

DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE RIFAMPICINA PARA SU APLICACIÓN EN EL TRATAMIENTO DE LA TUBERCULOSIS

Ignacio Calleja Avellanal, M^a Carmen Dios Viéitez, Noelia Ruz Expósito, M^a Jesús Renedo Omaechevarría, María J. Blanco Prieto

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Navarra. 31080. Pamplona. España.

Introducción

La rifampicina (RIF), es un derivado semisintético de la rifamicina B, producida por *Streptomyces mediterranei* (1) y que se utiliza en el tratamiento de la tuberculosis, lepra y otras enfermedades infecciosas (2). Actúa inhibiendo la síntesis del RNA bacteriano mediante la unión a la subunidad β de la RNA polimerasa dependiente de DNA, causando de este modo el bloqueo de la transcripción del RNA. Este antibiótico, junto con la isoniazida, pirazinamida, etambutol y estreptomina, es un fármaco de primera línea dentro de la terapéutica antituberculosa.

Relacionado con la administración de este fármaco se han descrito diversos efectos adversos, tales como pérdida de apetito, hepatotoxicidad, náuseas, ictericia, fiebre y alteraciones inmunológicas (3). Actualmente se están desarrollando nuevas formulaciones con el fin de aumentar la concentración en los órganos infectados, disminuir los efectos adversos, aumentar la estabilidad del fármaco y conseguir una liberación controlada del mismo (4).

En la bibliografía se encuentran descritas formulaciones de liposomas (5) y de micropartículas (6) de RIF, como formas efectivas utilizadas en el tratamiento antituberculoso. En base a la bibliografía existente, éste es el primer estudio en el que se utilizan nanopartículas como vectores de la RIF. El estudio conlleva la formulación, caracterización y evaluación *in vitro*, de nanopartículas biodegradables de RIF, utilizando polímeros del ácido láctico (PLA) y copolímeros

del ácido láctico y glicólico (PLGA). Los vectores fueron preparados por el método de evaporación del disolvente en emulsión simple (O/A).

Materiales y Métodos

La preparación de las nanopartículas de RIF se ha realizado por el método de evaporación del disolvente, tras la formación de una emulsión simple. Para ello, diferentes cantidades de rifampicina se disolvieron, mediante agitación en vortex, en una solución de acetato de etilo que contenía el polímero empleado en cada caso. La mezcla se añadió a una solución acuosa de polivinilalcohol (PVA), al 1%, y se homogeneizó con una sonda de ultrasonidos durante 1 minuto, permitiendo de este modo la formación de la emulsión (O/A). Posteriormente, la emulsión se añadió a una solución de PVA (0,2%) y se mantuvo en agitación durante tres horas para conseguir la evaporación del disolvente orgánico y la formación de las nanopartículas. Transcurrido este tiempo, las nanopartículas se recogieron mediante centrifugación y sucesivos lavados con agua destilada. Por último, éstas se liofilizaron y conservaron a 4°C.

En este trabajo se han preparado diferentes formulaciones de nanopartículas. La diferencia entre ellas radica en el polímero utilizado y en el pH de la fase externa (7 y 4,5).

La caracterización de las nanopartículas ha conllevado diversos estudios, que se describen a continuación. Dentro de los estudios físico-químicos, la caracterización morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de

barrido, y la carga superficial de las nanopartículas se determinó mediante la medida del potencial zeta. Este parámetro fue obtenido por espectroscopía de correlación fotónica, utilizando un Zetamaster. El tamaño de las partículas fue el último parámetro físico-químico estudiado, y para su análisis se utilizó tanto la espectroscopía de correlación fotónica como la microscopía electrónica de barrido.

Otros estudios han sido los de eficiencia de encapsulación. En ellos, la cuantificación de la rifampicina encapsulada en las diferentes formulaciones, se llevó a cabo utilizando como técnica analítica la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para lo cual las nanopartículas se disolvieron en cloroformo, permitiéndose de esta forma romper las mismas. Posteriormente, el polímero se precipitó mediante la adición de metanol y una vez centrifugadas las muestras una alícuota del sobrenadante se analizó mediante HPLC.

Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron dispersando 10 mg de nanopartículas, previamente liofilizadas, en 1,5 mL de PBS (pH 7,4) que contenía 0,02% de azida sódica, como agente bacteriostático. Las muestras se mantuvieron bajo agitación a 37°C y a diferentes tiempos la RIF liberada fue analizada mediante HPLC.

Resultados y Discusión

La caracterización morfológica (Figura 1) permitió comprobar cómo las nanopartículas de RIF eran esféricas y similares entre sí.

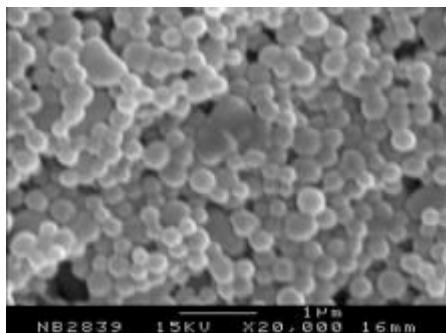


Figura 1. Fotografía de nanopartículas cargadas con RIF, realizada mediante microscopía electrónica de barrido.

Las propiedades físico-químicas de las nanopartículas se muestran en las siguientes figuras. De este modo el tamaño de todas las formulaciones fue similar con todos los polímeros empleados (Figura 2), y osciló entre 266 nm, en las formulaciones en las que se utilizó el polímero Resomer R 202H, y los 348 nm al emplear el Resomer RG 504.

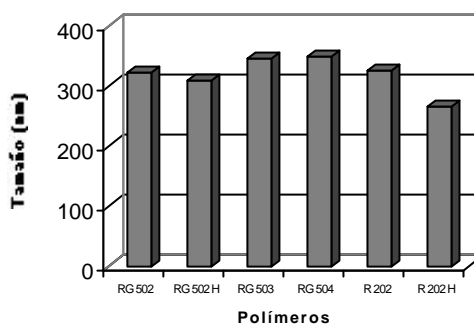


Figura 2. Tamaños medios de distintas formulaciones de rifampicina.

En la Figura 3 se muestra la eficiencia de encapsulación de las distintas formulaciones en función del polímero empleado y del pH de la fase externa (FE).

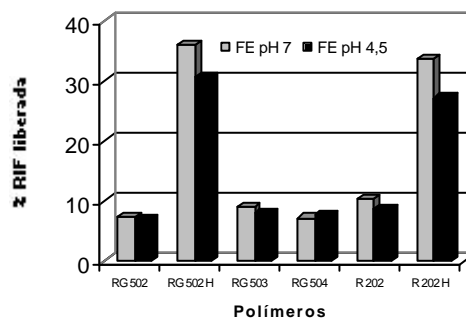


Figura 3. Eficiencia de encapsulación de distintas formulaciones de nanopartículas.

Se comprueba de este modo cómo el pH de la FE no afecta prácticamente al porcentaje de encapsulación, a pesar de que en principio cabría haber esperado una mayor eficiencia de encapsulación en las formulaciones con un pH de la FE de 4,5 (debido a la menor solubilidad del fármaco en ese medio). El mayor porcentaje de encapsulación se consigue mediante la utilización del polímero Resomer RG 502H y alcanza un valor de 35,9%.

En relación a la carga superficial de las nanopartículas, no se observó diferencia entre las formulaciones blancas y las formulaciones cargadas con RIF. Esto indica que la mayor parte del fármaco se encuentra localizado en el interior de las nanopartículas, y no adsorbido en la superficie. Además, todas las formulaciones realizadas con los diferentes polímeros, presentaron un valor de potencial zeta negativo y muy similar entre sí (Tabla 1).

Tabla 1. Influencia del polímero y el pH de la fase externa utilizados en la preparación de la partícula, en el potencial zeta de diferentes formulaciones.

Polímero	ζ potencial (mV) F.E. pH 7	ζ potencial(mV) F.E. pH 4,5
RG 502	- 18,41 \pm 0,87	- 6,13 \pm 2,10
RG 502 H	- 19,62 \pm 0,44	- 7,77 \pm 1,20
R 202	- 17,64 \pm 1,88	- 4,52 \pm 0,47
R 202 H	- 22,41 \pm 1,48	- 4,30 \pm 0,51
RG 504	- 22,66 \pm 0,52	- 8,49 \pm 0,67
RG 503	- 20,48 \pm 0,52	- 11,7 \pm 2,31

Los estudios de liberación *in vitro* de las nanopartículas cargadas con RIF, utilizando el polímero Resomer RG 502H, son mostrados en la Figura 4.

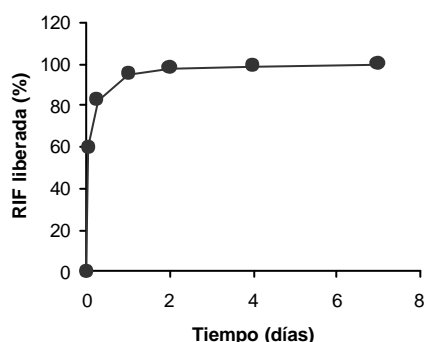


Figura 4. Cinéticas de liberación *in vitro* de nanopartículas cargadas con 10 mg de RIF, utilizando el polímero Resomer RG 502H. Cada punto ($n=3$) representa la media \pm D.E.

Se comprueba cómo el fármaco es liberado de forma bifásica, caracterizado por una liberación inicial rápida (efecto burst) y continuado por una fase de liberación más lenta. El 59% de la RIF es

liberado en una hora, mientras que la totalidad de fármaco es liberado al cabo de una semana. Además, se comprueba cómo la RIF liberada se mantiene intacta, ya que con el método cromatográfico empleado, no se detectaron productos de degradación en el medio.

Como conclusión, cabe destacar que la técnica de evaporación del disolvente es adecuada para la formulación de nanopartículas biodegradables de RIF, capaces de proteger al fármaco y evitar su degradación. Además, las nanopartículas formuladas se caracterizan por poseer un tamaño uniforme, permitir la encapsulación de cantidades elevadas de RIF y conseguir una cesión controlada del fármaco durante siete días.

Bibliografía

1. C. D. Stowe, R.F. Jacobs. Paediatr. Drugs, 1, 299, (1999).
2. R. Pähkla, J. Lambert, P. Ansko, P. Winstanley, P.D.O. Davies, R.A. Kiiwet, J. Of Clin. Pharm. And Thera., 24, 219, (1999).
3. W. Zhang, X. Jiang, J. Hu, C. Fu, J. Microencapsulation, 17, 785, (2000).
4. A. K. Dutt, W. W. Stead, J. Infect. Dis., 146, 698, (1982).
5. P. Deol, G. K. Khuller, K. Joshi, Antimicrob. Agents and Chemother., 41, 1211, (1997).
6. P. O'Hara, A. J. Hickey, Pharm. Research, 17, 955, (2000).

Agradecimientos

Ignacio Calleja agradece al Dpto. de Educación, Universidades e Investigación del Gobierno Vasco, la financiación de este trabajo a través de una beca para la formación de investigadores.

Autor de contacto:

María J. Blanco Prieto

mjblanco@unav.es

Institución Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. U. Navarra

Irunlarrea s.n, Pamplona

Telf.: 948425600 Ext 6519

Fax: 948425649