

Lescano, Gabriela M; Pettigrosso, Rosa S; Llabot, Juan M
Determinación de propiedades fisicoquímicas de Nistatina comercial empleando técnicas de caracterización de materiales

Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 45, núm. 2, abril-junio, 2014, pp. 31-36

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57932294004>



Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas,

ISSN (Versión impresa): 1870-0195

rmcf@afmac.org.mx

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

México

Trabajo científico

Determinación de propiedades fisicoquímicas de Nistatina comercial empleando técnicas de caracterización de materiales

Study of the physical-chemical properties of commercial Nystatin using solid state characterization techniques

Gabriela M Lescano,¹ Rosa S Pettigrosso,¹ Juan M Llabot²

¹Área Fisicoquímica, Dpto. de Química, Universidad Nacional del Sur, INQUISUR-CONICET, Bahía Blanca, Argentina

²Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA) CONICET y Depto. de Farmacia, Fac. de Cs. Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina

Resumen

La Nistatina es un antibiótico poliénico empleado en el tratamiento de infecciones fúngicas. Puede sufrir autooxidación y degradación térmica y presenta tres formas polimórficas denominadas Tipo A y Tipo B, que pueden interconvertirse, y Tipo C. Así, estudios previos referidos a la incorporación de Nistatina en films bioadhesivos revelaron la presencia del polimorfo Tipo C, mientras que los resultados presentados en este trabajo, obtenidos a partir de un lote diferente del fármaco, determinaron la presencia de los polimorfos A y B con una importante proporción de fase amorfa. Estas características del fármaco determinan falta de uniformidad entre diferentes lotes del mismo, por lo tanto es necesario efectuar su caracterización antes del empleo en el desarrollo de medicamentos. Para ello se emplearon diversas técnicas de caracterización de materiales.

Abstract

Nystatin is a polyene antibiotic applied on the treatment of topical fungal infections. It can undergo auto-oxidation and thermal degradation and has three known polymorphs called Type A and Type B, which may be interconvertible, and Type C.

Previous studies related to the incorporation of Nystatin in bioadhesive films have revealed the presence of polymorph Type C, whereas the results presented in this work, obtained using a different lot, evidenced the presence of only polymorphs A and B with a significant proportion of amorphous phase. To overcome the lack of uniformity between individual commercial Nystatin lots, an adequate physico-chemical characterization is necessary performing prior using it in preformulation works. Solid state characterization techniques were employed.

Palabras clave: nistatina, calorimetría, polimorfismo.**Key words:** nystatin, calorimetry, polymorphism.**Correspondencia:**

Dra. Rosa Susana Pettigrosso
Departamento de Química
Universidad Nacional del Sur
Av. Leandro N. Alem No.1253,
CP. 8000 Bahía Blanca, Argentina
Teléfono:+54 291 4595101, Ext. 3528
Fax: +54 291 4595160
e-mail: rspettig@uns.edu.ar

Fecha de recepción: 19 de noviembre de 2013

Fecha de recepción de modificaciones: 24 de junio de 2014

Fecha de aceptación: 27 de agosto de 2014

Introducción

La *Nistatina* (*Nis*) es un miembro importante de un grupo relativamente grande y variado de antibióticos antifúngicos altamente insaturados que se aísla de cultivos de *Streptomyces noursei*. Por su estructura química y para diferenciarla de otros antibióticos con propiedades antifúngicas, se la incluye dentro del grupo denominado *antibióticos antifúngicos de tipo poliélico*.^{1,2} Este fármaco presenta tres formas polimórficas, denominadas Tipo A, Tipo B y Tipo C. Los polimorfos tipo A y B son los más comunes y pueden interconvertirse por efecto de condiciones ambientales.³ Su fórmula química se representa en la Figura 1.

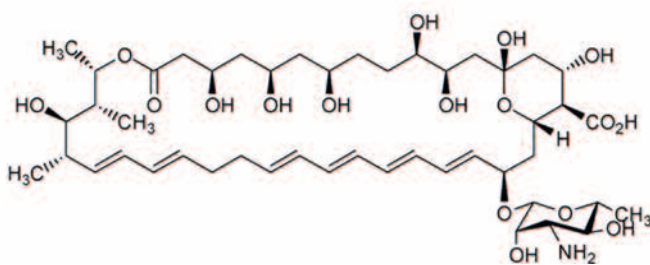


Figura 1: Estructura química de la Nistatina

Se encuentra ampliamente informado que las diferentes formas cristalinas de un mismo fármaco presentan propiedades fisicoquímicas⁴ y farmacotécnicas variables que pueden afectar el desarrollo, la manufactura⁵ y la eficacia de un producto farmacéutico,⁶ pero que a su vez representan una opción factible para mejorar su biodisponibilidad.^{7,8} Por ello, en los estudios de preformulación, es indispensable conocer si los compuestos que intervendrán en una potencial forma farmacéutica existen en diferentes formas polimórficas y de qué modo las propiedades de los distintos polimorfos pueden afectar la efectividad del sistema en desarrollo.⁹

El objetivo del presente trabajo consistió en la identificación de los polimorfos presentes en un lote de *Nis* (denominado N17) utilizado como materia prima para la manufactura de productos farmacéuticos. Los resultados obtenidos empleando diversas técnicas de caracterización, se compararon con datos bibliográficos correspondientes a lotes de producción de los polimorfos puros Tipo A (Squibb Res. Std. #MYNM-150-RP), Tipo B (Squibb Res. Std. #MYNM-150-RP/H) y Tipo C (Squibb Res. Std. #WSC-08982-FP)³ y con los resultados de caracterización de un lote de *Nis*, empleado en el desarrollo de una nueva formulación bioadhesiva para el tratamiento de la Candidiasis oral, correspondientes a estudios realizados por Llabot y colaboradores.^{10,11}

Material y métodos

En este estudio se empleó *Nis* USP (PARAFARM, lote 0318, Buenos Aires, Argentina). Las disoluciones del fármaco se efectuaron con metanol, grado analítico, marca Merck. La caracterización del compuesto se llevó a cabo por espectroscopias ultravioleta-visible (UV/V), infrarroja (IR) y de fluorescencia; análisis térmicos (DTA, TGA y DSC); microscopia óptica con calentamiento (HSM) y difracción de rayos X (XRD).

Es importante destacar que una única técnica no es adecuada para caracterizar completamente las propiedades del material.¹² Mientras que la espectroscopia de infrarrojo da información de la estructura basada en la absorción de radiación de las moléculas a frecuencias específicas, las longitudes de onda de los picos de absorción y emisión en la región del espectro UV/V, junto con la espectroscopia de fluorescencia, pueden ser correlacionados con los tipos de enlaces en una molécula dada y son valiosas en la determinación de los grupos funcionales dentro de una molécula. Por otra parte, el análisis térmico diferencial (DTA) se requiere para obtener información sobre las propiedades térmicas del material; el TGA confirma transiciones tales como volatilizaciones, oxidaciones, deshidrataciones y descomposiciones. La microscopia óptica con platina de calentamiento constituye una técnica visual que permite corroborar transiciones de fases tales como fundidos y recristalizaciones. El estudio de caracterización se completa con el empleo de difracción de rayos X (DRX) con el objeto de determinar la estructura y/o polimorfos presentes en la muestra.

Espectroscopia UV/V

El análisis se efectuó utilizando un espectrofotómetro UV/V marca GBC - Cintra 20, con cubetas de cuarzo marca Hellma 178-010-QS de 10 mm de largo por 10 mm de ancho. Se preparó una solución de *Nis* en metanol con una concentración de 0,5 mg.ml⁻¹. Posteriormente se tomó una alícuota de dicha solución y se diluyó en metanol hasta obtener una concentración final de 10 µg.ml⁻¹. Debido a la poca estabilidad de esta solución, el espectro se registró dentro de los 10 minutos posteriores a su preparación. Se realizó un barrido espectrofotométrico en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 190 y 400 nm, a intervalos de 1 nm.

Espectroscopia de fluorescencia

Se utilizó un espectrofluorotómetro modelo RF-5301, marca Shimadzu. Las medidas se realizaron empleando celdas de cuarzo estándar de 1 cm x 1 cm. El espectro de emisión se obtuvo manteniendo una longitud de onda de excitación en 322 nm y el de excitación, en una longitud de onda de emisión de 425 nm. Para el análisis, la muestra se preparó siguiendo el procedimiento empleado en la obtención del espectro UV/V.

Espectroscopia infrarroja

Se empleó un Espectrofotómetro FT-IR Nicolet, modelo NEXUS 470 utilizando un accesorio de reflectancia difusa. El rango de barrido fue de 4000 hasta 400 cm^{-1} . El análisis se llevó a cabo preparando una suspensión de Nis con Nujol como aglomerante.

Análisis térmico y termogravimétrico diferencial (DTA-TGA)

Los termogramas TGA-DTA se obtuvieron con un equipo marca Rigaku Thermal Analysis Station TAS 100. La velocidad de calentamiento fue de 10 $\text{grados}\cdot\text{min}^{-1}$ y las experiencias se realizaron en atmósfera de aire.

Microscopia óptica

Los cambios morfológicos de la Nis con la temperatura se siguieron utilizando un Microscopio Óptico Zeiss Phomi III POL en el modo de transmisión y con luz polarizada. Se adquirieron imágenes mediante una cámara digital conectada al microscopio y una PC. Las muestras fueron calentadas hasta 200 $^{\circ}\text{C}$, con una velocidad de calentamiento de 10 $\text{grados}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando una platina Mettler FP-5.

Difracción de rayos X

El análisis por difracción de rayos X se llevó a cabo utilizando un difractómetro PHILIPS PW1710 que operaba a 45 kV y 30 mA, con ánodo de cobre que correspondía a una radiación $\text{K}\alpha_1$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) y monocromador curvo de grafito. El barrido se realizó entre $2\theta = 2^{\circ}$ y 40° a intervalos de $0,04^{\circ}$ y a $0,035^{\circ} \text{ s}^{-1}$. Los difractogramas se obtuvieron a temperatura ambiente.

Resultados y discusión

En la Figura 2 se muestra el espectro de absorción UV/V de Nis comercial. De acuerdo con su clasificación como un polieno macrólido, su espectro de absorción ultravioleta muestra tres bandas intensas a 291 nm, 304 nm y 319 nm. La Figura 3 ilustra los espectros obtenidos para fluorescencia de emisión y de excitación. En el caso de los espectros de emisión se utilizó un rango de barrido de 220-400 nm con una energía de excitación fija de 322 nm. Para los espectros de excitación el rango de barrido usado fue 300-400 nm, manteniendo constante la longitud de onda de emisión en 425 nm. El uso de la fluorescencia y UV/V permitió corroborar la naturaleza química del fármaco mediante la comparación de los espectros con datos de la bibliografía.¹³

El análisis mediante el uso de espectroscopia infrarroja determinó el espectro que se presenta en la Figura 4. Teniendo en cuenta que el mismo se llevó a cabo en Nujol, las bandas situadas a 2900 cm^{-1} (banda ancha), 1376 cm^{-1} y 1463 cm^{-1}

(bandas angostas) se asocian con las vibraciones C-H y C-C del aglomerante. La amplia e intensa banda presente a 3375 cm^{-1} corresponde a la vibración de alargamiento del hidrógeno unido a nitrógeno y oxígeno (N-H y O-H) mientras que la flexión del enlace N-H aparece en 1641 cm^{-1} . A 1724 cm^{-1} se observa la banda característica debido a la vibración de alargamiento del carbonilo del éster y ácidos carboxílicos, las bandas situadas a 1687, 1005 y 850 cm^{-1} se atribuyen a los dobles enlaces CH=CH de las cadenas del polieno. La vibración de tensión antisimétrica del grupo carboxilato aparece a 1568 cm^{-1} ; la vibración de flexión de los grupos -CH₂ se manifiestan a 1431 cm^{-1} y la señal a 1072 cm^{-1} se asigna a la vibración de alargamiento del grupo hidroxilo.

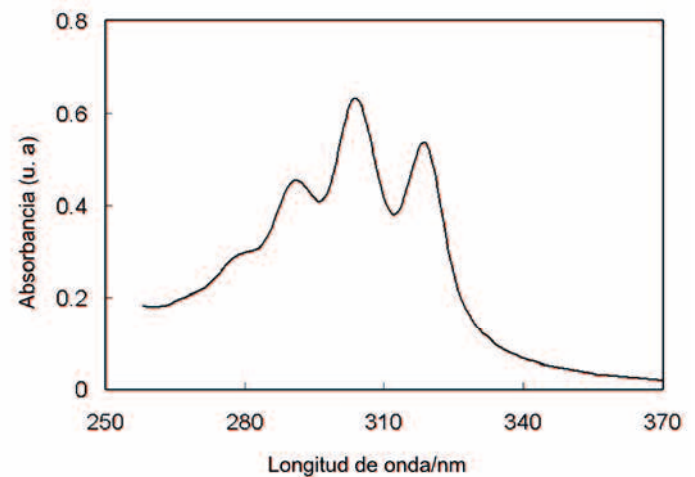


Figura 2. Espectro Ultravioleta de Nistatina comercial

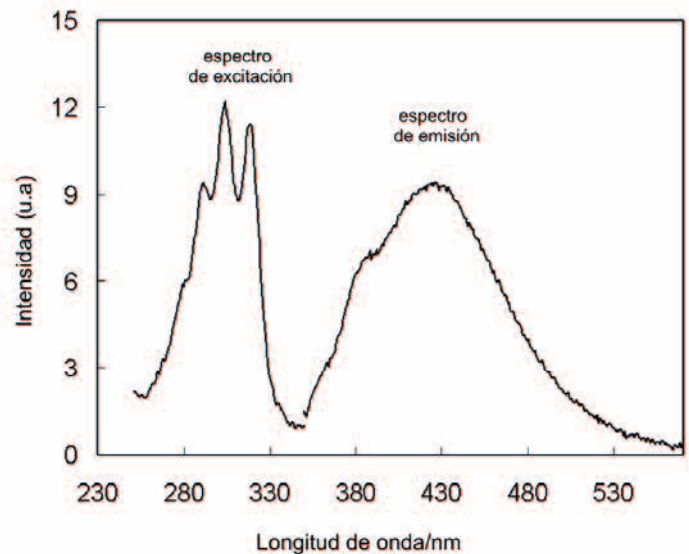


Figura 3. Espectro de Fluorescencia de Nistatina comercial

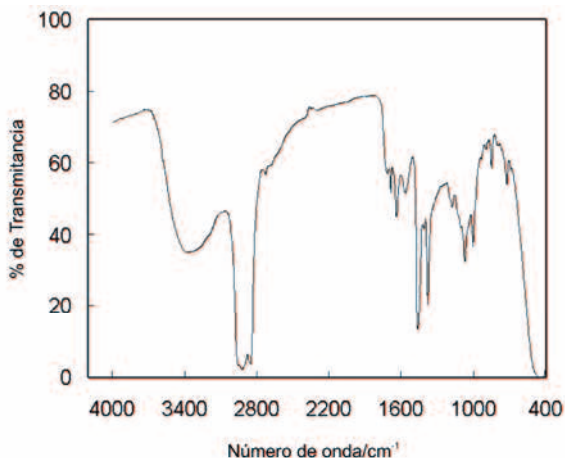


Figura 4. Espectro Infrarrojo de Nistatina comercial (en Nujol)

Conociendo que la *Nis* presenta tres formas polimórficas, a partir del análisis del espectro de infrarrojo y su comparación con datos de la bibliografía,³ se detectó la presencia de la banda de mediana intensidad en 1640 cm^{-1} , característica de la forma polimórfica tipo B. En la zona comprendida entre 690 cm^{-1} y 4000 cm^{-1} , se manifestaron las bandas correspondientes tanto al polimorfo tipo A como al tipo B. Por otra parte no se observaron las bandas que caracterizan al polimorfo tipo C, en las regiones comprendidas entre 990 cm^{-1} y 1005 cm^{-1} y en 3600 cm^{-1} . Estos resultados revelaron que la *Nis* estudiada correspondía a una mezcla de los polimorfos tipos A y B.

Con el objeto de determinar el comportamiento térmico, se efectuó un análisis gravimétrico y térmico diferencial en atmósfera de aire, calentando desde temperatura ambiente hasta 200 °C. Los resultados se presentan en la Figura 5, en la que se observan dos eventos, uno endotérmico a 76 °C y otro exotérmico a 165 °C. El primer pico corresponde a la deshidratación y el segundo a la descomposición del fármaco. El inicio del proceso de descomposición se manifiesta en la curva DTA alrededor de 140 °C, donde la señal comienza a apartarse de su línea de base. Los resultados obtenidos a partir de mediciones DTA no mostraron señales claras atribuidas a cambios de polimorfismo. Probablemente, el fármaco pase de una forma cristalina (tipo A) a otro (tipo B) después de una deshidratación completa. Una pequeña meseta en la curva de TG, en la región entre 80 °C y 140 °C, podría considerarse como una evidencia de tal cambio. A temperaturas mayores de 200 °C el material aún permanece en estado sólido, en forma de un residuo color negro. La curva de DTA no muestra un pico endotérmico que pueda atribuirse a la fusión. La pérdida de masa del proceso global, observada en la curva TGA, fue de alrededor de 28 % a 200 °C.

Con el fin de establecer el comportamiento de *Nis* desde un punto de vista termodinámico, se sometió una muestra a proceso

de calentamiento-enfriamiento-calentamiento a una velocidad de barrido de 10 °C min^{-1} . En un primer ciclo, la muestra se calentó desde temperatura ambiente hasta 200 °C y se enfrió hasta temperatura ambiente, luego se calentó nuevamente hasta 200 °C. Los datos se presentan en la Figura 6. En el primer ciclo, durante el calentamiento, se observan los dos picos endotérmicos mencionados previamente, mientras que no se registran transiciones visibles durante el enfriamiento y en el segundo calentamiento. Estos resultados confirmaron la descomposición irreversible de la *Nis* más allá de 200 °C. Este estudio se completó con DRX, a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la Figura 7. En la Fig. 7a) se muestran las señales de difracción de una muestra de *Nis* sin tratamiento térmico. Los picos se asignaron tanto al polimorfo tipo A como al tipo B, en concordancia con lo informado en la bibliografía.³ En el espectro puede observarse la presencia de una importante cantidad de fase amorfa, lo que indica que la sustancia tiene una escasa cristalinidad.

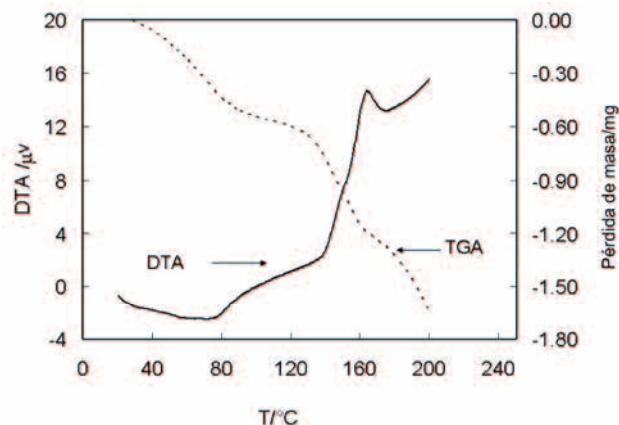


Figure 5. Curvas DTA/TGA de Nistatina comercial a una velocidad de calentamiento de 10°C min^{-1} , en aire

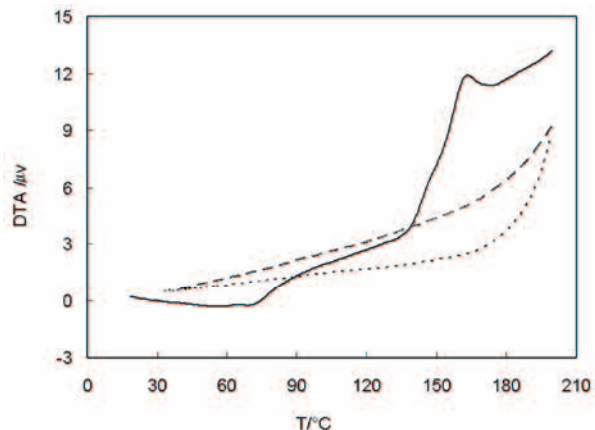


Figura 6: Curvas de DTA de Nistatina comercial a una velocidad de calentamiento de 10°C min^{-1} en aire. Primer ciclo: (—) calentamiento; (...) enfriamiento. Segundo ciclo: (---) calentamiento

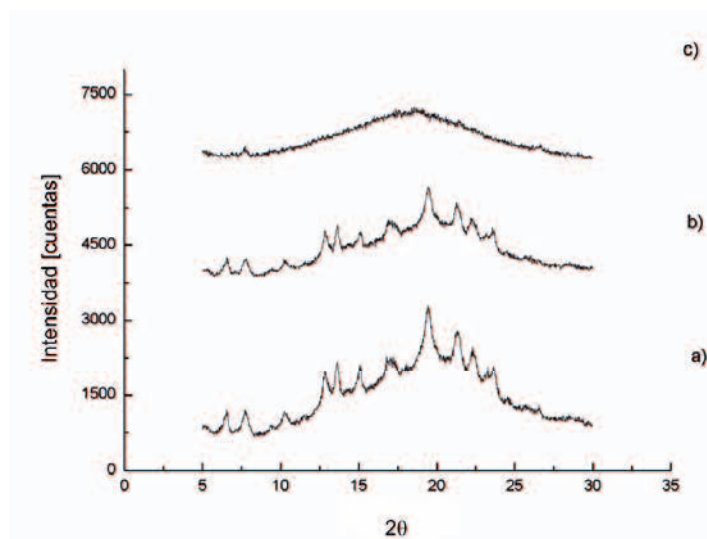


Figura 7. Espectro de Difracción de Rayos X de Nistatina, a temperatura ambiente. (a) muestra sin tratamiento térmico; (b) muestra precalentada a 80°C; (c) muestra precalentada a 200°C.

Teniendo en cuenta la posibilidad de emplear la *Nis* en el diseño de sistemas de administración de fármacos, consideramos necesario confirmar que el perteneciente a este lote no experimentó modificaciones cristalinas en el intervalo de temperaturas comprendido entre 25 °C y 80 °C. Por tal razón se obtuvo el difractograma de una muestra precalentada a 80 °C durante 24 h como se muestra en la Fig. 7b). En la misma se observa que la *Nis* no cambia su estructura cristalina en estas nuevas condiciones ambientales, confirmando los resultados obtenidos a partir de las medidas de DTA. Un tercer análisis se llevó a cabo sobre el residuo obtenido luego de calentar la muestra a 200 °C, cuyo difractograma se muestra en la Fig. 7c). La ausencia total de las señales y la presencia de una fase amorfa revelaron que la descomposición del fármaco, a la temperatura mencionada, fue total.

Finalmente se utilizó la termomicroscopía en el modo de transmisión con luz polarizada para visualizar los eventos térmicos registrados en las curvas de DTA. Las microfotografías que se muestran en la Figura 8, se tomaron a 25 °C (Fig. 8A); 80 °C (Fig. 8B) y 200 °C (Fig. 8C). En la Fig. 8A) se aprecia la presencia de pequeñas zonas cristalinas dentro de una matriz amorfa, la cual se ha circulado para su interpretación. En la Fig. 8B) la zona observada está menos definida pero se mantiene la cristalinidad. Hasta ca. 200 °C no se observaron cambios en la morfología de la muestra. A 200 °C, Fig. 8C), el aspecto de la muestra cambia en su conjunto, la muestra presenta claramente un aspecto homogéneo, sin observar el fenómeno de fusión.

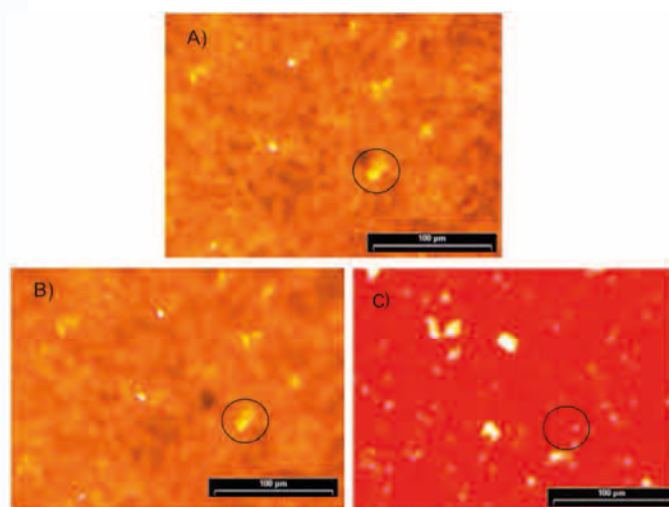


Figura 8. Microfotografías de Nistatina comercial capturadas a 160x con luz polarizada, en un rango de temperaturas entre 25°C y 200°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C min⁻¹. La sección circulada muestra la zona cristalina observada. A) 25°C; B) 80°C y C) 200°C.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirmaron la naturaleza química de la *Nis*: “antibiótico tetraénico macrocíclico”. La muestra estudiada correspondió a una mezcla de los polimorfos, mayoritariamente, tipos A y B y una importante proporción de fase amorfa con un comportamiento termodinámicamente irreversible luego del calentamiento a 200 °C, temperatura a partir de la cual se descompone totalmente. Lo informado es de suma importancia ya que demostró que el fármaco no modifica su forma cristalina cuando es sometido a tratamientos térmicos menores a 200 °C, en concordancia con lo encontrado por Llabot y colaboradores¹¹ para el polimorfo C, empleado en el proceso de obtención de films bioadhesivos como vehículos para la administración bucal de *Nis*. Además se corroboró la falta de uniformidad entre diferentes lotes y la necesidad de su caracterización previa a su empleo en el diseño de medicamentos.

Agradecimientos

Este trabajo fue subsidiado por la Universidad Nacional del Sur, PGI 24/ZQ06 (Bahía Blanca, Argentina). Los autores agradecen a la Dra. M. Rapp y O. Pieroni por la ayuda brindada en la discusión de los resultados de IR y DRX. También agradecen al profesor Dr. Julio C. Bazán por la revisión del manuscrito.

Referencias

1. Shiomi K, Omura S. Discovery of New Macrolides. 2da. Ed. Capítulo 1. In: Macrolides Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice. Omura S, editor. USA: Academic Press; 2002, p.1-56.
2. Kobayashi GS, Medoff G. Antifungal agents: Recent Developments. *Annu Rev Microbiol.* 1977; 31:291-308.
3. Michael GW. Nystatin. In: Analytical Profiles of Drug Substances. Florey K, editor. Academic Press; 1977. p. 341-421.
4. Lu J, Rohani S. Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Curr Med Chem.* 2009; 16(7):884-905.
5. Doelker E. Crystalline modifications and polymorphism changes during drug manufacture. *Ann Pharm Fr.* 2002; 60(3):161-176.
6. Yin SX, Grosso JA. Selecting and controlling API crystal form for pharmaceutical development: strategies and processes. *Curr Opin Drug Di De.* 2008; 11(6):771-777.
7. Chawla G, Bansal AK. Effect of processing on Celecoxib and its solvates. *Pharm Dev Technol.* 2004; 9(4):419-433.
8. Rama Rao B, Ramana Rao G, Avadhanulo AB. Polymorphism in drugs and its significance in therapeutics. *J Sci Ind Res India.* 1987; 46:450-455.
9. Clas SD. The importance of characterizing the crystal form of the drug substance during drug development. *Curr Opin Drug Di De.* 2003; 6(4):550-560.
10. Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films: Part I. Pre-formulation studies. *Int J Pharm.* 2007; 330:54-60.
11. Llabot JM, Palma SD, Manzo RH, Allemandi DA. Design of novel antifungal mucoadhesive films: Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm.* 2007; 336:263-268.
12. Láng P, Kiss V, Ambrus R, Farkas G, Szabó-Révész P, Aigner Z, Várkonyi E. Polymorph screening of an active material. *J Pharmaceut Biomed.* 2013; 84:177-183.
13. Silva L, Coutinho A, Federov A, Prieto M. Solution conformation of a nitrobenzoxadiazole derivative of the polyene antibiotic nystatin: a FRET study. *J Photochem Photobiol B.* 2003; 72:17-26.