Bhise SB. Tailored release drug delivery system for rifampicin and isoniazid for enhanced bioavailability of rifampicin. *Pharm Dev Technol* [Internet].

- 2011;16(2):127–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20105081>
29. Panacea Biotec. Xeed [Internet]. 2000 [cited 2016 Jan 2]. Available from: <http://www.panaceabiotec.com/licensing/XEED.pdf>
 30. Clyná S.A. P.R. vademecum [Internet]. 2015 [cited 2016 Sep 19]. Available from: <http://ar.prvademecum.com>

CAPITULO 6

CALIDAD DESDE EL DISEÑO EN EL DESARROLLO DE COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA DE RIF E ISO

6.1. INTRODUCCIÓN

Las matrices de CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅ desarrolladas, simularon el comportamiento de un comprimido bicapa. En este sistema, se observó una muy rápida velocidad y alta eficiencia de disolución de RIF (1), mientras que ISO presentó una liberación sostenida (2). A su vez, el sistema muestra un aumento en la estabilidad de RIF, por la liberación segregada de los principios activos. Su evaluación *in vivo* en un modelo animal canino mostró un incremento significativo de la biodisponibilidad oral de RIF (37% mayor) en comparación con la CDF de referencia. Sin embargo las matrices de ISO mostraron menor biodisponibilidad, lo que sugirió la necesidad de optimizar el desempeño de ISO, manteniendo el sistema CMC-RIF.

6.1.1. DESARROLLO DE COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA PARA EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Los comprimidos con cubierta compactada son aquellos obtenidos por compresiones múltiples. Consisten de un comprimido interno, el núcleo, recubierto por una capa externa sólida, que se adhiere por una subsiguiente compactación (**Figura 6.1**) (3). Estos sistemas presentan múltiples ventajas, entre las que se encuentran la separación física de dos fármacos incompatibles y la liberación direccionada a diferentes regiones del tracto gastrointestinal. Además, permiten modular la velocidad de liberación de los fármacos (4).

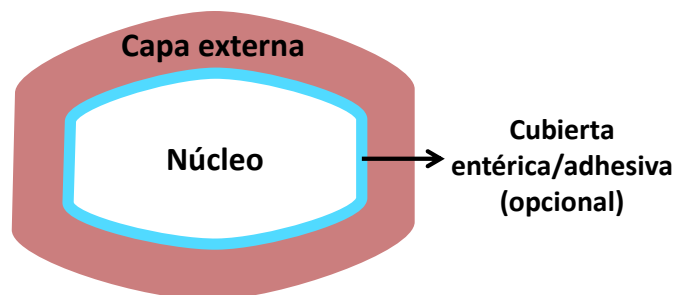


Figura 6.1. Representación de las partes que componen un comprimido con cubierta compactada.

Aunque para su obtención se requiere una máquina comprimidora especial, las comprimidoras monopunzón convencionales permiten imitar este sistema a escala laboratorio.

El proceso de manufactura de comprimidos con cubierta compactada emplea varios pasos. Primero se formula el núcleo y se comprime bajo condiciones apropiadas. Luego, el punzón de la comprimidora se llena con una porción de la capa externa, para formar un lecho de polvo, el núcleo se coloca en el centro de éste y se añade la segunda porción de la capa externa. Por último, la capa externa se comprime alrededor del núcleo (5).

Como sucede con otras formulaciones compactadas, los materiales a utilizar deben ser de bajo costo, seguros y accesibles. Además, es importante que las mezclas de polvos utilizadas posean flujo adecuado para asegurar uniformidad de contenido.

El núcleo consiste en un comprimido convencional, cuyas propiedades de liberación se ven sujetas, principalmente, al tipo y proporción de excipientes utilizados y a la fuerza de compresión final. Existen comprimidoras que permiten abastecer de núcleos previamente elaborados. De esta manera, los núcleos pueden ser previamente sometidos a diferentes procesamientos, por ejemplo, un recubrimiento pelicular. Esto otorga al núcleo diferente funcionalidad o mayor cohesividad con la capa externa. Si al núcleo se le aplica una cobertura entérica, se podrían vehiculizar dos fármacos incompatibles, que se liberarían de manera segregada y sitio-específica.

Las características de los materiales de la capa externa tienen un impacto significativo en el desempeño de la formulación, tales como la liberación del fármaco y su estabilidad. Se requiere, además, que la capa externa sea cohesiva y plástica para asegurar adecuada resistencia mecánica.

Por otra parte, es crítica la fuerza de compresión de la capa externa sobre el núcleo. Esta fuerza debe ser mayor que la del núcleo para lograr la unión de las capas, pero debe ser lo suficientemente baja para evitar la laminación.

Desde el punto de vista tecnológico, la cantidad de material en la capa externa es un parámetro clave para alcanzar una cobertura uniforme y asegurar su adecuada adhesión al núcleo. La masa de la capa externa debe ser al menos el doble de la del núcleo, y su volumen, respecto a éste, debe ser superior. A su vez, es aceptable que el peso del comprimido con cubierta compactada sea menor a 1000 mg para facilitar su deglución. Por ello, el peso del núcleo debe ser, como máximo, 300 mg.

En el contexto de optimizar la farmacoterapia de la tuberculosis, sistemas multiunitarios que permitan la liberación secuencial de RIF (en estómago) e ISO (en intestino), tales como los

comprimidos con cubierta compactada, podrían llevar a una mejora en la efectividad y en la estabilidad de RIF.

CMC-RIF, por ser un material que otorga muy rápida velocidad de disolución de RIF, y por lo tanto, mayor disponibilidad de RIF en el sitio de absorción, podría formar la capa externa del comprimido con cubierta compactada. ISO, formando una matriz polielectrolito-fármaco de liberación sostenida o un comprimido convencional con cubierta entérica, puede ser el núcleo. Los comprimidos con cubierta compactada de CMC-RIF e ISO serían una alternativa optimizada respecto del tratamiento actualmente disponible en la región, factible de ser transferida al sector de producción pública de medicamentos, con un incremento positivo en tecnología de productos e innovación.

6.1.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPONENTES EMPLEADOS EN LA ELABORACIÓN DE COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA

Cuando se diseña un comprimido es importante considerar las características de sus componentes. Para mejorar aspectos desfavorables de los principios activos se utilizan excipientes, los que son seleccionados sobre la base de sus propiedades, ponderando el riesgo que implica su incorporación. La **Tabla 6.1** resume las propiedades más relevantes de CMC-RIF, ISO y algunos de los excipientes más utilizados en la elaboración de comprimidos.

Tabla 6.1. Propiedades más relevantes de CMC-RIF, ISO y algunos de los excipientes más utilizados en la elaboración de comprimidos.

CMC-RIF	Dispersión sólida cristalina, donde RIF presenta alta hidrofiliidad y muy rápida velocidad de disolución (1). El material presenta buen flujo (ángulo de reposo= 22°) pero regular compresibilidad (índice de Carr=21), por lo que sus comprimidos son friables.
ISO	Sólido cristalino, hidrofílico, fácilmente soluble en agua (6,7). El polvo presenta un flujo desfavorable (ángulo de reposo= 57°). Se requiere granulación para mejorar esta característica.
Povidona (polivinilpirrolidona, PVP)	Excipiente ampliamente utilizado en formas farmacéuticas sólidas, ya sea como desintegrante y potenciador de la disolución, como agente de cobertura cosmética o ligante en el proceso de granulación húmeda. En el último caso se usan soluciones acuosas, alcohólicas o hidroalcohólicas de PVP en concentración final de 0,5- 5% (8).

Celulosa microcristalina	Excipiente con propiedades desintegrantes y diluyentes. Dentro de los diferentes Avicel PH, el Avicel PH 200 tiene un tamaño de partícula elevado (180µm) y granular; es ideal para compresión directa por su excelente flujo (9). Por su costo, no se utiliza solo, sino que se suele combinar con excipientes tales como lactosa, almidón o fosfato de calcio dihidrato. La celulosa microcristalina genera comprimidos de alta dureza, baja friabilidad, adecuada uniformidad de contenido y excelente compresibilidad, que se desintegran rápidamente. Sin embargo, es sensible a altos niveles de humedad (10).
Fosfato de calcio dihidrato	Excipiente diluyente y ligante, con buenas propiedades de flujo (8). Por ser un material no higroscópico, es muy utilizado en formulaciones que se someten a procesos de cobertura líquida. No genera comprimidos de alta dureza, pero incrementa los tiempos de desintegración ante pequeños aumentos de la fuerza de compactación. Además, cuando se utiliza en elevada proporción respecto de celulosa microcristalina, disminuye la velocidad de disolución de fármacos poco solubles (10).
Carboximetilcelulosa sódica (CMCNa)	Excipiente utilizado en comprimidos como desintegrante y ligante, en concentraciones del 1-6%. Es un material capaz de formar capa gel, la cual modula la liberación de fármacos (8). Para reducir este fenómeno, se puede utilizar CMCNa de ultra baja viscosidad.
Croscarmelosa sódica	Excipiente superdesintegrante usado en compresión directa o granulación húmeda, en concentraciones del 0,5-5%. La desintegración se genera por una rápida captación de agua, seguida de hinchamiento (8).
Almidón glicolato sódico	Excipiente superdesintegrante usado en compresión directa o granulación húmeda, en concentraciones del 2-8%. La desintegración se genera por una rápida captación de agua, seguida de un gran hinchamiento. Su propiedad desintegrante no se ve afectada por la presencia de lubricantes ni por el aumento de la presión de compactación (8).
Talco	Excipiente comúnmente utilizado como deslizante y lubricante (en concentraciones del 1-10%). También se lo utiliza como diluyente y para

	disminuir la velocidad de disolución en el desarrollo de productos de liberación controlada (8). Se utiliza también en suspensiones de cobertura entérica, porque da volumen, color opaco y reduce la adherencia del agente de recubrimiento al comprimido (11).
Estearato de magnesio	Excipiente comúnmente utilizado como lubricante en comprimidos y cápsulas, en concentraciones del 0,25-5%. Ya que es un material hidrofóbico, puede disminuir la velocidad de disolución de los principios activos. Adicionalmente, un tiempo de mezclado excesivo de este material con el resto de los componentes, puede disminuir la dureza y aumentar la friabilidad de los comprimidos (8).
Eudragit L30-D55	Copolímero aniónico a base de ácido metacrílico y acrilato de etilo (copolímero de ácido metacrílico Tipo C, USP39-NF34), que se presenta comercialmente como dispersión acuosa. Es un excipiente ampliamente utilizado en procesos de cobertura entérica, porque es compatible con el agua, genera una película resistente al jugo gástrico y se disuelve fácilmente por encima de pH 5,5 (8).
Triacetina	Agente plastificante hidrófilico, usado en el recubrimiento pelicular acuoso o a base de solventes orgánicos. Generalmente, se usa en concentraciones del 10-35% p/p.
Alcohol polivinílico	Polímero soluble en agua, utilizado como agente de cobertura cosmética de formas farmacéuticas sólidas, emulgente en emulsiones y viscosante formulaciones tópicas y oftálmicas (8,12). Como material de cobertura, genera una superficie lisa, brillante, buena adherencia a la película y buena resistencia mecánica, que se disuelve fácilmente (13).

6.1.2. CALIDAD DESDE EL DISEÑO

En la última década se ha desarrollado e implementado el concepto de Calidad desde el Diseño (QbD, por sus siglas en inglés) descrito en las guías Q8, Q9 y Q10 del Comité Internacional de Armonización (14–16). La QbD es un acercamiento sistemático al desarrollo farmacéutico, que hace énfasis en el conocimiento del producto y en la comprensión y el control de los procesos. En este sentido, la QbD se fundamenta en el empleo del método científico y en la toma de decisiones en

función de la gestión del riesgo en calidad. De esta forma se fortalece el aseguramiento de la calidad, al no limitarlo a la ausencia de desviaciones sino a una práctica que reduce integralmente el potencial de ocurrencia de las no conformidades sobre la base del conocimiento de las variables del producto y de su proceso productivo (17).

A diferencia del diseño basado en la calidad determinada por los ensayos, la QbD busca disminuir la rigidez y la dependencia en las especificaciones, evaluando el desempeño de un producto a través de sus datos históricos. Esto facilita la identificación de los parámetros críticos del proceso y sus límites de control en la etapa de desarrollo y contribuye a diseñar un producto que cumpla consistentemente con los atributos críticos de calidad previamente determinados. Además, al predecir eficientemente el impacto de las variables del proceso en las especificaciones del producto, es posible un mejor aseguramiento de la calidad del medicamento (18).

El valor agregado de implementar QbD se amortiza con la reducción del costo de producción o bien la simplificación del proceso, sin afectar la calidad del producto. A su vez, el conjunto de conocimientos generado durante el desarrollo, es confiable y transferible al sector productivo.

6.1.3. APLICACIÓN DE QbD EN EL DESARROLLO FARMACÉUTICO

La aplicación de QbD abarca cuatro etapas: a) identificación de objetivos; b) establecimiento de los requerimientos críticos; c) diseño del plan experimental y d) articulación del proceso en el marco del mejoramiento continuo (19).

6.1.3.1. PRIMERA ETAPA: IDENTIFICACIÓN DE OBJETIVOS

En esta etapa se genera un espacio de conocimiento que orienta el planeamiento del desarrollo mediante el establecimiento del perfil del producto, la definición de sus atributos cuantitativos de calidad y la recopilación de información sobre el principio activo, los excipientes y el proceso.

6.1.3.2. SEGUNDA ETAPA: ESTABLECIMIENTO DE LOS REQUERIMIENTOS CRÍTICOS

En esta etapa se determinan los atributos críticos de calidad del producto, se identifican los atributos críticos de los materiales constituyentes y se identifican los parámetros críticos del proceso y las fuentes de variación.

El criterio para calificar los atributos como críticos resulta del análisis de riesgo, siendo válido únicamente si se dispone de un verdadero conocimiento del producto, así como del entendimiento de los procesos y de la experiencia.

Para valorar el riesgo, se utilizan una serie de herramientas, descritas en la Guía ICH Q9. Dentro de éstas, se seleccionó el análisis preliminar de riesgo, más conocido por su terminología en inglés como *Preliminary Hazard Analysis* o *PHA*. Esta herramienta de análisis se basa en la aplicación de la experiencia previa o del conocimiento adquirido ante una falla o problema para la identificación de futuras situaciones o eventos perjudiciales, así como para estimar su probabilidad de ocurrencia. La herramienta consta de: (1) la identificación de la probabilidad de ocurrencia del evento riesgoso; (2) la evaluación cualitativa de la magnitud del daño probable, valorándolo en función de las fallas en la calidad del medicamento que más afecten la salud del paciente; (3) una clasificación relativa de la amenaza, utilizando una combinación de gravedad y la probabilidad de ocurrencia; y (4) la identificación de las posibles medidas correctivas.

Para la elaboración de un PHA se construye una matriz de riesgo, listando las potenciales amenazas y designándole una ponderación arbitraria, según la severidad y frecuencia de aparición. Las amenazas y su valor de riesgo se establecen a partir de la revisión y el análisis de la bibliografía específica, proyectos previos, eventos reportados y quejas.

El PHA es comúnmente usado en etapas tempranas de desarrollo, o cuando hay poca información sobre detalles de diseño o procedimientos operativos. Por lo tanto, suele ser un precursor de estudios adicionales (15).

6.1.3.3. TERCERA ETAPA: DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En esta etapa se establecen correlaciones entre los atributos críticos de calidad y las fuentes de variación en la formulación. Se selecciona preliminarmente el proceso de manufactura, detallando sus operaciones unitarias y la articulación entre las entradas y las salidas en cada paso. Se combina así, la información disponible en la definición de los espacios de diseño del proceso, a través de un diseño experimental adecuado.

Un espacio de diseño es una combinación multidimensional e interactiva de las variables de entrada y los parámetros de proceso que demuestran proveer un adecuado nivel de calidad. El espacio de diseño agrupa toda la información preexistente, adquirida o generada, acerca de la respuesta de un proceso o material frente al cambio de las variables de un sistema, consolidando conocimiento explícito, cuantitativo o cualitativo, que asegure, con suficiencia, la calidad del producto.

En la práctica, el establecimiento de un espacio de diseño se basa en el uso de experimentos para una o varias operaciones donde la relevancia de los parámetros de proceso está siendo investigada. Para tal fin, la aplicación de una estrategia basada en el diseño estadístico de experimentos, o diseño factorial, permite evaluar los efectos de diferentes parámetros del proceso y de los atributos del

material sobre los atributos críticos de calidad del producto. Esto, llevado al trabajo experimental, significa un ahorro de recursos entre cuatro a ocho veces más que aplicando un modelo experimental de un factor a la vez.

6.1.3.4. CUARTA ETAPA: ARTICULACIÓN DEL PROCESO

En esta etapa se pretende estandarizar el proceso de manufactura teniendo presente el cumplimiento de los atributos críticos de calidad, entender y asimilar la interacción del conocimiento generado para valorar correctamente el impacto de los componentes de la formulación y los parámetros de proceso en la calidad, establecer una estrategia de control y validar el proceso.

La consolidación de la calidad desde el diseño busca transformar el conocimiento que se considera tácito en explícito y emplear las herramientas de gestión del conocimiento para administrarlo, lo que permite la mejora continua y la retroalimentación a través de la experiencia. La monitorización y actualización permanente del diseño y de la manufactura permite asegurar la consistencia del mismo dentro de la filosofía del mejoramiento continuo.

6.1.4. OBJETIVOS

En el contexto de esta parte del trabajo se plantea como objetivo aplicar los conceptos del enfoque QbD al diseño de un comprimido con cubierta compactada de RIF e ISO.

Para ello, resulta necesario:

- realizar un análisis de riesgo de los materiales de partida y el proceso de elaboración,
- establecer los parámetros críticos de control,
- explorar las condiciones de proceso y establecer los puntos de control, necesarios para un posterior escalado.

6.2. MATERIALES

Para la obtención de los comprimidos con cubierta compactada se utilizó ISO (grado farmacéutico, Droguería Libertad, Argentina) y los gránulos de CMC-RIF descritos en el capítulo 2. La pureza, el porcentaje residual de solvente y la estabilidad de los excipientes fueron aseguradas mediante sus respectivos certificados de análisis, brindados por los proveedores de materias primas.

Como excipientes se seleccionaron materiales fácilmente disponibles, de grado farmacéutico y que no reportaran antecedentes de incompatibilidad con RIF o ISO o estén en formas farmacéuticas

solidas de RIF e ISO autorizadas para su comercialización. Celulosa microcristalina (Avicel® PH 200), fosfato de calcio dihidrato (Emcompress®), PVP (Kollidon® 90F), almidón glicolato sódico (Explotab®), estearato de magnesio y talco, fueron adquiridos en Parafarm®, Argentina. CMCNa fue adquirida en Fluka® (Suecia) y croscarmelosa sódica (Ac-di-sol®) fue provisto por Biopolymer® (USA).

Para la cubierta entérica se utilizó Eudragit® L30-D55 (Degussa®, Alemania), triacetina (Sigma®, Alemania) y talco (Parafarm®, Argentina). Para la cubierta adhesiva de alcohol polivinílico, se utilizó una dispersión acuosa al 20% de Lay-AQ P50204P (Aspirus®, Argentina).

Para los ensayos de disolución se utilizaron las soluciones de HCl/KCl pH 1,20 y la solución reguladora de fosfato pH 6,80 (USP). Además de estas soluciones, se utilizó también agua destilada para los ensayos de disgregación.

6.3. METODOLOGÍA

6.3.1. DEFINICION DE LOS ATRIBUTOS DE CALIDAD DEL PRODUCTO

Las especificaciones de una CDF de RIF e ISO formulada como comprimidos con cubierta compactada no se encuentran descriptas en la bibliografía de referencia. Para definir los atributos de calidad de la capa externa de CMC-RIF y el núcleo de ISO, descriptos en la **Tabla 6.2**, se utilizaron las especificaciones de la USP 39 para las cápsulas en CDF de RIF e ISO (21) y las especificaciones de ensayos de control de calidad de comprimidos de la Farmacopea Argentina (FA) 7Ed (22). El criterio de muy rápida velocidad de disolución fue establecido según la Disposición ANMAT 6766/16, de solicitud de bioexenciones para ingredientes farmacéuticos activos (23), que es coherente con el documento de la Administración de Alimentos y Fármacos (*Food and Drug Administration, FDA*) (24).

Tabla 6.2. Definición de los atributos de calidad asociados al perfil del producto

Atributo	Perfil de calidad del producto objetivo		Criticidad
	Perfil del producto objetivo	Atributos críticos de calidad	
Forma farmacéutica	Comprimido con cubierta compactada, conteniendo una capa externa formada por CMC-RIF y un núcleo de ISO.	<i>Liberación:</i> Capa externa: muy rápida velocidad de disolución de RIF (Q>85% en 15 min ^a) Núcleo: liberación retardada de ISO (Q>80% luego de 45 min en solución reguladora pH 6,80 y Q<10% luego de 2 h en medio ácido) <i>Disgregación^c:</i> Capa externa: <30 min en agua destilada. Núcleo: resistir en medio ácido durante 2 h y disgregarse en <30 min en solución reguladora pH 6,80.	Asegurar completa disgregación y disolución de RIF en el estómago e ISO en intestino.
Apariencia	Comprimido liso y brillante	Friabilidad <1% ^c	Tamaño y forma de fácil manipulación
Potencia	300 mg de RIF y 150 mg de ISO	Identificación (positiva) ^b Valoración ($\pm 5\%$) ^b Uniformidad de peso (CV% $\leq 6\%$) ^c	Asegurar la eficacia del tratamiento.
Vía de administración	Oral	Comprimido con cubierta compactada	Tamaño y forma de fácil deglución, masa < 1 gramo (núcleo ≤ 300 mg; capa externa ≈ 600 mg)
Estabilidad	Mantener la estabilidad de los fármacos a lo largo de su vida útil. Mejorar la estabilidad de RIF en medio ácido.	Ausencia de IH en la liberación en medio ácido.	Reducción de la degradación de RIF en medio ácido respecto a la CDF comercial de referencia.

a- Disposición ANMAT 6766/16.
b- Especificación de la USP 39 para cápsulas de RIF e ISO en combinación a dosis fija.
c- Métodos generales de análisis, FA 7 Ed.

6.3.2. ESTABLECIMIENTO DE LOS PARÁMETROS CRÍTICOS DE CONTROL

A los fines de identificar los parámetros críticos de control, se realizó una priorización de riesgos y un análisis de riesgos asociados a la formulación y al proceso de fabricación.

La identificación de los riesgos asociados a la fabricación de los comprimidos con cubierta compactada de RIF e ISO incluyó la determinación de los factores que inciden en los atributos

críticos de calidad. Para tal fin, se empleó una matriz de ponderación que contuvo atributos de calidad y amenazas probables, seleccionadas desde el perfil de calidad del producto objetivo (**Tabla 6.2**), las características de los componentes (**Tabla 6.1**), el flujo de proceso establecido (**Figura 6.2**), estudios de preformulación, revisión bibliográfica y experiencias de trabajo con productos similares. La severidad de la amenaza y su probabilidad de ocurrencia fue establecida categóricamente y de manera arbitraria, entre riesgo leve (1-verde) moderado (3-amarillo) y elevado (9-rojo) (15). El valor ponderado, el cual determina la criticidad de la materia prima y las etapas del proceso, correspondió a la sumatoria del producto entre el valor estipulado y el valor de criticidad que previamente se asignó a cada requerimiento de calidad. Para facilitar la interpretación visual, se graficaron los datos en un diagrama de Pareto, el cual evidencia aquellos aspectos críticos cuya mejora tendrá más impacto en la calidad del producto final (25).

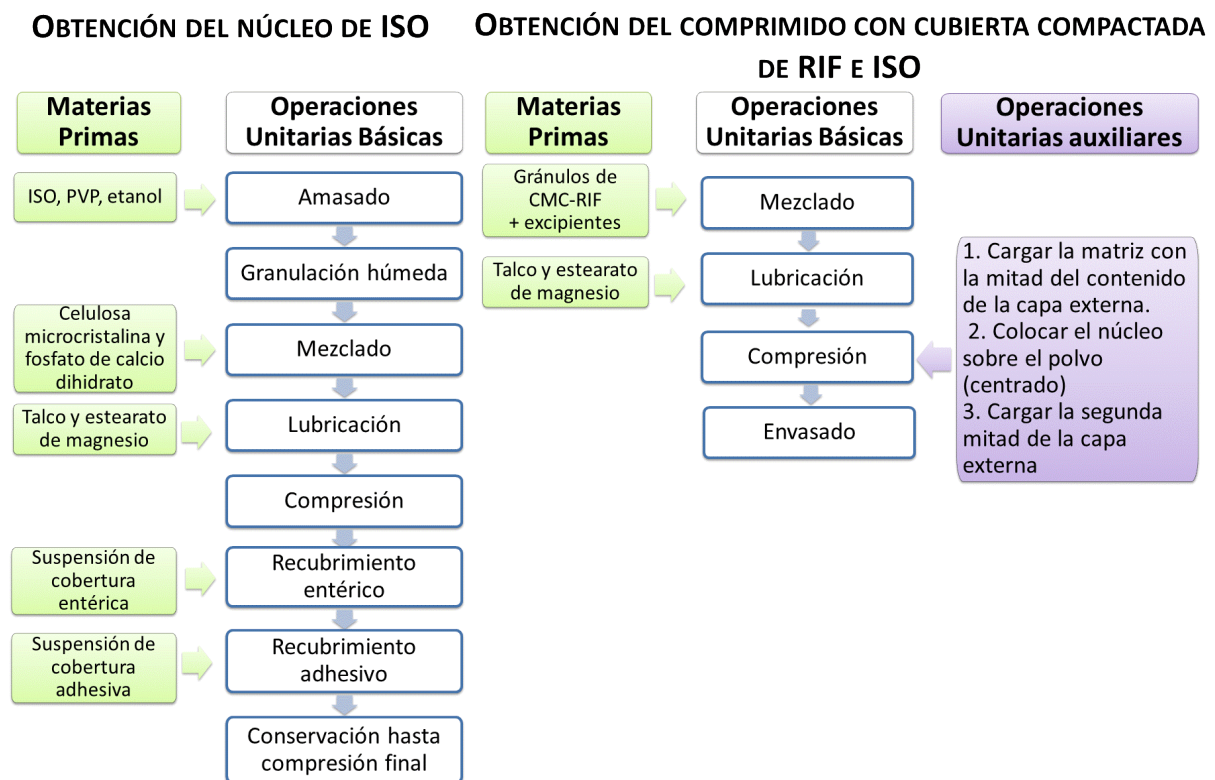


Figura 6.2. Diagrama de flujo de los procesos propuestos para la obtención del comprimido con cubierta compactada de RIF e ISO

6.3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Siguiendo la secuencia de operaciones esquematizada en la **Figura 6.2**, se obtuvieron los comprimidos con cubierta compactada. En función de los parámetros críticos más relevantes

representados en el diagrama de Pareto, se realizaron una serie de experimentos, siguiendo un diseño factorial, y se realizaron controles de proceso. La información recabada en cada etapa se analizó estadísticamente, utilizando el software Design Expert® 10, a los fines de establecer correlaciones entre variables y respuestas.

Abajo se describen algunos de los principales términos utilizados en el diseño factorial, para su mejor comprensión(20).

Factor: variable de estudio, controlable por el experimentador, sobre la cual se determina la influencia de una o varias respuestas. Los factores pueden ser cualitativos (por ejemplo, presencia o ausencia de cobertura) o cuantitativos (por ejemplo, % p/p de un dado excipiente).

Nivel: número de valores experimentales que se tendrán en cuenta en la realización del experimento, en cada factor. En el tratamiento matemático de los modelos de diseño de experimento, los factores cuantitativos son tratados como cualitativos y sus niveles son elegidos equi-espaciados o se codifican. Por ejemplo, si son dos niveles se utilizan los números 1 y -1 o (+) y (-), para indicar el valor más alto y más bajo de la serie.

Matriz de diseño: es el conjunto de puntos experimentales o tratamientos que pueden formarse considerando todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores.

6.3.3.1. EFECTO DE LA GRANULACIÓN HÚMEDA DE ISO EN EL FLUJO DE LOS POLVOS

Se realizó la granulación húmeda de ISO, para lo cual se interpuso el principio activo con 6 % p/p de PVP disuelta en etanol y se agitó mecánicamente (100-300 rpm) durante 15 min, hasta obtener una masa homogénea. La masa fue extruída a través de un tamiz de 600 μm . Los gránulos obtenidos fueron secados a 60 °C hasta lograr peso constante y posteriormente tamizados con una malla de 425 μm de poro, a los fines de homogeneizar el tamaño de partícula.

Con el objetivo de valorar la capacidad de flujo del polvo durante las operaciones farmacotécnicas fundamentales, se realizó la caracterización reológica de los gránulos y de la mezcla de estos con los excipientes. Para ello, se determinó el ángulo de reposo, la densidad a granel (DG), la densidad empaquetada (DE), el Índice de Carr (IC) y el Cociente de Hausner (CH), tal como se describe en el Capítulo 2 (sección 2.3.4.6).

6.3.3.2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL NÚCLEO Y DE LA COBERTURA ENTERICA EN SU DESEMPEÑO FARMACOTECNICO Y BIOFARMACÉUTICO

Se elaboraron una serie de comprimidos de ISO (núcleos) usando como excipientes celulosa microcristalina, fosfato de calcio dihidrato y estearato de magnesio, que se caracterizaron mediante ensayos de dureza, friabilidad, uniformidad de peso, disgregación en agua y disolución en solución reguladora de fosfato pH 6,80. Se seleccionaron las formulaciones más apropiadas para el posterior desarrollo del comprimido con cubierta compactada, que se sometieron a un proceso de cobertura entérica y, posteriormente, se aplicó un recubrimiento adhesivo. Los comprimidos de ISO recubiertos fueron caracterizados con los siguientes ensayos: determinación de la ganancia y uniformidad de peso luego de la cobertura, disgregación en medio ácido e intestinal simulado y disolución en solución reguladora de fosfato pH 6,80.

FORMULACIÓN DE LOS COMPRIMIDOS DE ISO: en un mezclador de doble cono se interpusieron los gránulos de ISO (150 mg/comprimido), fosfato de calcio dihidrato y celulosa microcristalina en proporciones definidas a tres niveles (1; 0; -1) (**Tabla 6.4**), se mezcló durante 12 min, seguido de 3 min de lubricación con 1,5% de estearato de magnesio. En total se prepararon tres lotes de mezcla (50 g) denominados N1, N2 y N3, que se ensayaron por triplicado según lo definido en la **Tabla 6.5**. Cada lote fue evaluado reológicamente mediante el ángulo de reposo, la DG, la DE, el IC y el CH. Los comprimidos (masa unitaria total 250 mg) se obtuvieron por compresión en comprimidora monopunzón (Talleres Sanchez, Modelo CS3-GMP), a una fuerza de compactación aproximada de 20 kN, con punzón bicóncavo n° 9.

Tabla 6.4. Variables de estudio para la optimización de la composición del núcleo

Factor	Nivel 1	Nivel 0	Nivel -1
Relación fosfato de calcio dihidrato:	23,2% (58,1 mg):	17,4% (43,6 mg):	11,6% (29,1 mg):
celulosa microcristalina	11,6% (29,1 mg)	17,4% (43,6 mg)	23,2% (58,1 mg)

Tabla 6.5. Matriz de diseño experimental para la optimización de la composición del núcleo

Formulación	Número de experimento	Relación fosfato de calcio dihidrato:celulosa microcristalina
N1	2	0
	3	0
	4	0
N2	1	1
	8	1
	9	1
N3	5	-1
	6	-1
	7	-1

RECUBRIMIENTO ENTÉRICO: La suspensión de recubrimiento entérico, descrita en la **Tabla 6.6**, se preparó dispersando talco en agua destilada con ayuda de un ultrahomogeneizador durante 1h. Luego se añadió triacetina (plastificante) y Eudragit L30 D55, manteniendo la agitación por 10 min más. Previo al recubrimiento, los comprimidos fueron sacudidos para eliminar el polvo fino y se colocaron en una paila (ERWEKA AR 403). Los comprimidos fueron recubiertos bajo las siguientes condiciones: temperatura de aire de entrada, 60 °C; velocidad de rotación 120 rpm, tiempo de recubrimiento 1 hora. Estas condiciones fueron establecidas luego de estudios preliminares en nuestro laboratorio.

Tabla 6.6. Composición de la suspensión utilizada para el recubrimiento entérico

Componentes	Cantidad
Eudragit L30 D55	84 mL
Triacetina	2,5 mL
Talco	12,5 g
Agua destilada csp	300 mL

RECUBRIMIENTO ADHESIVO: Consecutivamente, los comprimidos se recubrieron con alcohol polivinílico, que consistió en una dispersión acuosa al 20 % p/v de Lay-AQ P50204P. Para ello se utilizó un equipo de lecho fluido (CALEVA Mini Coater Drier MCD-110-0CD). El recubrimiento se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

- Aire de entrada: temperatura 60 °C, velocidad 16 m/s;
- Agitación: 16 Hz;
- velocidad de la bomba: 3,40 rpm;
- Tiempo de recubrimiento 15 min.

Estas condiciones fueron definidas previamente, en estudios preliminares en nuestro laboratorio.

CARACTERIZACIÓN FARMACOTÉCNICA Y BIOFARMACÉUTICA DEL NÚCLEO

Los comprimidos de ISO, previo a ser recubiertos, fueron caracterizados mediante las siguientes técnicas.

Dureza: fue determinada utilizando un durómetro (AVIC, Argentina). Los comprimidos (n=10) fueron individualmente colocados entre el yunque y el cabezal y se aplicó presión hasta que el comprimido se quebrara diametralmente.

Friabilidad: Indica la capacidad de la formulación de soportar estrés mecánico. Se colocaron 6,5 g de comprimidos exactamente pesados en un friabilómetro (Scout, Argentina) codificado por

Farmacopea Argentina 7 Ed., a 25 rpm por 4 min. Luego de un total de 100 revoluciones, los comprimidos fueron sacudidos en un tamiz y re-pesados. La friabilidad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Friabilidad} = (\text{Masa inicial} - \text{Masa final}) / \text{Masa final} \times 100$$

Uniformidad de peso: Se seleccionaron aleatoriamente 10 comprimidos de cada formulación y se pesaron individualmente en una balanza analítica (Mettler Toledo, Alemania). Se determinaron el promedio y el coeficiente de variación (CV%) del peso, considerándose aceptable un CV% \leq 6%, siempre que el peso de los comprimidos se encuentre en un rango comprendido entre el 85 y el 115% del valor teórico establecido.

Disgregación: en un equipo normatizado (Hanson, USA) se realizó el procedimiento codificado por FA 7 Ed para *comprimidos no recubiertos* (22) (1000 mL de agua destilada; 37 °C; n=6). Se registró el tiempo requerido para observar ausencia de partículas palpables en la cesta.

Disolución: Se llevó a cabo en el aparato 1, a 100 rpm, 37°C. Se utilizó como medio de disolución 900 mL solución reguladora de fosfato pH 6,80, para imitar la segunda fase del ensayo de disolución de formulaciones de liberación retardada (FA) (22). Se tomaron muestras de 1,5 mL a intervalos de 5, 15, 30, 45 y 60 min. Las soluciones, adecuadamente diluidas con solución reguladora, se cuantificaron mediante espectrofotometría UV (equipo Thermo Scientific Evolution 300) a 261 nm. El porcentaje acumulativo de ISO liberada se calculó basado en una curva de calibración realizada a 261 nm, E: $3992,5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (r^2 : 0,9996; entre $4,17 \cdot 10^{-5}$ y $20,87 \cdot 10^{-5}$ M). Los perfiles de disolución se compararon mediante la ecuación del factor de similitud (f_2) (26).

Luego del recubrimiento entérico, los comprimidos fueron sometidos a observación visual, a los fines de identificar signos de erosión, grietas, bordes gastados o cualquier indicio de falla en el recubrimiento. Se determinó la uniformidad y la ganancia de peso. Esta última fue indicativa de la eficiencia de la cobertura. Además se determinó el tiempo de disgregación, tal como se detalla abajo. La disolución *in vitro* se realizó en las mismas condiciones de los comprimidos de ISO no recubiertos.

Ganancia de peso: Se seleccionaron aleatoriamente 10 comprimidos recubiertos y se pesaron individualmente en una balanza analítica (Mettler Toledo, Alemania). Se determinó el promedio de peso de éstos comprimidos, y se le restó el promedio de peso de los comprimidos no recubiertos. El resultado se expresó como el porcentaje de incremento de masa luego del recubrimiento. En general se considera aceptable un incremento de masa del 2-3%.

Disgregación: en un equipo normatizado (Hanson, USA) se realizó el procedimiento codificado por FA 7 Ed para *comprimidos con cubierta entérica* (22). En un dispositivo con una base cribada, se colocaron 6 comprimidos de ISO recubiertos, que se sometieron a ciclos de agitación durante 2h en 1000 mL de solución HCl/KCl de pH 1,20 (37 °C). Luego de este tiempo se extrajeron los comprimidos y se los inspeccionó visualmente, a los fines de detectar ausencia de signos de disgregación, resquebrajamiento o ablandamiento. Luego, los mismos comprimidos se sometieron a ciclos de agitación en 1000 mL de solución reguladora de fosfato pH 6,80 (37 °C) y se registró el tiempo requerido para observar ausencia de partículas palpables en la base cribada.

Para todos los ensayos, los criterios de aceptación fueron los establecidos por FA 7 Ed (22). Cuando corresponde, los resultados se informaron como el promedio \pm la desviación estándar.

6.3.3.3. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA CAPA EXTERNA EN EL DESEMPEÑO FARMACOTÉCNICO Y BIOFARMACÉUTICO DE LOS COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA

En un mezclador de doble cono, se adicionó CMC-RIF (300 mg RIF/comprimido) y celulosa microcristalina, CMCNa, almidón glicolato sódico, croscarmelosa sódica en proporciones definidas a dos niveles (1; -1) (**Tabla 6.7**), que se mezclaron durante 12 min, seguido de 3 min de lubricación con 1,8% de estearato de magnesio y 0,9% de talco. En total se prepararon cinco lotes de mezcla (masa total 11,20- 12 g), denominados CE1 al CE5, tal como se resume en la **Tabla 6.8**. La masa final de la capa externa fue de 560-600 mg/comprimido.

Para la obtención de los comprimidos con cubierta compactada, la comprimidora monopunzón (Talleres Sanchez, Modelo CS3-GMP) se equipó con un punzón bicóncavo de 15 mm de diámetro. Primero se llenó manualmente la matriz con una mitad del contenido de la capa externa. Luego se colocó el núcleo sobre el polvo asegurándose que su posición esté centrada y paralela al punzón. Posteriormente, la segunda mitad de la capa externa se añadió cuidadosamente y se activó un ciclo de compresión, con una fuerza de compactación aproximada de 100 KN (**Figura 3**).

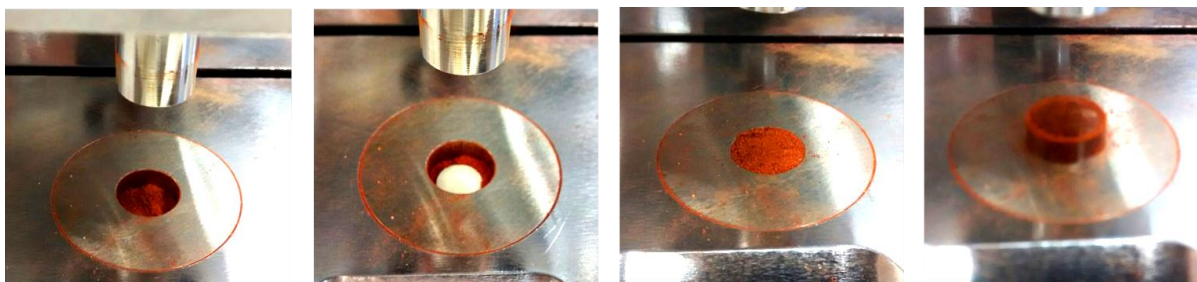


Figura 6.3. Etapas de la compresión de la capa externa, en la elaboración del comprimido con cubierta compactada de RIF e ISO.

Tabla 6.7. Variables de estudio para la optimización de la composición de la capa externa

Factores	Nivel 1	Nivel -1
Celulosa microcristalina	28%	17%
CMCNa	5%	0%
croscarmelosa sódica	5%	0%
almidón glicolato sódico	5%	0%

Tabla 6.8. Matriz de diseño experimental para la optimización de la capa externa

Formulación	Número de experimento	Celulosa microcristalina	CMCNa	Croscarmelosa sódica	Almidón glicolato sódico
CE1	1	-1	-1	-1	-1
CE2	2	-1	1	-1	-1
CE3	3	1	-1	1	-1
CE4	4	-1	-1	1	-1
CE5	5	-1	-1	-1	1

CARACTERIZACIÓN FARMACOTÉCNICA Y BIOFARMACÉUTICA DEL COMPRIMIDO CON CUBIERTA COMPACTADA DE RIF E ISO

Los comprimidos con cubierta compactada se sometieron a los siguientes ensayos:

Dureza: se determinó utilizando un durómetro (AVIC, Argentina), n=10.

Disgregación: fue evaluada mediante el procedimiento codificado por FA 7 Ed para *comprimidos con cubierta entérica* (22). En un dispositivo con una base cribada, se colocaron 6 comprimidos con cubierta compactada, que se sometieron a ciclos de agitación durante 2 h en 1000 mL de solución HCl/KCl de pH 1,20 (37°C). Luego de este tiempo se extrajeron los núcleos y se los inspeccionó visualmente, a los fines de detectar ausencia de signos de disgregación, resquebrajamiento o

ablandamiento. Luego, los núcleos se sometieron a ciclos de agitación en 1000 mL de solución reguladora de fosfato pH 6,80 (37 °C). Se registró el tiempo requerido para observar completa disgregación de la capa externa en medio ácido y el tiempo en el que se observó ausencia de partículas palpables del núcleo en la base cribada, a pH 6,80.

Disolución: se utilizó el aparato 1 a 100 rpm y 37 °C, n=6, conteniendo 900 mL de solución HCl/KCl pH 1,20. A los 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos de ensayo se tomaron muestras de 15 mL utilizando cánulas filtrantes. A los fines de saturar el filtro, se descartaron los primeros 10 mL (que fueron devueltos al vaso) y se repusieron 5 mL con medio fresco. A cada muestra extraída (5 mL) se le agregó 500 µL de la solución de ácido ascórbico y se llevó a volumen final de 10 mL con solución reguladora de fosfato 0,27 M, pH=7,6. Estas soluciones se agregaron para evitar la degradación oxidativa y la hidrólisis ácida de RIF (pH final alcanzado 6,61±0,07). Las muestras fueron inmediatamente cuantificadas mediante el método de HPLC indicativo de estabilidad, validado en el Capítulo 4. Se utilizó como parámetro de desempeño la cantidad porcentual de RIF disuelta a los 15 min, considerándose aceptable concentraciones $\geq 85\%$. A los fines de evaluar la estabilidad de RIF y el desempeño del núcleo de ISO en este medio, se continuó el ensayo durante 2 h.

6.3.3.4. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA CAPA EXTERNA Y DE LA COBERTURA ADHESIVA EN LA FRIABILIDAD DE LOS COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA

Se llevó a cabo el experimento descrito en el punto anterior, con pequeñas modificaciones. En este caso adicionó en un mezclador de doble cono, CMC-RIF (300 mg RIF/comprimido) y celulosa microcristalina en una proporción fija (28% p/p). Además se agregó CMCNa, almidón glicolato sódico o croscarmelosa sódica en proporciones definidas a dos niveles (1; -1) (**Tabla 6.9**), que se mezclaron durante 12 min, seguido de 3 min de lubricación con 1,8% de estearato de magnesio y 0,9% de talco. En total se prepararon seis lotes de mezcla (masa total 11,20- 12 g), denominados CE6 al CE11, tal como se resume en la **Tabla 6.10**. La masa final de la capa externa fue de 560-600 mg/comprimido. Además de tener en cuenta la composición de la capa externa, se agregó como factor la cobertura adhesiva de alcohol polivinílico a dos niveles (presencia; ausencia).

Tabla 6.9. Variables de estudio para la evaluación del efecto de la composición de la capa externa y de la cobertura adhesiva en la friabilidad de los comprimidos con cubierta compactada

Factores	Nivel 1	Nivel -1
CMCNa	5%	0%
Croscarmelosa sódica	5%	0%
Almidón glicolato sódico	5%	0%
Cobertura adhesiva	Presente	Ausente

Tabla 6.10. Matriz de diseño experimental para la evaluación del efecto de la composición de la capa externa y de la cobertura adhesiva en la friabilidad de los comprimidos con cubierta compactada

Formulación	Número de experimento	CMCNa	Croscarmelosa sódica	Almidón glicolato sódico	Cobertura adhesiva
CE6	1	-1	-1	-1	-1
CE7	2	1	-1	-1	1
CE8	3	-1	1	-1	-1
CE9	4	-1	-1	1	1
CE10	5	-1	1	-1	1
CE11	6	-1	-1	1	1

Los comprimidos con cubierta compactada obtenidos fueron sometidos al ensayo de friabilidad (n=10/lote).

6.3.3.5. EFECTO DE LA FUERZA DE COMPRESIÓN FINAL Y LA COMPOSICIÓN DEL NÚCLEO EN SU DESEMPEÑO BIOFARMACEUTICO

El proceso de compresión de la capa externa es un parámetro crítico prioritario, en consecuencia, el establecimiento de la fuerza de compresión es fundamental. Respecto a este punto, la comprimidora disponible no permite registrar la fuerza de compresión y los valores brindados por el monitor del equipo son orientativos. Sin embargo, se conoce que la dureza alcanzada por el comprimido es representativa de la fuerza de compresión generada.

En este contexto, se obtuvieron comprimidos de ISO con proporciones variables de fosfato de calcio dihidrato y celulosa microcristalina, definidas a dos niveles (1;-1). Estos comprimidos fueron sometidos a procesos de cobertura entérica y adhesiva. Finalmente, la capa externa fue compactada con distinta fuerza de compresión, de manera que se establecieron dos grupos de dureza (15 y 30 kg/cm²). A partir de los datos recabados, se planteó un diseño experimental del tipo 2², dos factores a dos niveles, para determinar la influencia de la dureza y la composición del núcleo en la velocidad

de disolución de ISO. Las variables de estudio se describen en la **Tabla 6.11** y la matriz experimental se resume en la **Tabla 6.12**.

Tabla 6.11. Variables de estudio para la evaluación del efecto de la dureza y la composición del núcleo en su disolución, luego de la compactación de la capa externa

Factores	Nivel 1	Nivel -1
Relación fosfato de calcio dihidrato:celulosa microcristalina	23,2% (58,1 mg): 11,6% (29,1 mg)	11,6% (29,1 mg): 23,2% (58,1 mg)
Dureza (kg/cm ²)	30	15

Tabla 6.12. Matriz de diseño experimental para la evaluación del efecto de la dureza y la composición del núcleo en su disolución, luego de la compactación de la capa externa

Formulación	Número de experimento	Relación fosfato de calcio dihidrato:celulosa microcristalina	Dureza
N2	1	1	1
	2	1	-1
N3	3	-1	-1
	4	-1	1

Los comprimidos con cubierta compactada fueron sometidos a un ensayo de disolución secuencial, tal como se describe en el ensayo de disolución para formas farmacéuticas sólidas de liberación retardada (FA, Método II) (22). Para ello se utilizó el aparato 1 a 100 rpm y 37°C, n=6. En la atapa ácida los comprimidos se mantuvieron durante 2 h en 900 mL de solución HCl/KCl pH 1,20. Finalizado ese tiempo, se retiraron las cestas conteniendo los núcleos recubiertos y se cambió el medio de disolución de los vasos, por 900 mL de solución reguladora de fosfato, pH 6,80 (etapa intestinal). El ensayo se continuó por 45 min más, cuando se tomaron muestras (5 mL), que se cuantificaron mediante el método de HPLC indicativo de estabilidad, validado en el capítulo 3. Se consideró como parámetro de desempeño aceptable, una cantidad de ISO disuelta $\geq 80\%$ a los 45 min de ensayo.

6.4. RESULTADOS

El establecimiento de rangos de aceptación probados para un parámetro de proceso representa el área de conocimiento del proceso y delimita la región entre el máximo y el mínimo valor en el cual un producto de calidad predeterminada es producido consistentemente. En esta etapa de desarrollo, el conocimiento adquirido permitió construir un flujo de proceso con variables predefinidas que aseguraron la calidad del producto final.

6.4.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS PARÁMETROS CRÍTICOS DE CONTROL

Los atributos críticos de calidad y su ponderación asignados se describen en la **Tabla 6.13**.

Tabla 6.13. Atributos críticos de calidad y su ponderación para los comprimidos con cubierta compactada

1	1	1	9	9	9	9	3
Peso	Dimensiones	Dureza	Friabilidad	Disgregación	Disolución	Uniformidad de contenido	Estabilidad

La matriz de ponderación de las variables de composición de la formulación en el análisis preliminar del riesgo se representa en la **Tabla 6.14**.

La ponderación del riesgo se calculó con la siguiente ecuación:

$$Ponderación\ del\ riesgo = \sum_{i=1}^{i=n} (A \times B)_i$$

Donde **A** es el valor asignado a cada atributo crítico de calidad y **B** es el valor asignado al grado de impacto que tiene un componente (o etapa del proceso) en un atributo crítico de calidad determinado.

Por ejemplo, para el caso de la ponderación del riesgo del uso de PVP en la formulación se calculó:

Ponderación del riesgo

$$= (1 \times 1) + (1 \times 1) + (1 \times 3) + (9 \times 1) + (9 \times 3) + (9 \times 1) + (9 \times 1) + (3 \times 1) = 62$$

El resultado de la ponderación se graficó en el diagrama de Pareto (**Figura 6.4**).

El mismo procedimiento fue aplicado a las variables de proceso en el desarrollo de los comprimidos con cubierta compactada, y se describe en la **Tabla 6.15**. La ponderación encontrada se graficó en la **Figura 6.5**.

Tabla 6.14. Análisis preliminar de riesgo para identificar las variables de composición de la formulación que afectan la calidad del comprimido con cubierta compactada.

Componentes		1	1	1	9	9	9	9	3	Ponderación del riesgo
		Peso	Dimensiones	Dureza	Friabilidad	Disgregación	Disolución	Uniformidad de contenido	Estabilidad	
Núcleo	PVP	1	1	3	1	3	1	1	1	62
	Fosfato de calcio dihidrato	3	3	1	1	3	3	1	1	82
	Celulosa microcristalina	3	3	1	1	1	1	1	1	46
	Estearato de magnesio	1	1	1	1	1	1	1	1	42
	ISO	3	3	1	1	1	1	1	1	46
	Suspensión de cobertura (entérica + adhesiva)	1	1	1	9	3	3	1	3	156
Capa externa	Celulosa microcristalina	3	3	1	1	1	1	1	1	46
	CMC-RIF	3	3	9	9	1	1	1	3	132
	CMCNa	1	1	1	1	3	3	1	1	78
	Croscarmelosa sódica	1	1	1	1	1	1	1	1	42
	Almidon glicolato sódico	1	1	3	3	1	1	1	1	62
	Estearato de magnesio/talco	1	1	1	1	3	1	1	1	60

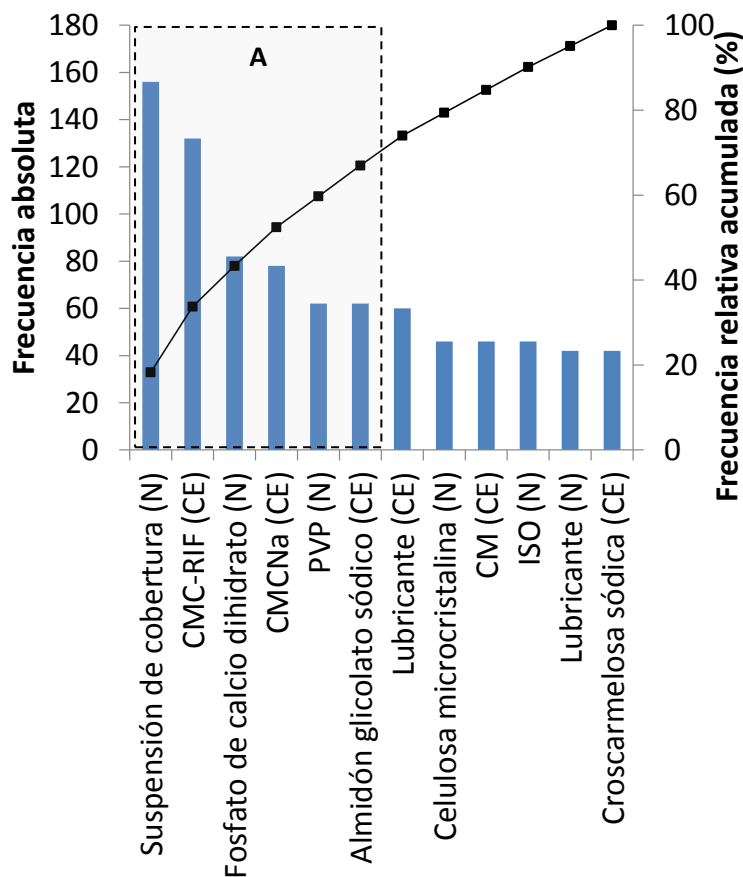


Figura 6.4. Diagrama de Pareto para las variables de composición de los comprimidos con cubierta compactada. N: núcleo; CE: capa externa. Con la letra A se distinguen las variables que abarcan el 75% de incidencia en el riesgo.

Tabla 6.15. Análisis preliminar de riesgo para identificar las variables de proceso que afectan la calidad del comprimido con cubierta compactada.

Etapa del proceso		1	1	1	9	9	9	9	3	Ponderación del riesgo
		Peso	Dimensiones	Dureza	Friabilidad	Disgregación	Disolución	Uniformidad de contenido	Estabilidad	
Núcleo	Granulación húmeda	1	1	3	1	1	1	9	1	116
	Mezclado	1	1	1	1	1	1	3	1	60
	Lubricación	1	1	1	1	1	1	1	1	42
	Compresión	1	1	3	3	3	3	3	1	116
	Cobertura entérica	1	1	3	1	9	9	1	3	194
	Cobertura adhesiva	1	1	1	9	1	1	1	1	114
Capa externa	Mezclado	1	1	1	1	1	1	3	1	60
	Lubricación	1	1	1	1	3	1	1	1	60
	Compresión	1	1	9	9	9	9	3	1	284
	Envasado	1	1	1	1	1	1	1	3	48

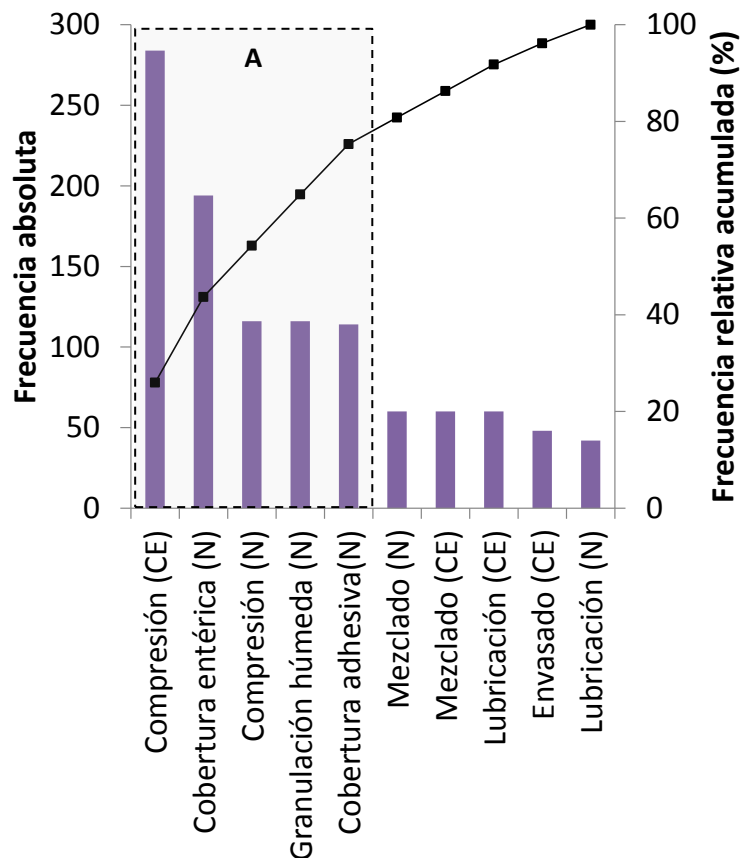


Figura 6.5. Diagrama de Pareto para las variables de proceso de los comprimidos con cubierta compactada. N: núcleo; CE: capa externa. Con la letra A se distinguen las variables que abarcan el 75% de incidencia en el riesgo.

El diagrama de Pareto divide los parámetros en tres grupos, según la incidencia del riesgo. Así se tiene el grupo A, que representa el 75-80% del riesgo; el grupo B, que representa el 15-20% de

riesgo restante; y el grupo C, que representa tan solo al 5% de riesgo. A los fines de concentrar los esfuerzos en las variables que presenten mayor riesgo, se consideraron como parámetros críticos aquellas variables contenidas en el grupo A.

De hecho, la suspensión de cobertura (entérica y adhesiva) y CMC-RIF tienen un alto impacto en la calidad de la formulación (18,3 y 15,5% de incidencia de riesgo). Respecto a las variables de proceso, la compresión final y el recubrimiento entérico son los parámetros críticos que presentan mayor influencia en los atributos críticos de calidad, abarcando el 43,7% del riesgo detectado. La cobertura adhesiva, aunque presentó menor impacto en el riesgo, también fue considerada crítica ya que está estrechamente vinculada con la cubierta entérica. La compresión del núcleo y la granulación húmeda de ISO son operaciones críticas de menor riesgo que también se tuvieron en cuenta en el diseño experimental.

Los parámetros críticos seleccionados fueron evaluados en cuanto a la influencia en la variación de los componentes y de los parámetros de proceso, respecto de la obtención de un producto de calidad aceptable.

Parámetros como el mezclado no resultaron críticos por la alta proporción de principio activo respecto a la de los excipientes y a que se tiene experiencia en lograr un mezclado homogéneo con el equipamiento disponible. De la misma manera, la lubricación con talco o estearato de magnesio en proporciones del 0,5 al 2,0% no han mostrado inconvenientes en la disgregación o disolución de RIF o ISO en experimentos previos.

6.4.2. EFECTO DE LA GRANULACIÓN HÚMEDA DE ISO EN EL FLUJO DE LOS POLVOS

En la **Tabla 6.16** se resumen los resultados de la caracterización reológica de los gránulos de ISO y de las mezclas de éstos en las formulaciones (N1, N2 y N3). Para los gránulos de ISO, el ángulo de reposo, indicativo de su grado de fluidez, clasificó como muy bueno, y el CH y el IC, indicativos del flujo y la compresibilidad del material respectivamente, fueron buenos.

Tabla 6.16: Propiedades reológicas de los gránulos de ISO y los polvos de composición N1, N2 y N3.

Formulación	Angulo de reposo (°)	DG (g/mL)	DE (g/mL)	IC	CH
Gránulos de ISO	32±1	0,392±0,006	0,47±0,02	20±4	1,200±0,04
N1	27±2	0,47±0,02	0,562±0,007	20±4	1,200±0,04
N2	28±1	0,450±0,002	0,530±0,002	17,62±0,07	1,1762±0,0007
N3	26±2	0,472±0,003	0,556±0,003	17,64±0,05	1,1764±0,0005

Las formulaciones N1, N2 y N3 mejoraron significativamente el flujo de los gránulos, ya que presentaron un ángulo de reposo que clasificó como excelente. Dicha mejora fue consecuencia

principalmente por el agregado de celulosa microcristalina, que por su tamaño de partícula y morfología esférica, otorga buen flujo a las mezclas. Respecto al CH y al IC, la formulación N1 no mostró mejorías en relación a los valores de los gránulos, mientras que las formulaciones N2 y N3 presentaron un IC y un CH que clasificaron como muy buenos. De todas maneras, el flujo de las tres formulaciones es satisfactorio para la elaboración de comprimidos, ya que aseguraría un adecuado llenado de la matriz y una buena uniformidad de contenido.

6.4.3. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL NÚCLEO EN SU DESEMPEÑO FARMACOTECNICO Y BIOFARMACÉUTICO

Los núcleos obtenidos según el proceso definido en la **Figura 6.2**, fueron de aspecto liso y brillante, sin indicios de laminación, adhesión o bordes irregulares (**Figura 6.6**).



Figura 6.6. Comprimidos de ISO (núcleos) obtenidos de la formulación N3.

Se conoce que la producción de comprimidos requiere el descarte de los comprimidos iniciales y finales. Esto se relaciona, en primer lugar, con el ajuste del peso y, en segundo lugar, con la reducción de densidad en el polvo en la tolva al final de la compresión. Mientras mayor es el lote, menor es el impacto (en % de masa) de ese descarte.

En esta etapa, el rendimiento del proceso de compresión fue bajo (entre 48 y 54%, según el lote), ya que a escala experimental, la puesta a punto del proceso de compresión tuvo mayor influencia en el rendimiento. Sin embargo, a gran escala se reduciría este problema.

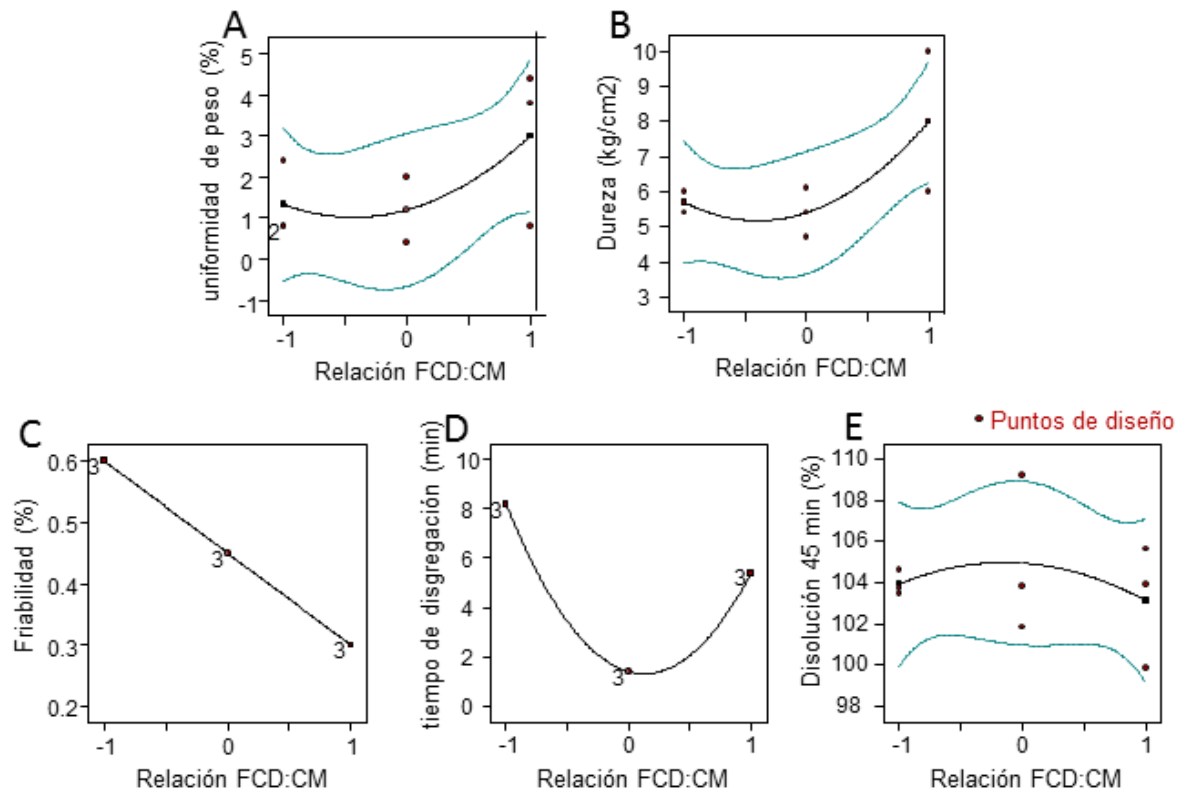


Figura 6.7. Gráfico de un factor de la relación de fosfato de calcio dihidrato:celulosa microcristalina (FCD:CM) en el efecto la (A) uniformidad de peso; (B) dureza; (C) friabilidad; (D) disgregación y (E) disolución de los núcleos de ISO; obtenido con el software DesignExpert® 10. El nivel 1 corresponde a la formulación N2; el nivel 0 corresponde a la formulación N1 y el nivel -1 corresponde la formulación N3. La línea celeste representa el intervalo de confianza $\geq 95\%$.

Como lo indica la **Figura 6.7**, los comprimidos fueron de peso uniforme, ya que para todas las relaciones de fosfato de calcio dihidrato:celulosa microcristalina el CV% fue menor al 5%. La dureza de cada lote de comprimidos fue variable, especialmente para la formulación N2. Sin embargo, todos los lotes presentaron buena resistencia mecánica (friabilidad < 1%).

La disgregación, en todos los casos, fue menor a 10 min. Dado que ISO es un fármaco hidrofílico y de alta solubilidad (clase I/III en el sistema de clasificación biofarmacéutico), el tiempo de disgregación debería correlacionarse con la velocidad de disolución. De hecho, Chandira *et al* (2012) observó que comprimidos de ISO asociados a etambutol se disgregaron en menos de 10 min, obteniéndose una liberación completa de ISO a los 45 min (27).

La evaluación de la disolución de los comprimidos previa al proceso de cobertura, necesaria para establecer la adecuada liberación del principio activo en medio intestinal, mostró que las tres formulaciones se ajustan a un sistema de liberación inmediata y superan el porcentaje acumulado de

ISO establecido por FA 7Ed (80% a los 45 min) (22), alcanzando N1, N2 y N3 valores de 106, 105 y 104 % del contenido nominal al cabo de 45 min, respectivamente. Sin embargo, las formulaciones muestran un perfil de disolución que no se correlaciona con la cantidad de desintegrante incorporado (**Figura 6.8**). De hecho, la formulación N3, que presentó mayor proporción de celulosa microcristalina, tiene un perfil similar a N2 ($f_2= 68$), la cual contuvo la menor proporción de celulosa microcristalina de la serie.

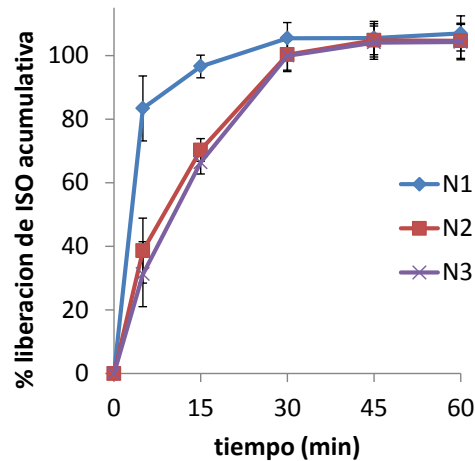


Figura 6.8. Perfiles de disolución de los núcleos de ISO en solución reguladora pH 6,80, previo al recubrimiento entérico.

Dado que los parámetros evaluados muestran que las tres composiciones llevan a un desempeño adecuado del núcleo previo a su recubrimiento, se seleccionaron para proseguir N2 y N3.

N2 se seleccionó por su menor contenido de celulosa microcristalina, el cual es sensible a elevados niveles de humedad. Comprimidos con alto contenido de este excipiente corren el riesgo de erosión, lo que conllevaría a la pérdida de su calidad.

N3 se seleccionó por su menor contenido de fosfato de calcio dihidrato. De hecho, se ha descrito que formulaciones con menor proporción de este excipiente son menos sensibles ante pequeños aumentos de la fuerza de compactación, por el contrario, mantienen bajos tiempos de desintegración y rápida velocidad de disolución (10). Esta consideración es importante, teniendo en cuenta el sometimiento de los núcleos a un doble proceso de compresión.

6.4.4. EFECTO DE LA COBERTURA ENTERICA EN EL DESEMPEÑO FARMACOTECNICO Y BIOFARMACÉUTICO DE LOS NUCLEOS

El proceso de cobertura entérica es una variable crítica de proceso, ya que requiere del ajuste de un conjunto de condiciones para su adecuada operación y es una etapa crucial para la correcta funcionalidad del núcleo. El establecimiento de acciones de control y sus límites es fundamental. Una ganancia de peso entre 2-3% (3), la uniformidad de peso con CV <6%, la adecuada disgregación del comprimido y posterior disolución de ISO serían indicativos de un adecuado desempeño de los comprimidos recubiertos.

La **Tabla 6.17** muestra los parámetros de cobertura para los comprimidos de ISO. Los comprimidos fueron recubiertos uniformemente (CV < 2,7%) y la ganancia de peso fue superior a la recomendada en bibliografía. La cobertura fue apropiada, ya que no se observaron bordes gastados ni ruptura, erosión o grietas en la superficie de los comprimidos.

En el ensayo de disgregación en medio ácido, ambas formulaciones permanecieron sin indicios de ruptura de la cubierta o penetración de líquido, al cabo de 2 h. En medio intestinal simulado, la formulación N2 se disgregó en 10,5 min y la N3 en 2,0 min. Esta diferencia puede ser explicada por la mayor ganancia de peso en N2, lo que indica la formación de una cubierta más gruesa, que requiere más tiempo para disolverse y permitir la disgregación. Este ensayo, por su simplicidad y la rapidez en la obtención de resultados, se utilizó como control en proceso para seleccionar los lotes aceptables.

Tabla 6.17. Resultados del proceso de cobertura entérica

Formulación	Ganancia de peso	Masa total unitaria	Uniformidad de peso (CV%)
N2	9,5%	(0,264±0,007) g	2,7%
N3	7,1%	(0,270±0,006) g	2,2%

La **Figura 6.9** muestra los perfiles de disolución de N2 y N3 recubiertos. Ambas formulaciones presentan un pequeño retraso en la disolución (*lag-time*), de 10-15 min, característico de formas farmacéuticas sólidas con cubierta entérica o cápsulas. Sin embargo, ese retraso no afecta al cumplimiento, ya que N2 y N3 alcanzaron 93 y 99 % del contenido nominal al cabo de 45 min, respectivamente. Complementariamente, su perfil de disolución es similar (f2=53), por lo que ambos pueden ser usados como núcleo, y se espera que su desempeño sea semejante.

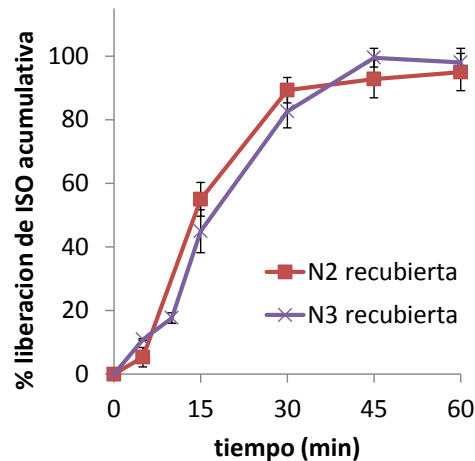


Figura 6.9. Perfiles de disolución de los núcleos N2 y N3 recubiertos entéricamente, en solución reguladora de pH 6,80.

Los comprimidos de N2 y N3 se recubrieron posteriormente con alcohol polivinílico. Este paso fue necesario porque la película de Eudragit L30 D55 no se adhiere a otros excipientes. En las condiciones preestablecidas, se obtuvieron pequeños lotes (10-15 comprimidos) recubiertos uniformemente, sin indicio de adhesión, ruptura o erosión y con un incremento de peso entre 3 y 5%. Ya que el alcohol polivinílico se disuelve rápidamente, no es crítica la evaluación de la disolución de los comprimidos luego del recubrimiento adhesivo.

En una etapa posterior, se podría desarrollar una dispersión de cobertura entérica que aumente la adherencia con la capa externa sin afectar la resistencia de la película al medio ácido.

6.4.5. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA CAPA EXTERNA EN EL DESEMPEÑO FARMACOTECNICO Y BIOFARMACÉUTICO DE LOS COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA

Los comprimidos con cubierta compactada mostraron un aspecto liso y brillante, sin indicios de laminación, adhesión o bordes irregulares (**Figura 6.10**). Se elaboraron cinco lotes de 15-20 unidades (**Tabla 6.8**). En este caso, el rendimiento fue cercano al 80% debido a que la compresión fue manual y no fue necesario el ajuste del peso.

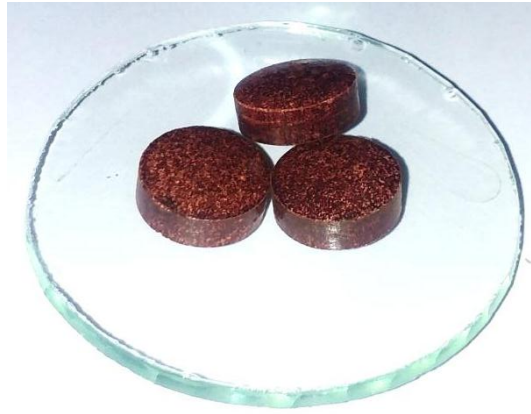


Figura 6.10. Comprimidos con cubierta compactada de RIF e ISO.

El diseño experimental planteado, aunque no permitió observar una correlación completa de los datos, aportó información cualitativa.

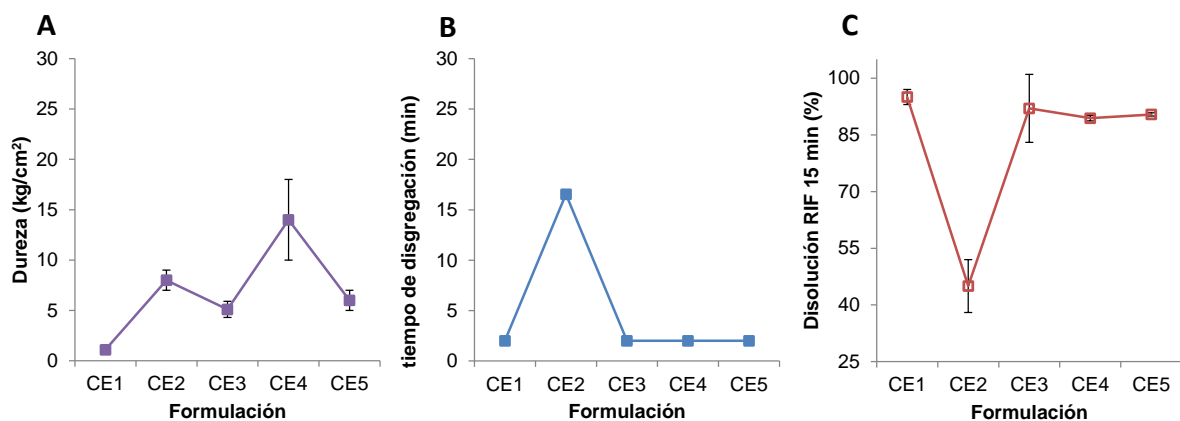


Figura 6.11. Efecto de la composición de la capa externa en (A) dureza, (B) tiempo de disgregación en agua destilada, (C) disolución de RIF en solución de HCl/KCl, pH 1,20, a los 15 min.

La dureza de las capas externas fue variable y no se correlacionó con la modificación en las proporciones de los excipientes (**Figura 6.11A**).

El tiempo de disgregación en agua destilada de las capas externas ensayadas (**Figura 6.11B**) estuvo dentro de las especificaciones de FA. Formulaciones conteniendo celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica o almidón glicolato sódico mostraron muy rápida velocidad de disgregación, siendo esta menor a 2 min. Por otra parte, la presencia de CMCNa en la capa externa aumentó significativamente el tiempo de disgregación, a 16,5 min.

La velocidad de disolución de RIF (**Figura 6.11C**) estuvo directamente relacionada a la composición de la capa externa. La CMCNa disminuyó apreciablemente la velocidad de disolución de RIF, lo cual está relacionado con la capacidad de este excipiente para aglutinar y formar capa gel. Por otra parte, la celulosa microcristalina, sola o junto con croscarmelosa sódica o almidón glicolato sódico, en baja o alta proporción, produjeron muy rápida velocidad de liberación de RIF, alcanzando valores entre el 89-95% de RIF al cabo de 15 min. Estos valores fueron similares a los observados para la disolución de la matriz de CMC-RIF sola, informados en el Capítulo 2.

El seguimiento de la disolución durante 2 h permitió corroborar ausencia de ISO, lo que indicó que el núcleo no perdió funcionalidad tras la segunda compresión. En consecuencia, tampoco se observa la formación de IH. En la **Figura 6.12** se representan la concentración porcentual de RIF remanente y los niveles de 3FRSV formados al cabo de 2 h de disolución en medio ácido. En todos los ensayos la degradación de RIF fue similar, formándose similares niveles de 3FRSV, incluso comparado contra matrices de CMC-RIF solo, considerado control. Esto da clara evidencia de la compatibilidad de los excipientes seleccionados, ya que no aportan a la degradación de RIF.

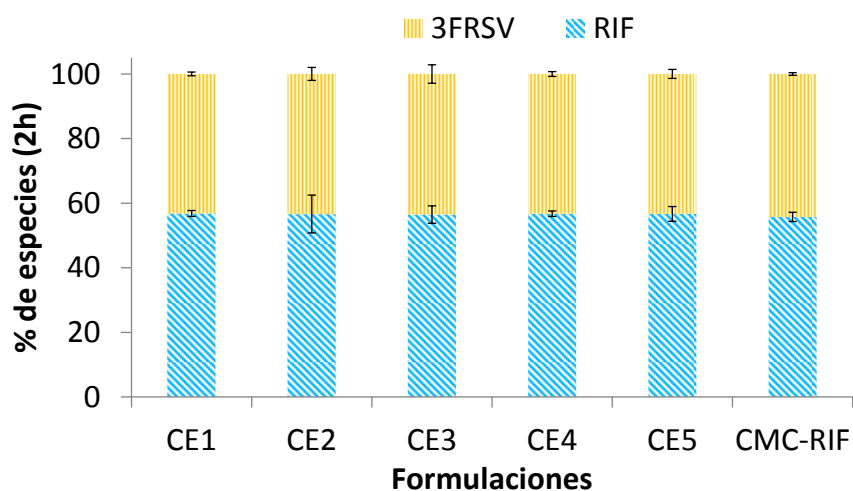


Figura 6.12. Concentración porcentual de RIF y 3FRSV en solución reguladora de pH 1,20 al cabo de 2 h de ensayo, determinada por HPLC. El 100% de la masa se considera como la suma de los moles remanentes de RIF más los moles formados de 3FRSV.

6.4.6. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA CAPA EXTERNA Y LA COBERTURA DE ALCOHOL POLIVINÍLICO EN LA FRIABILIDAD DE LOS COMPRIMIDOS CON CUBIERTA COMPACTADA

En los comprimidos con cubierta compactada, la laminación y la elevada friabilidad son un problema común porque la cohesión entre las dos mitades de la capa externa ocurre en un área reducida y a su vez, es frecuente la baja adhesión de los materiales de la capa externa y del núcleo. En

consecuencia, la formulación seleccionada debe tener una composición tal que asegure una adecuada friabilidad.

Tal como se observa en la **Figura 6.13**, la friabilidad de los comprimidos con cubierta compactada estuvo directamente relacionada con la presencia o ausencia de la cobertura adhesiva de alcohol polivinílico y no tuvo relación con los excipientes seleccionados para la capa externa. Por lo tanto, para asegurar la baja friabilidad, la cobertura de alcohol polivinílico es indispensable.

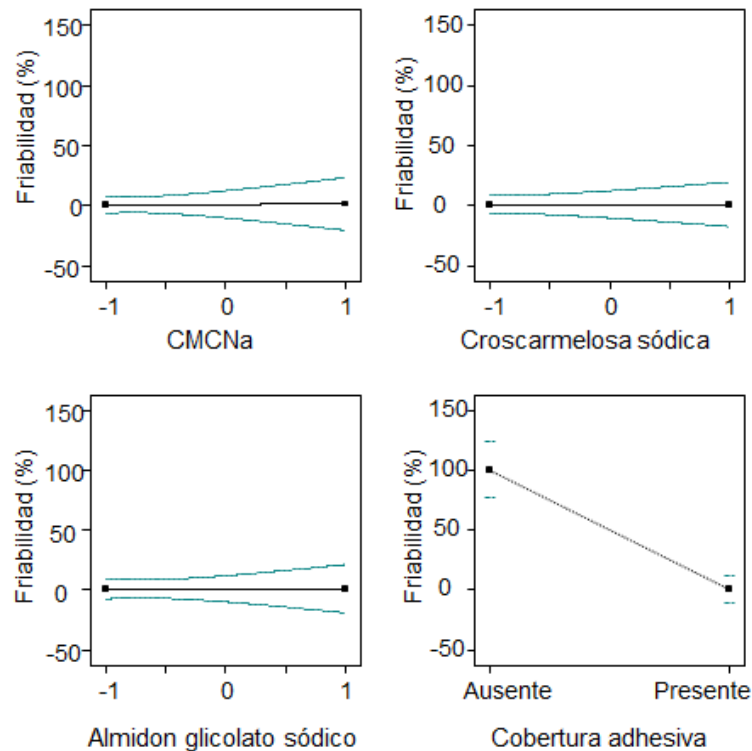


Figura 6.13. Gráfico de un factor para evaluar el efecto de la composición de la capa externa y la cobertura adhesiva en la friabilidad, obtenido con el software DesignExpert® 10. La línea celeste representa el intervalo de confianza $\geq 95\%$.

6.4.7. EFECTO DE LA FUERZA DE COMPRESIÓN FINAL Y LA COMPOSICIÓN DEL NÚCLEO EN SU DESEMPEÑO BIOFARMACÉUTICO

Luego de la segunda compactación, los núcleos no mostraron evidencia de ruptura de la cobertura entérica ya que se mantuvieron intactos por 2 h en medio ácido y se disolvieron apropiadamente en medio intestinal simulado.

A partir del gráfico de superposición de factores (**Figura 6.14**) puede observarse que la velocidad de disolución de ISO no estuvo influenciada significativamente por la composición del núcleo. Por otro lado, la dureza del núcleo, medida indirecta de la fuerza de compresión generada, estuvo directamente relacionada a la velocidad de disolución de ISO ($R^2=0,986$).

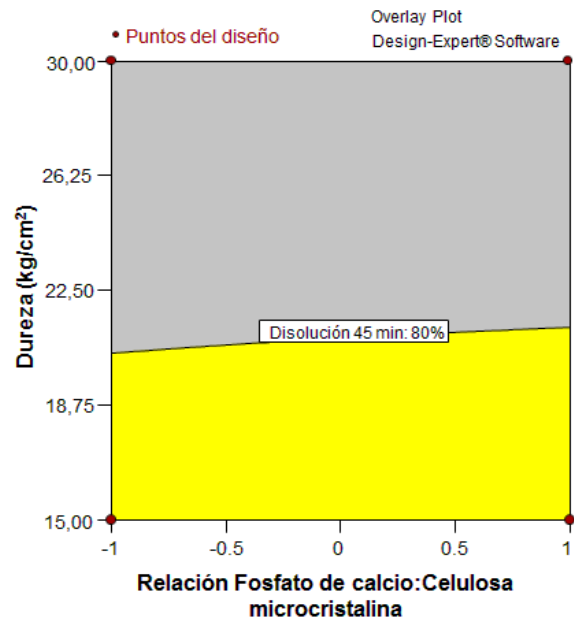


Figura 6.14. Gráfico de superposición de factores para evaluar el efecto de la relación de fosfato de calcio dihidrato:celulosa microcristalina y la dureza de los núcleos luego de la segunda compresión, en la velocidad de disolución de ISO. La región amarilla indica las condiciones en las cuales la formulación cumple con el criterio de disolución ($Q_{45 \text{ min}} > 80\%$).

Las variables dureza y relación de fosfato de calcio dihidrato:celulosa microcristalina ajustaron a un modelo factorial, con la siguiente ecuación:

$$\% ISO_{45} = 117 + 7 \times [\text{Relación FCD: CM}] - 1,77 \times [D] - 0,3[\text{Relación FCD: CM} \times D]$$

Donde $\% ISO_{45}$ es el porcentaje de ISO disuelto a los 45 minutos de ensayo, en solución reguladora de pH 6,80; $[\text{Relación FCD:CM}]$ es la relación porcentual de fosfato de calcio dihidrato y celulosa microcristalina en el núcleo y $[D]$ es la dureza del núcleo, luego de la compresión de la capa externa.

Para lograr comprimidos de velocidad de disolución aceptable, es necesario que la dureza alcanzada sea menor a 20 kg/cm^2 , en cualquier rango de composición estudiado.

Esta correlación también es observada por Lin *et al* (2001), que afirmó que la velocidad de liberación del núcleo está regida por la fuerza de compactación aplicada a la capa externa (28). En vista de que el adecuado desempeño biofarmacéutico del núcleo es fundamental para la eficacia del tratamiento, es que se confirma que la fuerza de compresión es un parámetro crítico de control prioritario, que debe ser controlado en el escalado de la formulación.

Luego de evaluar los parámetros críticos del proceso y la composición, se definió el siguiente diagrama de flujo (**Figura 6.15**), que contempla los controles de proceso necesarios para asegurar la calidad del producto en cada etapa.

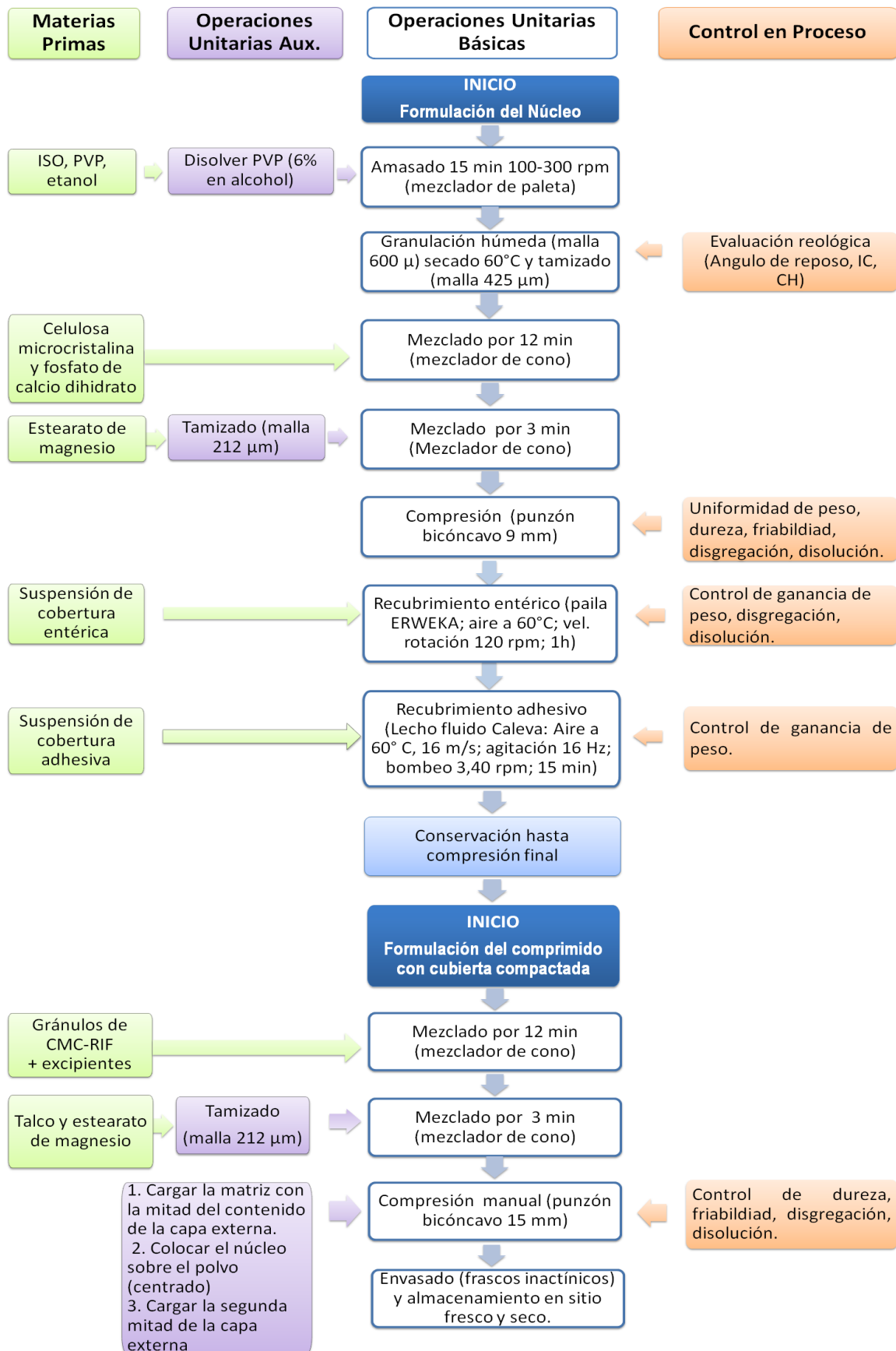


Figura 6.15. Diagrama de flujo de procesos en la elaboración del comprimido con cubierta compactada de RIF e ISO.

6.5. DISCUSIÓN

La evaluación de las variables críticas de proceso permitió adquirir un conocimiento profundo acerca del producto y su proceso de manufactura.

El sistema multiunitario desarrollado presentó un peso final de 870 mg aproximadamente y sus dimensiones fueron aceptables. La capa externa compuesta por celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica o almidón glicolato sódico, presentó muy rápida velocidad de disolución. Por ello, se espera que la biodisponibilidad oral de RIF en este sistema sea similar a la de las matrices de CMC-RIF. Adicionalmente, se logró obtener núcleos de liberación inmediata a pH intestinal, por lo que se estima que la biodisponibilidad de ISO debería estar mejorada respecto a las matrices de AA-ISO-Na.

En los comprimidos con cubierta compactada la estabilidad de RIF está maximizada, ya que ISO no se libera en medio ácido. Esto fue también observado por Gohel et al (2007) (29), quien desarrolló una formulación en CDF conteniendo comprimidos gastroretentivos de RIF (de liberación sostenida en estómago) y una cápsula recubierta entéricamente de ISO. A diferencia de éste desarrollo, la muy rápida velocidad de disolución de RIF en CMC-RIF aseguraría alta disponibilidad de RIF en el sitio de absorción. En consecuencia de la alta absorción de RIF, se produce la saturación de los canales de eflujo de la Glicoproteína-P, lo que conllevaría a una mayor biodisponibilidad oral respecto de un comprimido de liberación sostenida.

El escalado y comercialización de comprimidos con cubierta compactada es ampliamente factible. De hecho, la industria local Vent3® tiene esta tecnología en el mercado, con un comprimido de Aspirina+Vitamina C. A nivel internacional, la formulación en CDF de RIF+ISO+Etambutol+pirazinamida Xeed® y numerosos desarrollos farmacéuticos tales como comprimidos de liberación colónica conteniendo flurbiprofeno (30), ketorolaco (31), y comprimidos gastroretentivos de ofloxacino (32), entre otros, son formulaciones optimizadas que cuentan con la tecnología de los comprimidos con cubierta compactada.

Si se tiene en cuenta la gran demanda de medicamentos antituberculosos a nivel mundial, y que el desarrollo de una formulación de liberación segregada de RIF e ISO tiene alto impacto en el tratamiento de la tuberculosis, y en consecuencia, tiene gran influencia en la morbi-mortalidad de los pacientes, la adquisición de una comprimidora rotatoria adaptada para este tipo de formulación es una inversión interesante para la industria.

Finalmente, es importante destacar que el desarrollo de la capa externa de RIF no solo es útil para el desarrollo de comprimidos de cubierta compactada, sino también para formulaciones optimizadas de RIF, de muy rápida velocidad de disolución.

6.6. CONCLUSIONES

Se obtuvieron comprimidos con cubierta compactada de RIF e ISO de liberación secuencial y sitio-específica y estabilidad incrementada a partir de la tecnología disponible. Se identificaron los parámetros críticos del proceso y, mediante el análisis estadístico retrospectivo, se han realizado correlaciones entre las variables del proceso o producto y los atributos críticos, estableciéndose condiciones de ensayo, sin necesidad de llevar a cabo un diseño experimental completo, el cual está asociado a una batería de ensayos.

El proceso de recubrimiento entérico y la fuerza de compresión final fueron identificados como los principales parámetros críticos para cumplir con los objetivos establecidos en el perfil de calidad del producto objetivo. Los comprimidos con cubierta compactada se pueden preparar con núcleos de ISO utilizando fosfato de calcio dihidrato y celulosa microcristalina en diferentes proporciones y recubierto entéricamente hasta una ganancia de peso del 7,1 al 9,5%, seguida por una indispensable cobertura adhesiva con alcohol polivinílico (ganancia de peso del 3-5%). Adicionalmente, la capa externa debería estar compuesta por celulosa microcristalina, croscarmelosa sódica o almidón glicolato sódico, y debería ser compactada a una fuerza tal que la dureza del núcleo sea menor a 20kg/cm^2 para obtener una adecuada velocidad de disolución de ISO. La definición de este espacio es fundamental para el escalado con maquinaria específica.

Adicionalmente, este estudio estableció una sistemática de investigación apta para la mejora de procesos de desarrollo de medicamentos. Este tipo de estudio se convierte en una herramienta para optimizar la robustez de los procesos existentes y da cumplimiento a las normativas ICH Q8, Q9 y Q10.

6.7. REFERENCIAS

1. Luciani-Giacobbe LC, Ramírez-Rigo M V., Garro-Linck Y, Monti GA, Manzo RH, Olivera ME. Very fast dissolving acid carboxymethylcellulose-rifampicin matrix: Development and solid-state characterization. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;96:398–410. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.013>
2. Olivera ME, Luciani Giacobbe LC, Ramirez Rigo MV, Romañuk CB. Desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada y administración oral para el tratamiento de la tuberculosis. *Rev Argentina Salud Pública*. 2011;2(9):11–7.
3. Genaro A, editor. Remington Farmacia. 20th ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2003. 1408 p.
4. Lin S-Y, Kawashima Y. Current status and approaches to developing press-coated chronodelivery drug systems. *J Control Release* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;157(3):331–53. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365911008509>
5. Bandgar AA, Joshi DG, Kurade DS. Pulsatile Drug Delivery with Press Coated Techniques. *Int J Pharma Res Rev*. 2015;4(11):55–75.
6. Becker C, Dressman JB, Amidon GL, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Isoniazid. *J Pharm Sci*. 2007;96(3):522–31.
7. Brewer GA. Isoniazid. *Anal Profiles Drug Subst*. 1977;6:183–255.
8. Raymond C R, Paul J S MEQ. Handbook Pharmaceutical Excipients, Sixth Edition. 2009;
9. FMC BioPolymer. Avicel PH binders [Internet]. FMC company brochure. 2005. p. 21. Available from: <http://www.fmcbiopolymer.com/LinkClick.aspx?fileticket=oRRHqGAmGbE=&tabid=2920&mid=6067>
10. Lieberman H, Lachman L, Schwartz JB. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. 2nd ed. Taylor & Francis, editor. 1989. 616 p.
11. Felton LA, McGinity JW. Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms, Third Edition [Internet]. CRC Press; 2008. 512 p. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences). Available from: <https://books.google.com.ar/books?id=39n5iz5YwVEC>
12. DeMerlis CC, Schoneker DR. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem Toxicol*. 2003;41(3):319–26.
13. Jordan MP, Taylor J. Film coatings and film coating compositions based on polyvinyl alcohol [Internet]. Google Patents; 2002. Available from: <https://www.google.com/patents/US6448323>
14. ICH Expert Working Group. Q8(R2) Pharmaceutical Development. 2009;8:1–29.
15. ICH Expert Working Group. Q9 Quality Risk Management. 2005;1–23.
16. ICH Expert Working Group. Q10 Pharmaceutical Quality System. 2008;1–21.
17. WEINBERG S. COST-CONTAINED REGULATORY COMPLIANCE For the Pharmaceutical, Biologics, and Medical Device Industries. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2011.
18. Staples MA. The Concept of Quality-by-Design. In: Huynh-Ba K, editor. Pharmaceutical Stability Testing to Support Global Markets [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2010. p. 101–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-0889-6_14
19. Rocha H, Cuadro J, Mora C. Aplicación de la calidad basada en el diseño (QbD) en la

- reformulación de tabletas masticables. *Rev Colomb Ciencias Químico Farm.* 2013;42(2):190–214.
20. Reedy T, Reedy C. Principles of Experimental Design for Art Conservation Research [Internet]. GCI Scientific Program Report. 1992. 1-123 p. Available from: papers2://publication/uuid/59302BD4-0BDE-4FB4-906C-7820EBB3E9EA%5Cpapers3://publication/uuid/59302BD4-0BDE-4FB4-906C-7820EBB3E9EA
 21. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia, The National Formulary [USP 39 NF 34]. Rockville (MD): United States Pharmacopeial Convention; 2016.
 22. Ministerio de Salud, Secretaría de Políticas Regulación e Institutos, Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica, Instituto Nacional de Medicamentos. Farmacopea Argentina [Internet]. 7th ed. Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, editor. Farmacopea Argentina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires; 2003. Available from: http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/fna_pdfs.asp
 23. ANMAT, Ministerio de Salud. Disposición 6766/16: SOLICITUDES DE BIOEXENCIONES DE INGREDIENTES FARMACEUTICOS ACTIVOS. Argentina; 2016 p. 1–63.
 24. CDER, FDA. Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system [Internet]. 2015. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Guidance+for+Industry+Waiver+of+In+Vivo+Bioavailability+and+bioequivalence+studies#0>
 25. Joiner Associates Inc. Pareto Charts: Plain & Simple [Internet]. Reynard S, editor. Joiner Associates; 1995. (Learning and Application Guide). Available from: <https://books.google.com.ar/books?id=Mubz8xTERqEC>
 26. Centro de Evaluación e Investigación de Drogas. Guía para la Industria: Pruebas de disolución de formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata. [Internet]. 1997 [cited 2017 Feb 7]. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm200707.htm>
 27. R MC, Jayakar B, Palanisamy P. Formulation and Evaluation of Isoniazid and Ethambutol Hydrochloride Combination Tablets. *Int Res J Pharm.* 2012;3(2):90–7.
 28. Lin K-H, Lin S-Y, Li M-J. Compression forces and amount of outer coating layer affecting the time-controlled disintegration of the compression-coated tablets prepared by direct compression with micronized ethylcellulose. *J Pharm Sci* [Internet]. 2001;90(12):2005–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.1151>
 29. Gohel MC, Sarvaiya KG. A novel dosage form of rifampicin and isoniazid with improved functionality. *AAPS PharmSciTech.* 2007;44(1):22–7.
 30. Vemula SK, Bontha VK. Colon targeted guar gum compression coated tablets of flurbiprofen: Formulation, development, and pharmacokinetics. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
 31. Vemula SK. Formulation and pharmacokinetics of colon-specific double-compression coated mini-tablets: Chronopharmaceutical delivery of ketorolac tromethamine. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;491(1–2):35–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.007>
 32. Qi X, Chen H, Rui Y, Yang F, Ma N, Wu Z. Floating tablets for controlled release of ofloxacin via compression coating of hydroxypropyl cellulose combined with effervescent agent. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;489(1–2):210–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.007>

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES GENERALES Y PROYECCIONES

7.1. CONCLUSIONES GENERALES

El trabajo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral representa una valiosa contribución al conocimiento científico actual sobre la farmacoterapia de la tuberculosis.

El tratamiento disponible en la actualidad es complejo y prolongado (1,2) y, aunque puede ser efectivo, tiene asociados múltiples problemas que ponen en riesgo su efectividad. Entre ellos, es ampliamente conocida la baja y variable biodisponibilidad de rifampicina (RIF), relacionada, principalmente, a deficiencias en la humectabilidad y la velocidad de disolución del sólido, debido a su solubilidad dependiente del pH, su hidrofobicidad y las diferentes propiedades de los polimorfos de RIF existentes. La influencia de algunos excipientes en el desempeño de la forma farmacéutica, la variabilidad interindividual en la absorción y en el metabolismo de RIF, también están asociadas con problemas de su biodisponibilidad (3,4). Adicionalmente, su degradación a pH gástrico, acelerada por la presencia de isoniazida (ISO) en la formulación, tiene un impacto negativo en la biodisponibilidad de RIF (4).

La optimización de la farmacoterapia actual de la tuberculosis motivó el desarrollo de esta Tesis Doctoral, mediante el diseño y desarrollo de nuevos materiales y sistemas farmacoterapéuticos de administración oral de RIF e ISO en CDF, donde la estabilidad y la biodisponibilidad de RIF están incrementadas.

En este contexto, se obtuvieron materiales innovadores de RIF e ISO, mediante el co-procesamiento con polielectrolitos de carga opuesta. Específicamente, RIF se asoció con la forma ácida de carboximetilcelulosa (CMC) e ISO se asoció a ácido alginico (AA). Se ensayaron diferentes combinaciones de variables de diseño a fin de seleccionar los materiales más convenientes.

CMC-RIF fue obtenido mediante impregnación, utilizando etanol como medio de interacción. Se presenta como una dispersión sólida cristalina altamente hidrofílica, en la que RIF cristaliza como un zwitterión en la superficie de CMC. Por otra parte, la combinación de variables de diseño permitió obtener AA-ISO₇₅-Na₂₅, el cual es un complejo iónico amorfo obtenido mediante la dispersión del polielectrolito en una solución hidroalcohólica de ISO y con la incorporación de un contraión inorgánico. La exhaustiva caracterización de CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅ puso de manifiesto que son nuevas entidades químicas, que pueden ser preparadas utilizando componentes y metodologías simples, reproducibles y escalables.

CMC-RIF presenta elevada hidrofiliidad y, luego de su compactación como matrices, permite la liberación de RIF en medio ácido con muy rápida velocidad. Esta propiedad lo hace atractivo para optimizar la liberación en formas farmacéuticas sólidas, ya sea solo o en combinación con otros fármacos antituberculosos (8). Las matrices de AA-ISO₇₅-Na₂₅ liberan mínimas cantidades de ISO en un medio simulando el contenido gástrico, en tanto que, en condiciones simulando el medio intestinal, la liberación de ISO se completa en el transcurso de 2 horas (9). Estas características resultan interesantes para formular formas farmacéuticas sólidas de liberación secuencial y sitio-específica de RIF e ISO en CDF sin la necesidad de recurrir al recubrimiento entérico de ISO.

Las matrices de CMC-RIF y AA-ISO₇₅-Na₂₅ combinadas, imitando el desempeño de un comprimido multiunitario, fueron comparadas con la formulación comercial de referencia. La evaluación de la estabilidad mostró una significativa reducción de la degradación de RIF en medio ácido, por la minimización de la liberación concomitante de ISO. En forma complementaria, la administración oral en perros de ambas matrices asociadas mostró un incremento significativo de la biodisponibilidad de RIF, respecto de la formulación comercial de referencia. Este aspecto es de gran importancia considerando los numerosos reportes de bioinequivalencia y de fallas de calidad informados para CDF conteniendo RIF e ISO, tanto a nivel nacional como internacional, y permitiría reducir el riesgo de desarrollo de resistencia vinculado a niveles plasmáticos sub-terapéuticos de RIF (5–7).

Como contrapartida, la biodisponibilidad de ISO desde las matrices de AA-ISO₇₅-Na₂₅ fue menor a la esperada, probablemente debido a que su liberación no fue suficientemente rápida en el modelo animal seleccionado.

Considerando el desempeño superador de CMC-RIF y el inconveniente observado con AA-ISO_{75-Na₂₅} se decidió avanzar en el diseño de una formulación multiunitaria utilizando CMC-RIF e ISO sin acomplejar.

El diseño seleccionado fue el de comprimidos con cubierta compactada, que consistió en una capa externa conteniendo CMC-RIF y un núcleo formado por un comprimido de ISO con cubierta entérica. En este desarrollo, se utilizó como herramienta el concepto de Calidad desde el Diseño (10–12), cuya aplicación genera un vasto conocimiento del producto y de las variables que modifican sus parámetros de calidad. Esta metodología permitió identificar los parámetros críticos del proceso y establecer aquellas condiciones requeridas para obtener un producto de calidad aceptable. Los comprimidos así obtenidos mostraron propiedades de liberación secuencial y sitio-específica de RIF e ISO y un desempeño claramente superador respecto de las formulaciones de referencia.

Es interesante destacar que la propuesta de formulación de esta Tesis puede ser preparada utilizando componentes y metodologías accesibles a los sistemas de salud de las comunidades con recursos limitados. Esta característica resulta relevante ya que la tuberculosis afecta especialmente a los países más vulnerables desde el punto de vista socio-económico. El valor agregado de aplicar Calidad desde el Diseño se amortiza o bien por una reducción en el costo de producción o por la simplificación de procesos.

A su vez, tanto los materiales de partida como los procesos de elaboración son comúnmente utilizados en la industria farmacéutica, lo que sumado a la información que surge de aplicar Calidad desde el diseño, hace a este desarrollo potencialmente transferible al sector productivo y accesible para las economías de los países con mayor prevalencia de tuberculosis.

Finalmente, a lo largo de este trabajo se validaron tres métodos de HPLC, que demostraron ser sencillos, selectivos, precisos, exactos, ajustándose a lo establecido por los estándares internacionales (13). El método analítico resulta útil para evaluar la estabilidad en medio ácido de cualquier formulación de RIF, ya sea sola o combinada con ISO. Los otros dos métodos bioanalíticos son una valiosa herramienta para la determinación de los niveles plasmáticos de RIF o ISO luego de la administración de cualquier formulación, oral o inyectable, en diferentes modelos animales, o incluso en humanos.

7.2. PROYECCIONES

Este trabajo de Tesis abre nuevas perspectivas de investigación, no sólo direccionadas a la aplicación de los sistemas en situaciones terapéuticas específicas, sino también en relación a evaluar y documentar potenciales propiedades de los polielectrolitos, aún no descriptas. En este sentido, resulta interesante profundizar el estudio de los sistemas desarrollados. Por ejemplo, estudios de bioadhesión de las matrices AA-ISO₇₅-Na₂₅, permitirían establecer si dicha propiedad tiene incidencia en los eventos preabsortivos de ISO.

Además, sería interesante realizar el escalado a partir de los materiales obtenidos, hacia una formulación optimizada de RIF e ISO de administración oral, con estándares de calidad desde el diseño. Esta formulación debería cumplir con los requisitos farmacopeicos y su elaboración debe ser factible mediante una tecnología convencional de la industria farmacéutica, tal que sea potencialmente transferible al sector de producción pública de medicamentos. En este contexto, resulta importante la realización de un estudio de estabilidad acelerada y un estudio farmacocinético plasmático en voluntarios sanos o en un modelo animal con características anatómicas y fisiológicas más cercanas a las del humano. Se espera que los resultados que se obtengan contribuyan al desarrollo de formulaciones más seguras y confiables para el tratamiento farmacológico de la tuberculosis.

Las proyecciones presentadas forman parte de mi proyecto posdoctoral aprobado por CONICET para el período 2017-2019.

7.3. REFERENCIAS

1. World Health Organization. WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. Geneva, Switzerland; 2016.
2. Beltrame S, Latorraca M, Moral M. Enfermedades infecciosas. Tuberculosis. GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD. 2nd ed. Buenos Aires, Argentina: Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación; 2014.
3. Becker C, Dressman JB, Junginger HE, Kopp S, Midha KK, Shah VP, et al. Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Rifampicin. *J Pharm Sci*. 2009;98(7):2252–67.
4. Singh S, Bhutani H, Mariappan TT. Quality Problems of Anti-Tuberculosis Fixed-Dose Combinations (Fdcs): a Way Forward. *Indian J Tuberc*. 2006;53:201–5.
5. Ellard G a, Fourie PB. Rifampicin bioavailability: a review of its pharmacology and the chemotherapeutic necessity for ensuring optimal absorption. *Int J Tuberc Lung Dis* [Internet]. 1999;3(11 Suppl 3):S301-8-21. Available from: <http://pubget.com/paper/10593709/rifampicin-bioavailability-a-review-of-its-pharmacology-and-the-chemotherapeutic-necessity-for-ensuring-optimal-absorption%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593709>
6. Jindani A, Aber VR, Edwards EA, Mitchison DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1980;121(6):939–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6774638>
7. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Lowrie D, Cole S, Colston MJ, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993;341(8846):647–50.
8. Luciani-Giacobbe LC, Ramírez-Rigo M V., Garro-Linck Y, Monti GA, Manzo RH, Olivera ME. Very fast dissolving acid carboxymethylcellulose-rifampicin matrix: Development and solid-state characterization. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;96:398–410. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2016.10.013>
9. Olivera ME, Luciani Giacobbe LC, Ramirez Rigo MV, Romañuk CB. Desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada y administración oral para el tratamiento de la tuberculosis. *Rev Argentina Salud Pública*. 2011;2(9):11–7.
10. ICH Expert Working Group. Q8(R2) Pharmaceutical Development. 2009;8:1–29.
11. ICH Expert Working Group. Q9 Quality Risk Management. 2005;1–23.
12. ICH Expert Working Group. Q10 Pharmaceutical Quality System. 2008;1–21.
13. FDA. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [Internet]. 2001. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>

ANEXO 1

Esquemas farmacoterapéuticos de la tuberculosis, según la categoría asignada para la enfermedad. Nótese que el tratamiento es complejo, consta de la utilización de hasta cinco fármacos, por un período que oscila entre 6 a 20 meses, según la gravedad del caso (1).

Tabla. Tratamiento farmacoterapéutico de la tuberculosis, según la categoría asignada (1).

Categoría I Caso nuevo	<ul style="list-style-type: none"> • Fase inicial (2 meses): RIF+ISO+PIR+ETA o Estreptomina
	<p>Al finalizar esta fase solicitar baciloscopia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • si es negativa pasar a fase de continuación. • si es positiva, realizar cultivo y sensibilidad antibiótica y continuar esta fase un mes más; luego pasar a fase de continuación. Con el resultado del cultivo y sensibilidad antibiótica se decide cómo seguir el tratamiento. <ul style="list-style-type: none"> • Fase de Continuación: • 4 meses: RIF+ISO (administración diaria o trisemanal sólo si es supervisado) <p>En caso de tuberculosis meníngea, osteoarticular o diseminada (miliar):</p> <ul style="list-style-type: none"> • 7 meses: RIF+ISO (administración diaria)
Categoría II Casos con tratamiento previo	<ul style="list-style-type: none"> • Fase Inicial (3 meses): • Primeros 2 meses: RIF+ISO+PIR+ETA+Estreptomina • Tercer mes: RIF+ISO+PIR+ETA <p>Al finalizar esta fase solicitar baciloscopia:</p> <ul style="list-style-type: none"> • si es negativa pasar a fase de continuación • si es positiva, realizar cultivo y sensibilidad antibiótica y continuar un mes más con cuatro medicamentos y luego pasar a fase de continuación. Con el resultado del cultivo y sensibilidad antibiótica se decide cómo seguir el tratamiento. <ul style="list-style-type: none"> • Fase de Continuación (5 meses): RIF+ISO+ETA (administración diaria o trisemanal solo si es supervisado).
Categoría III Caso nuevo	<ul style="list-style-type: none"> • Fase inicial (2 meses): RIF+ISO+PIR • Fase de Continuación (4 meses): RIF+ISO (administración diaria o trisemanal sólo si es supervisado)
Categoría IV	<p>El tratamiento de estos casos es complejo y depende de una serie de consideraciones, tales como el tipo de resistencia y sensibilidad bacteriana, si hubo o no tratamiento previo con fármacos de segunda línea, edad, entre otros. Este tratamiento es establecido por especialistas y requiere estricta supervisión.</p> <p>Teniendo en cuenta estas consideraciones, el tratamiento puede ser corto (9-12 meses) o largo, alcanzando los 20 meses. La duración puede ser modificada según la respuesta del paciente a la terapia.</p>

Respecto al régimen terapéutico, en pacientes con TB-RR o TB-MDR, se recomienda el uso de al menos cinco fármacos eficaces contra la tuberculosis durante la fase intensiva, incluyendo la PIR y cuatro medicamentos de segunda línea, uno seleccionado del Grupo A y otro del Grupo B y al menos dos del grupo C. Si el número mínimo de medicamentos eficaces contra la tuberculosis no puede ser compuesto como se ha indicado anteriormente, se puede añadir un agente del Grupo D2 y otros agentes del Grupo D3 para llevar el total a cinco. Adicionalmente, se recomienda reforzar el régimen con dosis altas de ISO o ETA.

1. Beltrame S, Latorraca M, Moral M. Enfermedades infecciosas. Tuberculosis. GUIA PARA EL EQUIPO DE SALUD. 2nd ed. Buenos Aires, Argentina: Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación; 2014.

ANEXO 2

Tabla. Asignaciones del espectro de RMN de ^{13}C de RIF

Número de átomos de carbono	RIF $\delta_{13\text{C}}$ (ppm)	Número de átomos de carbono	RIF $\delta_{13\text{C}}$ (ppm)
1	139,3	23	77,8
2	119,6	24	38,6
3	110,7	25	75,9
4	147,4	26	41,2
5	105,2	27	76,4
6	175,4	28	119,7
7	105,9	29	143,9
8	168,6	30	21,0
9	112,4	31	20,7
10	117,8	32	12,9
11	196,0	33	10,5
12	109,6	34	9,5
13	21,9	35	171,2
14	7,5	36	17,6
15	169,5	37	57,3
16	130,5	38	133,4
17	133,4	39	57,3
18	124,3	40	57,3
19	141,9	41	57,3
20	39,4	42	57,3
21	70,7	43	46,3
22	34,3		

ANEXO 3

Tabla. Asignaciones del espectro de RMN de ^{15}N para RIF y CMC-RIF

Número del átomo de Nitrógeno	RIF $\delta_{^{15}\text{N}}$ (ppm)	CMC-RIF $\delta_{^{15}\text{N}}$ (ppm)
15	-243,4	-261,7
38	-42,7	-23,4
39	-256,1	-----
43	-348,6	-337,9

ANEXO 4

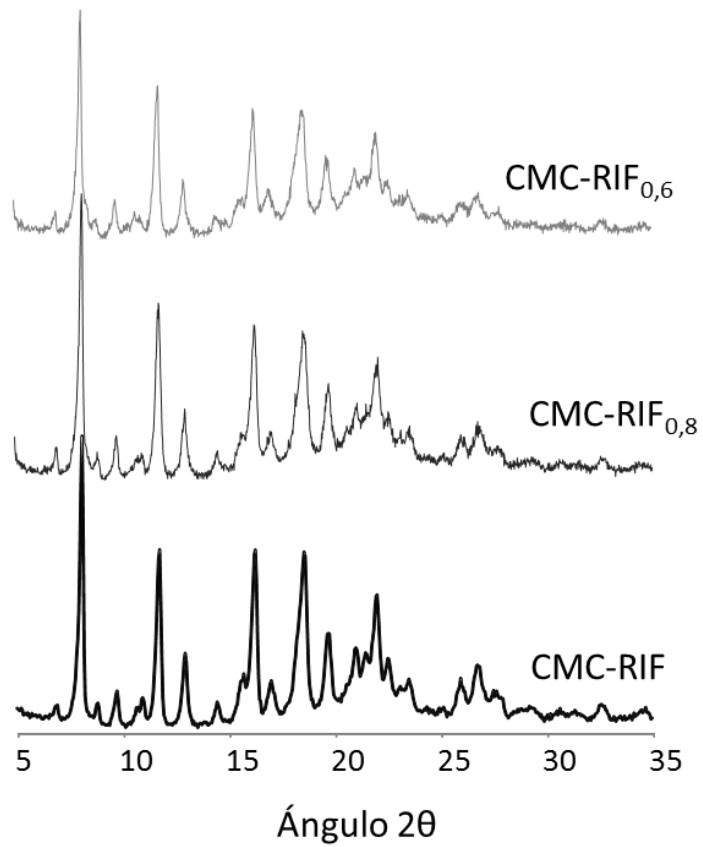


Figura. Patrones de difracción de rayos X de CMC-RIF_{0,6}, CMC-RIF_{0,8} y CMC-RIF.

PUBLICACIONES GENERADAS A PARTIR DE ESTA TESIS

A continuación se detallan las publicaciones generadas a partir de esta tesis en revistas especializadas, en avances de presentaciones a congresos (*proceedings*) y en reuniones científicas.

1. REVISTAS CIENTÍFICAS CON REFERATO

- **Very fast dissolving acid carboxymethylcellulose-rifampicin matrix: development and solid-state characterization.** 2017. Laura C. Luciani-Giacobbe, María V. Ramírez-Rigo, Yamila Garro-Linck, Gustavo A. Monti, Ruben H. Manzo, María E. Olivera. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 96; 398-410. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.10.013.
- **Desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada y administración oral para el tratamiento de la tuberculosis.** 2011. Olivera ME, Luciani Giacobbe LC, Ramírez Rigo MV, Romañuk CB. *Revista Argentina de Salud Pública RASP* 2 (9), 11-17. ISSN 18528724.

2. AVANCES DE PRESENTACIONES A CONGRESOS (*PROCEEDINGS*)

- **2016.** Luciani Giacobbe LC, Alarcón-Ramírez LP, Paredes A, Allemandi DA, Manzo RH, Olivera ME. **"Innovative pharmaceutical formulation for the treatment of tuberculosis. Quality by design in the development of press-coated tablets"** 4ta Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas – RICIFA 2016. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)* ISSN (Online): 0975-8232. Disponible en: <http://ijpsr.com/conference-proceeding/>
- **2012.** Luciani-Giacobbe LC, Ramírez-Rigo MV, Manzo RH, Olivera ME. **"Drug-polyelectrolyte matrixes as a strategy to increase gastric stability of rifampicin in fixed dose combination with isoniazid"** 2º Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas – RICIFA 2012. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) PharmSciTech. DOI: 10.1208/s12249-014-0082-2.
- **2010.** Luciani-Giacobbe LC, Ramírez-Rigo MV, Catani YA, Romañuk CB, Manzo RH, Olivera ME. **"Swellable anti-tubercular drug-polyelectrolite matrices: characterization and delivery properties"**. 1ª Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas – RICIFA 2010. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) PharmSciTech. DOI: 10.1208/s12249-011-9650-x

3. PRESENTACIONES A REUNIONES CIENTÍFICAS

3.1. NACIONALES

- **“Sistema de liberación segregada y sitio-específica para el tratamiento de la tuberculosis”**. Luciani Giacobbe LC, Ramirez Rigo MV, Manzo RH, Olivera ME. 3^{er} Simposio Argentino de Nanomedicina. 26 y 27 de septiembre de 2013. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. Formato: presentación oral.
- **“Diseño de liberación sitio-específico mejora la estabilidad de rifampicina (RIF) asociada con isoniácida (ISO)”** Luciani Giacobbe L, Ramirez Rigo M, Romañuk C, Manzo R, Olivera M. 43^a Reunión anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental. 2 al 4 de noviembre de 2011. San Miguel de Tucumán, Argentina. Formato: Póster.

3.2. INTERNACIONALES

- **Very fast dissolving rifampicin (RIF)-carboxymethylcellulose (CMC) crystalline solid dispersion: solid state characterization.** Luciani-Giacobbe LC, Garro-Linck Y, Monti GA, Manzo RH, Olivera ME. “76th FIP World Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2016.” 28 agosto-1 septiembre 2016. Buenos Aires, Argentina. Formato: póster.
- **“Evaluación de los niveles plasmáticos de rifampicina e isoniácida administrados en perros como matrices de liberación segregada y secuencial”**. Luciani-Giacobbe LC, Litterio N, Lorenzutti AM, Manzo RH, Olivera ME. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. 2015. Córdoba – Argentina. Formato: Póster.
- **“Desarrollo y validación de métodos de HPLC para la cuantificación de rifampicina e isoniazida en plasma humano”**. Luciani-Giacobbe LC, Guzman ML, Breda SA, Manzo RH, Olivera ME. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. 2015. Córdoba – Argentina. Formato: Póster.
- **“Desarrollo y validación de un método de HPLC para la cuantificación de ciprofloxacino en plasma y orina humano”**. Guzman, ML; Luciani-Giacobbe, LC; Sánchez, MF; Breda SA; Manzo, RH; Olivera ME. VI Congreso Iberoamericano de Ciencias Farmacéuticas. 2015. Córdoba – Argentina. Formato: Póster.
- **“Estabilidad relativa de rifampicina desde matrices polielectrolito-fármaco”** Olivera ME, Luciani-Giacobbe LC, Ramirez-Rigo MV, Manzo RH. IV Congreso Ibero-Americano de Ciencias Farmacéuticas. 21 al 23 de junio de 2011. Lisboa, Portugal. Formato: Poster.
- **“Obtención y estudio de materiales portadores de Rifampicina e Isoniazida para el diseño de un comprimido bicapa de liberación sitio-específica”**. Romañuk CB, Catani YA, Luciani-Giacobbe LC, Ramirez-Rigo MV, Manzo RH, Olivera ME. XIX Congreso Farmacéutico Argentino y XIII Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana. 29-31 de octubre de 2009. San Juan, Argentina. Formato: Póster.