



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**“OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO
IN VITRO PARA EVALUAR EL POTENCIAL
HEMOLÍTICO DE VEHÍCULOS PARA
INYECTABLES”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A :

SANDRA LILIANA PIÑA CASTILLO

ASESOR: Dra. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



**DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE**

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Optimización de un método In Vitro para evaluar el potencial hemolítico de excipientes para inyectables.

que presenta la pasante: Sandra Liliana Piña Castillo
con número de cuenta: 40301926-5 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Julio de 2008.

PRESIDENTE	<u>Dra. Raquel López Arellano</u>	
VOCAL	<u>QFB. Martha Patricia Campos Peón</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Elizabeth García García</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Elvia Adriana Morales Hipólito</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Claudia Mariano Hernández</u>	

Dedicatorias

A mis padres:

*Sabiendo que jamás existirá
una forma de agradecer en
esta vida de lucha
y superación constante,
deseo expresarles que mis ideales,
esfuerzos y logros han sido
también suyos y constituye el legado
mas grande que pudiera recibir.
Con Cariño, Admiración y Respeto*

Hugo Cuatecontzí:

*Y parece que fue ayer,
cuando todo comenzó, mil gracias
por toda tu infinita paciencia
y amor que me das
por hacer de todos aquellos
momentos difíciles los
momentos mas divertidos. Este trabajo
también es tuyo.
Gracias por ser mucho más que
mi compañero, mi amigo y mi pareja.*

Agradecimientos

A la Doctora Raquel y al profesor Juan José por darme la oportunidad de demostrar que los clínicos también podemos ser buenos farmacéuticos. Mil gracias por permitirme aprender de ustedes muchas cosas buenas.

Al Doctor Fernando Álvarez por todo el apoyo brindado; este trabajo también es suyo.

A mis mejores amigos Alinne (Pancha), Jazmín (Jaz), Beto, Faby y Carlos ustedes saben cuanto los quiero, gracias por su amistad y gran apoyo durante todo este tiempo.

Todos mis compañeros de trabajo Dra. Elí, Lupita, Adí, Claus, Nes, Gaby, Alinne, Pablo, Abdíel por todos aquellos momentos malos, buenos y sobre todo por los mejores gracias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi Alma Mater, estaré siempre agradecida.

A Farmacéuticos Rayere por el apoyo para este proyecto

Por último no me queda más que agradecer a todas aquellas personas que creyeron siempre en mí. Gracias.

Índice

I. Introducción.....	4
II. Objetivos.....	5
III. Marco teórico.....	6
1. Hemoglobina.....	6
1.1 Composición de un glóbulo rojo.....	6
1.2 Hemoglobina. Características.....	7
1.3 Destrucción de la hemoglobina.....	9
1.4 Funciones de la hemoglobina.....	10
2. Importancia de la prueba de hemólisis en un inyectable.....	11
2.1 ¿Qué es la hemólisis?.....	11
2.2 Relación de la presión osmótica con la hemólisis.....	11
2.3 Regulación de la osmolalidad sanguínea.....	17
2.4 Fragilidad osmótica de los eritrocitos.....	17
2.5 Efectos de la hemólisis en un individuo.....	18
3. Métodos In Vitro para evaluar la hemólisis en inyectables.....	20
3.1 Método estático.....	21
3.2 Método dinámico.....	22
4. Potencial hemolítico de excipientes para inyectables.....	23
4.1 ¿Qué es el potencial hemolítico?.....	23
4.2 Excipientes empleados en la formulación de inyectables.....	23
4.3 Excipientes en los cuales se ha evaluado el potencial hemolítico.....	24
IV. Desarrollo experimental.....	26
1. Cuadros metodológicos.....	26
1.1 Desarrollo del método.....	26
1.2 Aplicación del método.....	27
2. Materiales y métodos.....	28
3. Optimización del método.....	29
3.1 Condiciones de estudio.....	29
3.2 Fuentes de variación del método.....	29
3.3 Plan de experiencias.....	29
4. Aplicación del método.....	30
4.1 Condiciones de estudio.....	30
4.2 Fuentes de variación en la aplicación del método.....	30

4.3 Respuesta.....	31
4.4 Plan de experiencias.....	31
V. Resultados y análisis.....	32
VI. Conclusiones.....	44
VII. Anexo.....	45
VIII. Referencias.....	50

Índice de Figuras

Figura	Descripción	Página
1	Se muestran los eritrocitos como discos bicóncavos.....	6
2	Estructura tridimensional de la hemoglobina.....	7
3	Estructura química del grupo hemo.....	8
4	Caracterización espectrofotométrica de la hemoglobina.....	9
5	Formación y destrucción de la hemoglobina.....	10
6	Eritrocitos en solución isotónica.....	12
7	Eritrocitos en solución hipotónica.....	12
8	Eritrocitos en solución hipertónica.....	13
9	Modelo de osmosis.....	14
10	Fragilidad osmótica del eritrocito.....	18
11	Conversión del grupo hemo a diglucuronido de bilirrubina.....	19
12	Sistema dinámico In Vitro para determinar el potencial hemolítico.....	22
13	Barrido de la hemoglobina en el espectro visible.....	34
14	Gráfica de diferencia mínima significativa para el control positivo a 540 y 541 nm.....	35
15	Gráfica de diferencia mínima significativa para el control negativo a 540 y 541 nm.....	36
16	Gráfica de diferencia mínima significativa para el control positivo a temperatura ambiente y a 37° C.....	38
17	Gráfica de diferencia mínima significativa para el control negativo a temperatura ambiente y a 37° C.....	39
18	Prueba de hemólisis a diferentes soluciones: hipotónico, isotónica, hipertónica y glucosada.....	40
19	Ejemplo de la prueba de hemólisis.....	43

Índice de cuadros

Tabla	Descripción	Página
1	Plan de optimización del método.....	30
2	Plan de experiencias para determinar el potencial hemolítico de 9 excipientes y 1 inyectable.....	31
3	Resultados del control positivo a diferentes concentraciones de extran..	33
4	Comparación de resultados obtenidos del control positivo y negativo a 540 y 541 nm.....	34
5	Análisis de varianza del control positivo a 540 y 541 nm.....	35
6	Análisis de varianza del control negativo a 540 y 541 nm.....	36
7	Comparación de los resultados obtenidos en las dos temperaturas para el control negativo y como para el positivo a la longitud de onda de 541 nm.....	37
8	Análisis de varianza del control positivo a temperatura ambiente y a 37° C.....	37
9	Análisis de varianza del control negativo a temperatura ambiente y a 37° C.....	38
10	Resultados del almacenamiento de la muestra a cero horas y 24 horas después de la preparación de la muestra.....	40
11	Resultados de la prueba de hemólisis a excipientes comúnmente empleados en formulaciones parenterales.....	41
12	Resultados de la prueba de hemólisis de excipientes y un inyectable....	42

I. Introducción

La hemólisis intravascular ha sido asociada con condiciones médicas indeseables, se han estudiado los efectos adversos producidos por la administración de inyectables, los cuales son formulados con excipientes y principios activos que aunque son considerados como inocuos, estos pueden llegar a inducir hemólisis después de la administración intravenosa.

Los síntomas que se han visto comúnmente en los pacientes con hemólisis son, escalofríos, fiebre, dolor en el abdomen y espalda, respiración entrecortada, postración y shock. La severidad de los síntomas producidos por la hemólisis están directamente relacionados con la cantidad de hemoglobina liberada.

La prueba de hemólisis para inyectables, es de suma importancia dentro del desarrollo farmacéutico de un inyectable como una prueba de control de calidad debido a que de esta manera aseguramos que nuestro inyectable no producirá este efecto adverso, ya que esta prueba se puede realizar desde la elección de los excipientes que se utilizan en la formulación, hasta tener el producto terminado.

Se han reportado estudios que muestran métodos para determinar si la isotonicidad es inadecuada en las mezclas de cosolventes usadas en vehículos para inyectables, estos estudios están basados en un método In Vitro, en el cual se evalúa el potencial hemolítico producido por los excipientes. Cuando se descubrió un método in Vitro para evaluar la hemólisis intravascular comenzaron a estudiar algunos de los excipientes que forman parte de las formulaciones parenterales, debido a la importancia que tiene el poder administrar inyectables seguros.

En el presente trabajo se realizó la optimización de un método in Vitro para evaluar el potencial hemolítico de excipientes utilizados en formulaciones parenterales así como también una técnica que ayuda a evaluar el potencial hemolítico de inyectables, con el objetivo de prevenir la hemólisis que se pueda producir desde el momento de la elección de excipientes dentro del desarrollo farmacéutico de inyectables.

II. Objetivos

Objetivo general

Optimizar un método In Vitro en un sistema estático para evaluar el potencial hemolítico producido por excipientes empleados en soluciones parenterales a fin de que pueda ser utilizado como prueba de control de calidad de inyectables.

Objetivos particulares

- Evaluar el comportamiento de la hemoglobina por medio de espectrofotometría visible, para determinar la longitud de onda óptima para el desarrollo del método.
- Establecer las condiciones óptimas de temperatura y estabilidad de la muestra, como parámetros dentro de la optimización del método.
- Aplicar el método optimizado en la evaluación del potencial hemolítico de excipientes comúnmente empleados en formulaciones parenterales.
- Aplicar el método optimizado en la evaluación de un inyectable que se administra por vía intravenosa para determinar su potencial hemolítico como control de calidad final del producto.

III. Marco teórico

1. Hemoglobina

Para poder comprender la relación que hay entre los procesos a nivel biológico y las interacciones que ocurren cuando introducimos un agente extraño al organismo como los son los inyectables, es primordial comprender como funciona nuestro organismo para poder entender el porque de las reacciones adversas; como es el caso de la hemólisis producida por inyectables y por excipientes que se encuentran dentro de la formulación.

La sangre es un tejido conectivo compuesto por una matriz extracelular denominada plasma en la cual se disuelven varias sustancias además contiene una gran variedad de células; sus funciones son el transporte, regulación y protección. La sangre es más densa y viscosa que el agua, posee un pH ligeramente alcalino cuyo valor se encuentra entre 7.35 y 7.45, el volumen sanguíneo es entre 5 y 6 litros en humanos. (Tortora. 2003)

1.1 Composición de un glóbulo rojo (eritrocitos)

Los glóbulos rojos o eritrocitos (eritro, de *erythros*, rojos y cito, de *kytos*, célula) son discos bicóncavos aplanados de unos $7\mu\text{m}$ de diámetro y $2.2\mu\text{m}$ de espesor. Aunque el glóbulo rojo maduro no tenga núcleo, no es un cuerpo inerte; de hecho es un transportador químico muy eficaz del comburente básico (oxígeno) y uno de los productos finales de la combustión (CO_2) [Figura 1]. La membrana de la célula presenta una semipermeabilidad dinámica, y mantiene dentro del eritrocito una concentración elevada de potasio, no dejando entrar al sodio.



Figura 1. Se muestran los eritrocitos como discos bicóncavos. (images.encarta.msn.com, 2008)

El elemento más importante en el eritrocito es la hemoglobina. Cada eritrocito contiene aproximadamente 280 millones de moléculas de hemoglobina, que confieren el color rojo a la sangre. Un hombre adulto sano tiene alrededor de 5.4 millones de glóbulos rojos por microlitro de sangre. (Ira, F. 2003.)

Los eritrocitos envejecidos se degradan hacia el día 120 de vida en la médula ósea, el hígado y bazo; esto es debido al desgaste que sufren sus membranas plasmáticas al deformarse en los capilares sanguíneos, sin un núcleo u otros organelos los glóbulos rojos no pueden sintetizar nuevos componentes, por lo cual la membrana se va volviendo mas frágil con el tiempo y las células son mas propensas a estallar, liberando la hemoglobina que puede ser toxica para los tejidos a menos de que esta se remueva rápidamente. (Tortora. 2003)

1.2 Características de la hemoglobina

El pigmento rojo que transporta oxígeno en los eritrocitos de los vertebrados es la hemoglobina, una proteína con un peso molecular de 68 kD.

La hemoglobina es una proteína globular presente en los glóbulos rojos en concentraciones elevadas, la cual se encarga de fijar oxígeno en los pulmones y lo transportan por la sangre a los tejidos y células que rodean el lecho capilar del sistema vascular. La hemoglobina esta formada por cuatro cadenas polipeptídicas de las cuales cada una tiene un grupo hemo [Figura 2]. (Gannong. 2003)

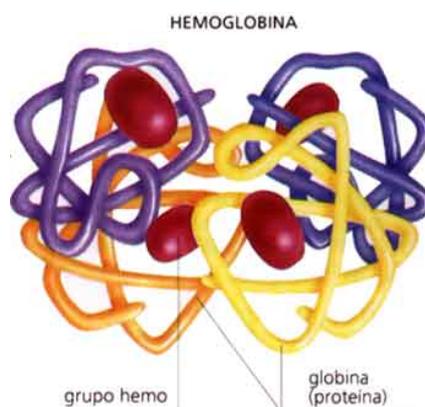


Figura 2: Estructura tridimensional de la hemoglobina en la cual se muestra las cuatro subunidades, hay dos cadenas polipeptídicas α y β , cada una unida a una fracción del grupo hemo representado por los discos rojos. (<http://www.araucaria2000.cl/scirculatorio/hemoglobina>. Mayo. 2008)

La parte proteínica se llama globina; es incolora y consta de cuatro cadenas polipeptídicas, las cuales cada una tiene un grupo prostético hemo. Un grupo prostético es la porción no polipeptídica de una proteína. Las cadenas polipeptídicas α contienen 141 aminoácidos y las no α (β, γ, δ) 146 aminoácidos y difieren en la secuencia de aminoácidos. Las cadenas adoptan una posición helicoidal lo que da a la molécula una estructura esférica. El hemo es una molécula de porfirina que contiene un átomo de hierro en su centro, el cual se encuentra en estado ferroso (Fe^{2+}) [Figura 3].

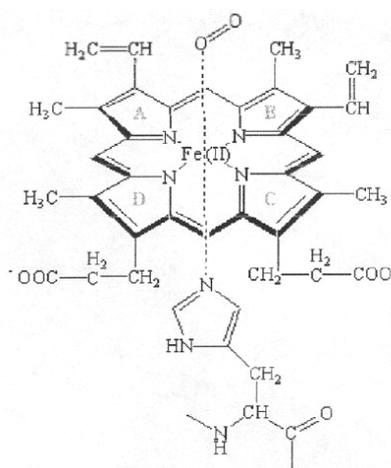


Figura 3: Estructura química del grupo hemo, en el centro se encuentra el hierro en estado ferroso. (Peñuela O. Andrés. 2005)

La molécula hemo es uno de los productos finales del anabolismo de las porfirinas, durante el cual se construye su complicada estructura a partir de sustancias relativamente simples, se conocen muchas alteraciones patológicas debidas a la deficiencia de alguna etapa en la síntesis.

En el caso de la hemoglobina ya se cuenta con su espectro característico en el cual muestra su actividad y sus puntos de máxima absorción, un ejemplo es a 440 nm donde la señal la da el grupo hemo (Banda de Soret) [Figura 4]. (Peñuela O. Andrés. 2005)

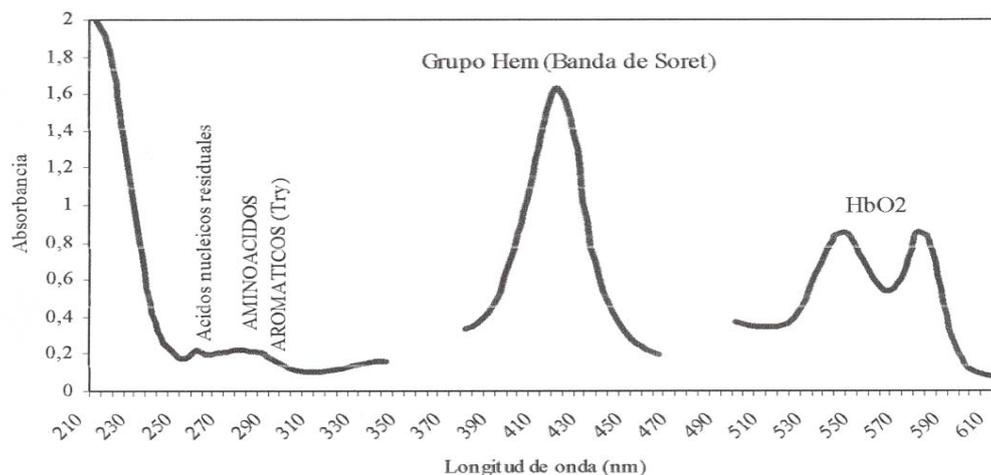


Figura 4: Caracterización espectrofotométrica de la hemoglobina. (Peñuela O. Andrés. 2005)

1.3 Destrucción de la hemoglobina

El eritrocito viejo se vuelve más esférico, disminuyendo su diámetro; también puede volverse irregular y termina fragmentándose en pequeñas partículas. Estos fragmentos son recogidos por las células del sistema retículo endotelial de la pared de los sinusoides del bazo o del hígado. Dentro de estas células el anillo hemo se abre, el hierro se separa y la globina es liberada. El residuo que ya no contiene hierro, ni proteína, es la biliverdina que luego se reduce a bilirrubina. Este pigmento biliar es llevado por la sangre en combinación inestable con las proteínas del plasma.

En las células del hígado la bilirrubina se separa de la proteína y se fija al ácido glucurónico para formar diglucuronido de bilirrubina hidrosoluble, que se excreta en la bilis. El hierro que se libera al ser destruida la hemoglobina se almacena como ferritina que no es sino óxido de hierro unido a una proteína. El hierro férrico circula en el plasma unido a una globulina beta llamada transferrina, la cual es transportada hacia la médula ósea roja donde se empleará para la síntesis de hemoglobina. La globina debido al desdoblamiento de la hemoglobina se metaboliza hasta aminoácidos [Figura 5] (Lynch M. 1977)

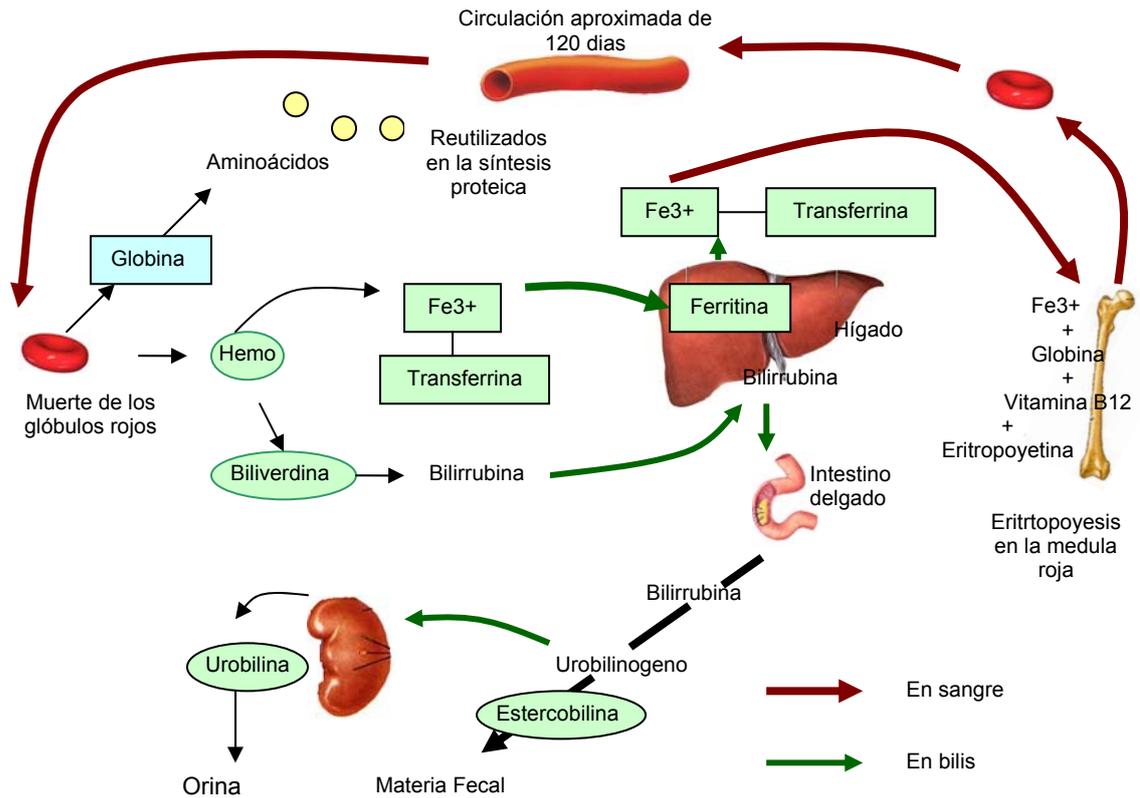


Figura 5: Formación y destrucción de los glóbulos rojos, y reciclando la hemoglobina.

1.4 Funciones de la hemoglobina

Las principales funciones de la hemoglobina son las siguientes:

- 1) Transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos, y del bióxido de carbono de los tejidos a los pulmones.
- 2) Participación en la regulación ácido-básica eliminando CO₂ en los pulmones y amortiguando los cambios de pH por acción de los grupos histidinimidazol de la hemoglobina.

En los pulmones, el oxígeno difunde a través de las delgadas paredes de los alvéolos y de los capilares y es fijado en seguida por la hemoglobina reducida: $O_2 + H_2O = HbO_2$. Al llegar la sangre a los tejidos, donde la tensión de oxígeno es baja, la oxihemoglobina se disocia, y el oxígeno difunde a las células tisulares. Al mismo tiempo, la tensión de CO₂ es alta en las células y el líquido que las rodea. Dentro de los eritrocitos una enzima, la anhidrasa carbónica acelera la reacción $CO_2 + H_2O \rightarrow H_2CO_3$ $H^+ + HCO_3^-$. La hemoglobina reducida (acaba de ceder el oxígeno a los tejidos)

tiene una acción amortiguadora muy potente y neutraliza a los iones H^+ liberados en la reacción que se acaba de mencionar. Cuando los iones HCO_3^- salen de los glóbulos rojos y se unen a Na^+ mientras que los iones Cl^- del NaCl del plasma difunden al glóbulo rojo y compensan la pérdida de HCO_3^- (intercambio de cloruros). El CO_2 es transportado bajo forma de un compuesto con la hemoglobina reducida (Carboxihemoglobina). (Lynch M. 1977)

2. Importancia de la prueba de hemólisis en un inyectable

2.1 ¿Qué es la hemólisis?

La hemólisis está definida como la alteración de la membrana de los eritrocitos dando como resultado la liberación de la hemoglobina y de los componentes celulares en el torrente sanguíneo. Puede ocurrir si los glóbulos rojos se encuentran en un medio hipotónico, provocando la destrucción de la membrana del eritrocito; aunque la hemólisis no es estrictamente proporcional a la tonicidad de la solución, si no que está definitivamente relacionada con la composición del vehículo, ya que pueden influir los cosolventes, surfactantes, y otro tipo de excipientes, incluso el mismo principio activo; no es un proceso instantáneo ya que requiere tiempo para que se de la interacción de la formulación con la membrana de los eritrocitos. (Gupta K. 1999)

2.2 Relación de la presión osmótica con la hemólisis

Para poder entender la relación que existe entre la presión osmótica y la hemólisis es necesario tener claro los conceptos que a continuación se describen y que están relacionados directamente con la presión osmótica y con la hemólisis.

Solución isotónica. Es toda aquella solución que no modifica una membrana permselectiva, tiene la misma presión osmótica que el contenido de la célula protegido por la membrana; es decir son soluciones que tienen la misma concentración de sales que el plasma de la sangre. [Figura 6]. Una característica de estas soluciones es que su presión osmótica es igual a la de la sangre y no producen alteraciones en los glóbulos rojos. El valor de referencia de isotonicidad es una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%. Su presión osmótica corresponde al del plasma y las lágrimas.

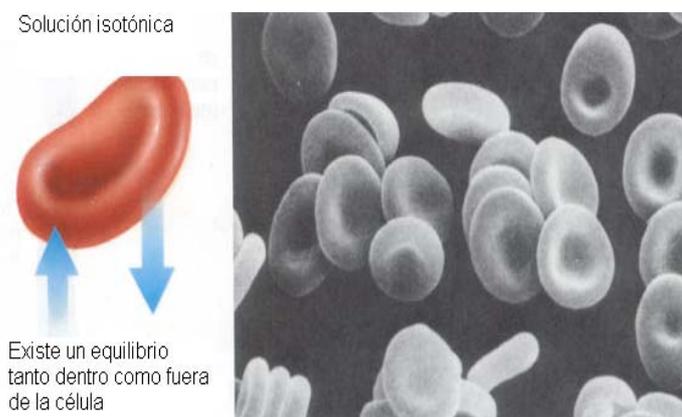


Figura 6: Cuando la solución es isotónica los eritrocitos no pierden la forma que estos tienen en condiciones normales.

(http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy1textbook/1anatomytextch1.html. 2008)

Solución hipotónica: una solución hipotónica es aquella que tiene menor concentración de soluto en el medio externo en relación al medio citoplasmático de la célula. Una célula sumergida en una solución con una concentración más baja de materiales disueltos. Bajo estas condiciones, el agua se difunde a la célula, es decir, se produce ósmosis de líquido hacia el interior de la célula. Una célula en ambiente hipotónico se hincha con el agua y puede explotar; cuando se da este caso en los glóbulos rojos de la sangre, se denomina hemólisis [Figura 7].

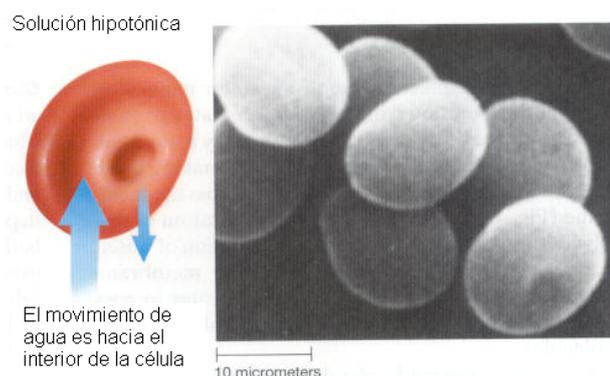


Figura 7: Cuando en los eritrocitos hay un movimiento de agua hacia el interior de las células estos se hinchan hasta establecer un equilibrio en el cual se puede llegar a producir una hemólisis.

(http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy1textbook/1anatomytextch1.html. 2008)

Solución Hipertónica: Son aquellas soluciones salinas acuosas cuya concentración molecular es mayor que la del plasma de la sangre. Si una célula se encuentra en un medio hipertónico, sale agua de la célula hacia el exterior, con lo que esta se contrae (crenación) y la célula puede llegar a morir por deshidratación carbónica. La crenación es el fenómeno mediante el cual la célula se contrae en un medio hipertónico, la salida del agua de la célula continúa hasta que la presión osmótica del medio y de la célula sean iguales [Figura 8].

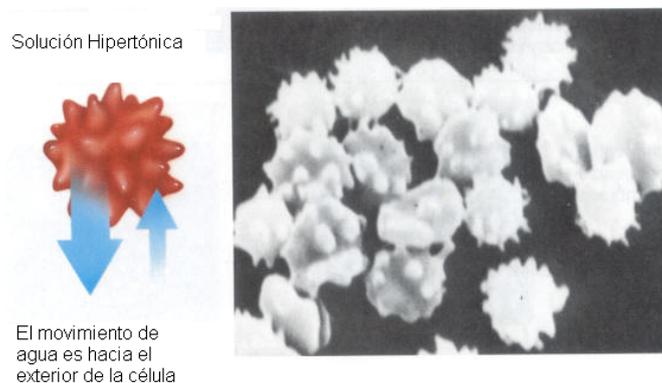


Figura 8: Cuando los eritrocitos sufren una pérdida excesiva de agua, estos se deforman (crenación). (http://homepage.smc.edu/wissmann_paul/anatomy1textbook/1anatomytextch1.html, Mayo. 2008)

Tonicidad: Este término se utiliza para describir el efecto de una solución sobre el movimiento osmótico del agua, por ejemplo, si una solución iso-osmótica de glucosa o de solución salina esta separada del plasma por una membrana permeable al agua, pero no a la glucosa o al NaCl, no se producirá osmosis. En este caso la solución es isotónica con el plasma. (Ira F. 2003)

Osmosis: Es la diferencia neta de agua (el disolvente) a través de la membrana. Durante la osmosis existe un movimiento neto de moléculas de agua desde el lado de mayor concentración de agua al lado de menor concentración de agua. La difusión de agua a través de una membrana se produce cuando el agua esta mas concentrada que al otro lado; es decir cuando una solución esta más diluida que otra [Figura 9]. Por lo tanto hay dos requerimientos para la osmosis:

- Debe de haber una diferencia de concentración de un soluto entre ambos lados de la membrana selectivamente permeable.

- La membrana debe de ser relativamente impermeable al soluto.

Los solutos que no pueden pasar libremente a través de la membrana se dice que son osmóticamente activos. (Ira F. 2003.)

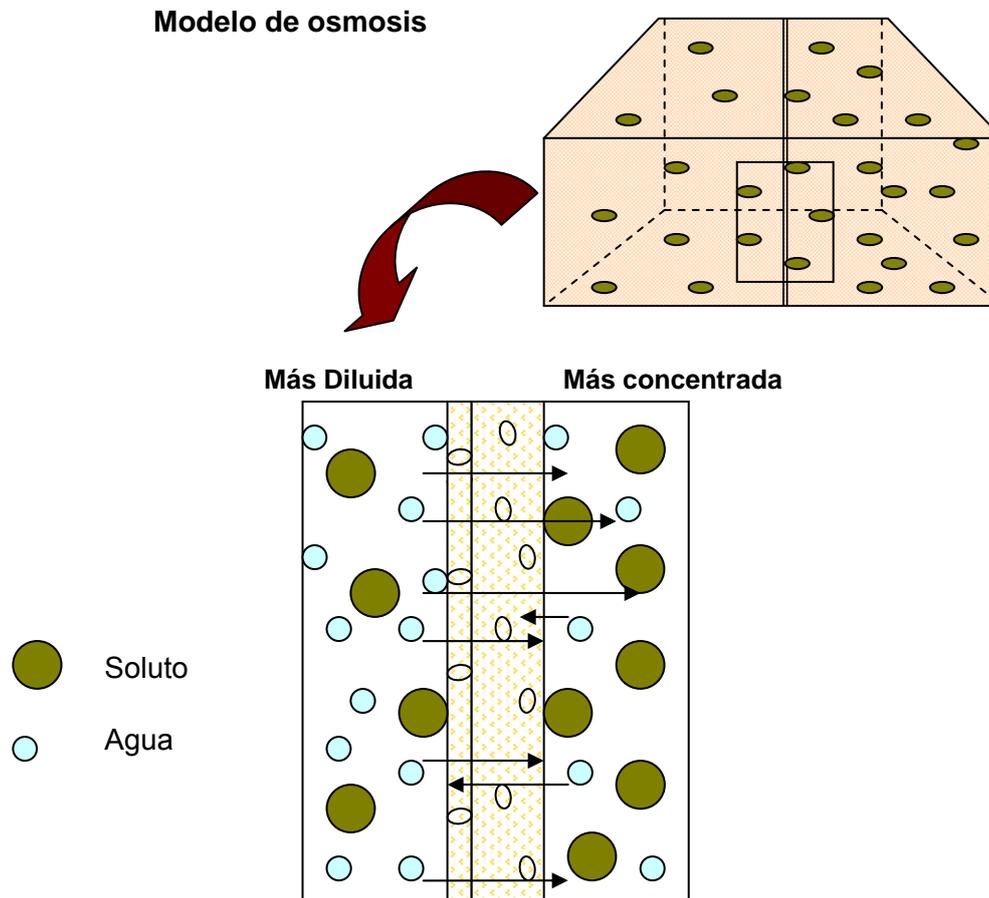


Figura 9. Modelo de osmosis el cual ilustra el movimiento neto de agua desde una solución de menor concentración de soluto (mayor concentración de agua) a la solución de mayor concentración de soluto (menor concentración de agua).

Presión osmótica: Es una propiedad coligativa y es una de las principales características que deben tener en cuenta en las relaciones de los líquidos intersticiales e intravasculares que constituyen el medio interno. La membrana celular determina un comportamiento que contiene soluciones de distinta concentración al medio extracelular que la rodea, creando una barrera de control de solutos.

La presión osmótica, es aquella fuerza que sería necesaria para detener el flujo de agua a través de la membrana semipermeable. Al considerar como semipermeable a la

membrana plasmática, las células de los organismos pluricelulares deben permanecer en equilibrio osmótico con los líquidos tisulares.

Osmolalidad: Medida de la presión osmótica generada por una solución. Es la concentración de moléculas osmóticas activas. Medida de la concentración de una sustancia soluble en una solución en términos de su efecto osmótico.

Osmolaridad: La osmolaridad es una medida usada por farmacéuticos y médicos para expresar la concentración total (medida en ósmoles/litro) de sustancias en disoluciones usadas en medicina. El prefijo "osmo" indica la posible variación de la presión osmótica en las células, que se producirá al introducir la disolución en el organismo.

Así una disolución de NaCl 0.1M nos daría 0.1 moles de Na⁺ y 0.1 moles de Cl⁻ por litro, siendo su osmolaridad 0.2. Si se inyecta esa disolución a un paciente sus células absorberían agua hasta que se alcanzase el equilibrio, provocando una variación en la presión sanguínea. La osmolaridad se expresa en miliosmoles sobre litro y establece la resistencia del sistema al desplazamiento. Para calcularla se emplea la fórmula:

$$\text{mOsmol} = \frac{\text{g / litro de solución}}{\text{PM del soluto}} \times 1000 \times \# \text{ de iones}$$

La osmolaridad del plasma del cuerpo humano es de 306 miliosmoles sobre litro. La tonicidad, como ya hemos visto está relacionada con la osmolaridad por lo que es importante que ésta última se mantenga en equilibrio de modo que la tonicidad también se mantenga estable.

Cuando se piensa en osmolaridad en cuanto a inyectables, se consideran tres posibilidades:

- Hipoosmolaridad
- Isoosmolaridad
- Hiperosmolaridad

Hipo-osmótico: Cuando un fármaco inyectable es hipo-osmótico, su concentración de partículas en solución es menor que la concentración de partículas en solución del líquido existente en los tejidos. Como resultado, el líquido del fármaco se desplazará a lo largo

del tejido buscando equilibrar la concentración del área donde se aplicó la inyección. Este desplazamiento de líquido genera un aumento en la concentración del principio activo y por tanto, un aumento de la velocidad de absorción.

Iso-osmótico: En este caso, existe una misma concentración de partículas en el tejido y en el fármaco, en cuyo caso, no habrá desplazamiento de líquidos y la difusión del fármaco se mantendrá a un ritmo relativamente constante. Es importante establecer, que la isoosmolaridad se dará en algún momento, tanto en la inyección de hipo-osmóticos como de hiper-osmóticos debido a la tendencia constante al equilibrio. Tal tendencia al equilibrio implicará del mismo modo un desplazamiento de líquidos lejos del principio activo conforme su concentración en el líquido extracelular siga disminuyendo.

Hiper-osmótico: Cuando un fármaco inyectable es hiper-osmótico, su concentración de partículas en solución es mayor que la concentración de partículas en solución del líquido existente en los tejidos. Como resultado, el líquido del tejido se desplazará hacia la zona de la inyección buscando equilibrar la concentración. Este desplazamiento de líquido genera una disminución en la concentración del principio activo y por tanto, una disminución de la velocidad de absorción.

Es importante denotar que el término de isoosmolaridad no es equivalente al de isotonicidad. Estos pueden considerarse iguales únicamente cuando los líquidos y partículas disueltas en ambos lados de la membrana ejercen presiones osmóticas del mismo tipo.

Como ya se ha mencionado, es necesario que se mantenga un equilibrio entre los distintos compartimentos del organismo en cuanto a su osmolaridad y tonicidad. La osmolaridad se expresa en miliosmoles sobre litro y establece la resistencia del sistema.

Es importante buscar la isotonicidad en las soluciones administradas con la finalidad de restaurar y mantener el equilibrio. En estos casos, el factor a considerar será el que tan irritante puede ser el soluto o el vehículo para los vasos cercanos al sitio de administración, a fin de tomar las precauciones de controlar la velocidad de infusión y alternar su sitio. (Hernández Serrato. 2005),

2.3 Regulación de la osmolalidad sanguínea.

La osmolalidad del plasma sanguíneo se mantiene normalmente entre límites muy estrechos mediante diversos mecanismos reguladores. Por ejemplo cuando una persona se deshidrata, la sangre se concentra más al reducirse el volumen sanguíneo. El aumento de la osmolalidad sanguínea y de la presión osmótica estimula los osmorreceptores, que son neuronas situadas en el hipotálamo.

Como resultado del aumento de la estimulación de los osmorreceptores, la persona experimenta sed, y si dispone de agua la bebe. Una persona que esta deshidratada, bebe más y orina menos, esto representa un bucle de retroacción negativa que actúa para mantener la homeostasis de la concentración plasmática, y en este proceso ayuda a mantener el volumen sanguíneo adecuado. (Ira F. 2003.)

2.4 Fragilidad osmótica de de los eritrocitos

La membrana de los eritrocitos es de tipo semipermeable. Cuando estos son colocados en una solución hipertónica pierden líquido (y por tanto se enjutan y destruyen) hasta que se establece el equilibrio osmótico con el líquido circundante. Sin embargo cuando, son colocados en una solución hipotónica, captan líquido (hinchándose) hasta que alcanzan el equilibrio osmótico o hasta que se rompen. La ruptura de las células resulta de la alteración de su forma y disminución de su resistencia a las fuerzas osmóticas, más que a un cambio en la composición de la célula o su osmolaridad, de ahí que se emplee el término fragilidad.

Cuando la fragilidad osmótica es normal en los eritrocitos, estos se destruyen cuando están suspendidos en solución salina al 0.5 %; es decir se observa lisis en un 50% y la lisis completa al 0.35% en solución salina. Los eritrocitos también pueden ser destruidos con fármacos e infecciones [Figura 10]. La susceptibilidad de los glóbulos rojos a la hemólisis por estos agentes es mayor cuando hay deficiencia de la enzima deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (G6PD), que cataliza el paso inicial en la oxidación de la glucosa mediante la vía del monofosfato de hexosa; esto es debido a que la principal fuente intracelular de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), compuesto comprometido en diversos procesos fisiológicos por ejemplo la defensa antioxidante en los eritrocitos, la deficiencia de esta enzima puede provocar anemia hemolítica. (Lynch M. 1977.)

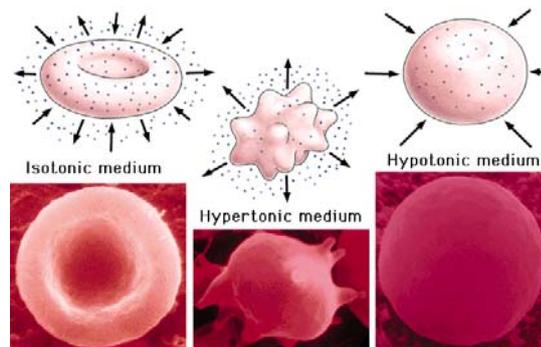


Figura 10: Representación de la fragilidad de eritrocito ante los medios hipotónico, isotónico e hipertónico.

2.5 Efectos de la hemólisis en un individuo

Como ya hemos mencionado la hemólisis es la pérdida de la integridad de la membrana de los glóbulos rojos lo cual quiere decir que se libera el contenido celular en el plasma del individuo; dentro de este contenido celular se encuentra la hemoglobina y como resultado hay un incremento en la concentración de la misma lo cual puede llegar a causar varios problemas

Los síntomas se han visto comúnmente en los pacientes con hemólisis son, escalofríos, fiebre, dolor en el abdomen y espalda, respiración entrecortada, postración y shock. La severidad de los síntomas producidos por la hemólisis están directamente relacionados con la concentración de hemoglobina libre en el torrente sanguíneo y la habilidad del cuerpo para eliminar esta hemoglobina.

Cuando la hemoglobina es liberada en el plasma, esta se une a haptoglobina, una proteína del plasma que se une a hemoglobina libre, formando un complejo soluble. Este complejo soluble es eliminado del plasma por las células del retículo endotelial del hígado, bazo y medula espinal; en estas células los grupos hemo, son convertidos a bilirrubina, que es transportada al hígado después de unirse a albúmina plasmática. En el hígado la bilirrubina es concentrada y conjugada en forma de diglucuronido de bilirrubina, el cual después es eliminado por el cuerpo. La conversión del grupo hemo a diglucuronido de bilirrubina se muestra en la Figura 11.

El complejo hemoglobina-haptoglobina y el hemo-hemopexina, con los fragmentos de la membrana de los glóbulos rojos, causa que las células del retículo endotelial del bazo se congestionen. Esto puede causar esplenomegalia, incremento del tamaño del bazo, lo cual produce la destrucción prematura de los eritrocitos y el hiperesplenismo.

Es claro que la hemólisis puede causar condiciones médicas indeseables. Cuando la hemólisis es baja, usualmente estas condiciones son reversibles. Sin embargo si la hemólisis es elevada puede causar la muerte. Desde que la hemólisis se considero nociva para los pacientes en tratamiento, es importante tratar de minimizarla. El uso de métodos in Vitro para evaluar la capacidad de la formulación para producir esta condición, es pues un componente importante de la formulación intravenosa en desarrollo. (Gupta K. 1999).

3. Métodos In Vitro para evaluar la hemólisis de inyectables

En 1936 Wokes desarrollo un método hemolítico para evaluar la isotonicidad de soluciones de administración parenteral; él determino que todas las soluciones isotónicas probadas fueron no hemolíticas excepto las soluciones preparadas con ácido bórico; ya que este inducía hemólisis en todas las contracciones desde el 0.5 al 5 por ciento.

Para 1942 Husa y Rossi resumieron varios cálculos y métodos experimentales para la preparación de soluciones isotónicas, ellos determinaron que al 1.8 % de ácido bórico debería ser una solución isotónica con los glóbulos rojos, ya que la presión osmótica es la misma que la de la sangre; sin embargo los resultados sugirieron que las soluciones iso-osmóticas no son siempre isotónicas con los glóbulos rojos. Esto fue atribuido al hecho de que la presión osmótica de una solución es dependiente de la concentración total de partículas disueltas en esta, mientras que la tonicidad de una solución solo depende de la concentración total de partículas disueltas que no pasan o alteran la membrana.

La incapacidad de algunas soluciones iso-osmoticas para prevenir la hemólisis fue demostrada por Hammarlund y Pedersen-Bjergaard en 1961 quienes estudiaron los grados de hemólisis inducidos por 161 soluciones farmacéuticas; ellos demostraron que 71 de esas soluciones inducían una cantidad de hemólisis variable.

Algunos investigadores han usado métodos in Vitro para evaluar los efectos de la hemólisis de soluciones preparadas con los mas comunes excipientes farmacéuticos, tales como, aminoácidos, azúcares, sales, cosolventes, surfactantes y agentes complejantes. En 1983, Hamburger desarrollo un método hemolítico para el estudio de la permeabilidad de los glóbulos rojos. El determino que las soluciones parenterales deben de tener la misma presión osmótica que el fluido intracelular de los eritrocitos para que este sea isotónico.

En general, los métodos estáticos determinan la hemólisis después de incubar un predeterminado volumen de la formulación con la sangre por un determinado tiempo. El volumen de la formulación que es mezclado con el volumen de sangre es determinado por la relación formulación-sangre. Mientras que el tiempo de contacto, es determinado, por cuanto tiempo están los dos líquidos en incubación.

En el caso de los métodos dinámicos, la hemólisis es determinada después de inyectar un volumen de formulación dentro de un sistema, el cual presenta un flujo de sangre constante con disminución de la hemólisis en un tiempo de contacto predeterminado, con un volumen grande de solución salina fisiológica. El tiempo de contacto es determinado por la velocidad mezcla formulación-sangre y el volumen de mezcla que presenta el tubo. (Gupta K. 1999)

3.1 Método estático

Los métodos estáticos son comúnmente usados en la determinación del potencial hemolítico de excipientes utilizados en formulaciones parenterales, desde que se conoce que algunas formulaciones inducen hemólisis, los métodos estáticos han sido usados para evaluar la habilidad de “agentes protectores” para disminuir el grado de hemólisis inducido por dichas formulaciones.

En algunos estudios ha sido estudiado el comportamiento de la disminución de la hemólisis con la adición de cloruro de sodio a la formulación. En algunos casos, el efecto hemolítico de la solución disminuye y en algunas veces ha desaparecido cuando el cloruro de sodio se ha adicionado.

Los métodos estáticos han sido usados para determinar en rango del potencial hemolítico en excipientes usados en las formulaciones. (Gupta K. 1999)

3.2 Método dinámico

Los métodos dinámicos son muy usados en la evaluación del grado de hemólisis que ocurre después de la administración intravenosa. En el desarrollo de dicho método, se considera la dinámica del sitio de inyección, cuando la formulación contiene una concentración inicial y es inyectado dentro de la vena, la formulación es rápidamente mezclada con la sangre, resultando una disminución de la concentración del principio activo y del vehículo. La concentración de estos componentes en la sangre inmediatamente después de la inyección es dependiente de la concentración en la formulación y de la relación con la proporción de la inyección; así como con el flujo de sangre y el sitio de inyección [Figura 12].

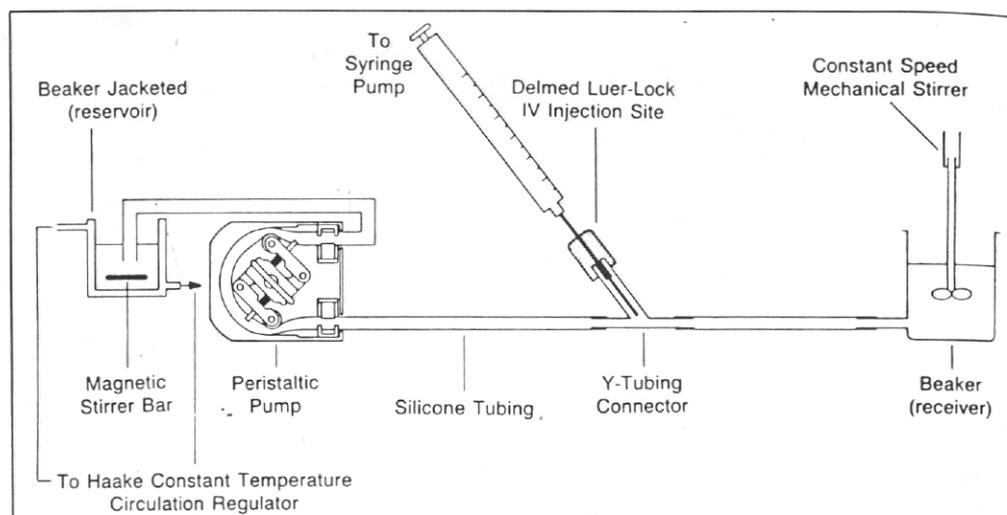


Figura 12: Esquema de un sistema dinámico en el cual se incluyen las variables de velocidad de flujo y de inyección. (Obeng E. 1989.)

La dinámica de una inyección intravenosa es responsable del efecto de la composición de la formulación de la inyección y del rango de hemólisis. La hemólisis también es dependiente de la naturaleza hemolítica del principio activo y de los componentes del vehículo en la formulación, su concentración es diluida inicialmente con la sangre en el sitio de inyección. La dilución inicial de la formulación con la sangre esta descrita como una relación entre formulación-proporción de sangre. Si la relación de la formulación con la sangre disminuye con el incremento de la dilución, entonces la proporción de la hemólisis disminuye hasta que la formulación es lo suficientemente diluida hasta volverse no hemolítica. El tiempo de contacto entre formulación-sangre es

usado para identificar el tiempo requerido para que la formulación deje de ser hemolítica.

Los métodos in Vitro intentan evaluar la hemólisis intravascular usando la relación de formulación-sangre en la cual es simulado el tiempo de contacto junto con la interacción en la cual la formulación es diluida con la sangre seguido de una inyección intravenosa. (Gupta K. 1999)

4. Potencial hemolítico de excipientes para inyectables

4.1 ¿Que es el potencial hemolítico?

El potencial hemolítico es el porcentaje de hemólisis que puede producir un excipiente, vehiculo o formulación, la cual se va a someter a la prueba de hemólisis, para determinar el daño que puede producir a nivel hemolítico. Esta basado en un método estándar el cual se mide la absorbancia de la hemoglobina liberada por los eritrocitos a 540 nm, ya que esta es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina en el sobrenadante. (Obeng E. 1989.)

El porcentaje de hemólisis es calculado de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{HEMOLISIS} = \frac{At - As}{Ac} \times 100$$

Donde:

At = Absorbancia del sobrenadante obtenido de la muestra de prueba (Inyectable)

As= Absorbancia del sobrenadante obtenidos de la solución salina fisiológica SSF. (NaCl 0.9%)

Ac= Absorbancia de la solución de hemoglobina obtenida de la lisis completa de las células

4.2 Excipientes empleados en la formulación de inyectables

Para el desarrollo de formulaciones parenterales existe toda una gama de diferentes excipientes los cuales son empleados para mejorar las formulaciones y a continuación se mencionan los más comunes:

Cosolventes: Hay aproximadamente 20 diferentes cosolventes usados en las formulaciones parenterales como lo son el etanol, glicerina, propilenglicol, sorbitol, polietilenglicol, dimetilacetamida. Se conoce que este tipo de cosolventes causan hemólisis; a algunos de estos ya se les han realizado estudios comparando los efectos hemolíticos.

Surfactantes: Los surfactantes tienen una gran variedad de funciones en formulaciones parenterales. Entre los más importantes están los estabilizadores de proteínas contra la agregación, un ejemplo de esto es el Tween 20, ayuda a reducir la formación de agregados insolubles. En el caso del Tween 80 ayuda a la protección de proteínas para evitar la desnaturalización, además se ha comprobado que disminuye la agregación de hemoglobina

Buffers: Algunos de los buffers en soluciones parenterales pueden llegar a ocasionar problemas de estabilidad como es el buffer de fosfatos, particularmente el anion de fosfato dibásico; sin embargo en caso de ser necesario se emplean los buffers algunos ejemplos son: citratos, glicinatos, maleatos y tartratos y estos no catalizan la degradación del principio activo.

Antioxidantes: Es una agente cuya intervención frena la degradación por oxidación y asegura un retraso en el envejecimiento de los productos, aumentando su duración, por ejemplo el ácido ascórbico ha sido reportado como un antioxidante incompatible con algunos principios activos como la penicilina G. Otros como el bisulfito de sodio y el metabisulfito de sodio son fuertemente antioxidantes nucleofílicos.

Preservativos antimicrobianos: Son algunas moléculas que ayudan a mantener el sistema libre de bacterias, uno de los más comunes es el alcohol bencilico, cloruro de benzalconio, etc. Sin embargo hay que valorar si estos no interaccionan con el principio activo y llegaran a afectar la estabilidad del mismo. (Akers J. 2002)

4.3 Excipientes en los cuales se ha evaluado la hemólisis

Previamente ya se han reportado resultados que nos muestran un método hemolítico estándar para determinar si la isotonicidad es inadecuada de las mezclas de cosolventes usadas en vehículos para inyectables. Los cosolventes son comúnmente empleados en formulaciones intravenosas para incrementar la pobre solubilidad en agua de algunos principios activos. Cuando usamos cosolventes es un riesgo debido a la lisis

de los glóbulos rojos con las consecuencias que tiene que la hemoglobina y otros componentes celulares estén en el torrente sanguíneo.

Cuando se descubrió un método in Vitro para evaluar la hemólisis intravascular comenzaron a estudiar algunos de los excipientes que forman parte de la formulaciones parenterales, debido a la importancia que tiene el poder administrar inyectables seguros.

- Reed y Yalkowsky (1985) evaluaron el potencial hemolítico de algunos cosolventes y determinaron que el dimetil sulfoxido es mas hemolítico que el propilenglicol puro y que es seguido por el vehiculo que contiene 10 por ciento de etanol y 40 por ciento de propilenglicol, seguido del etanol puro, polietilenglicol 400, dimetil acetamida y dimetil isosorbida.
- Osnishi y Sagitani (1993) Evaluaron el efecto hemolitico de surfactantes no iónicos y determinar la respuesta hemolítica de la relación entre: polioxietilen oleil ether (20), es el más hemolitico seguido del monoesterato de polioxietilen (40), al aceite de castor hidrogenado.
- En el estudio de Rajewski (1995) ellos evaluaron las ciclodextrinas y determinaron que la mas hemolítica es la β -ciclodextrina; mientras que los derivados de la sulfobutyleter- β -ciclodextrina presentaron una menos hemólisis. (Gupta K. 1999)

IV. Desarrollo experimental

1. Cuadro metodológico

Diagrama del desarrollo del método.

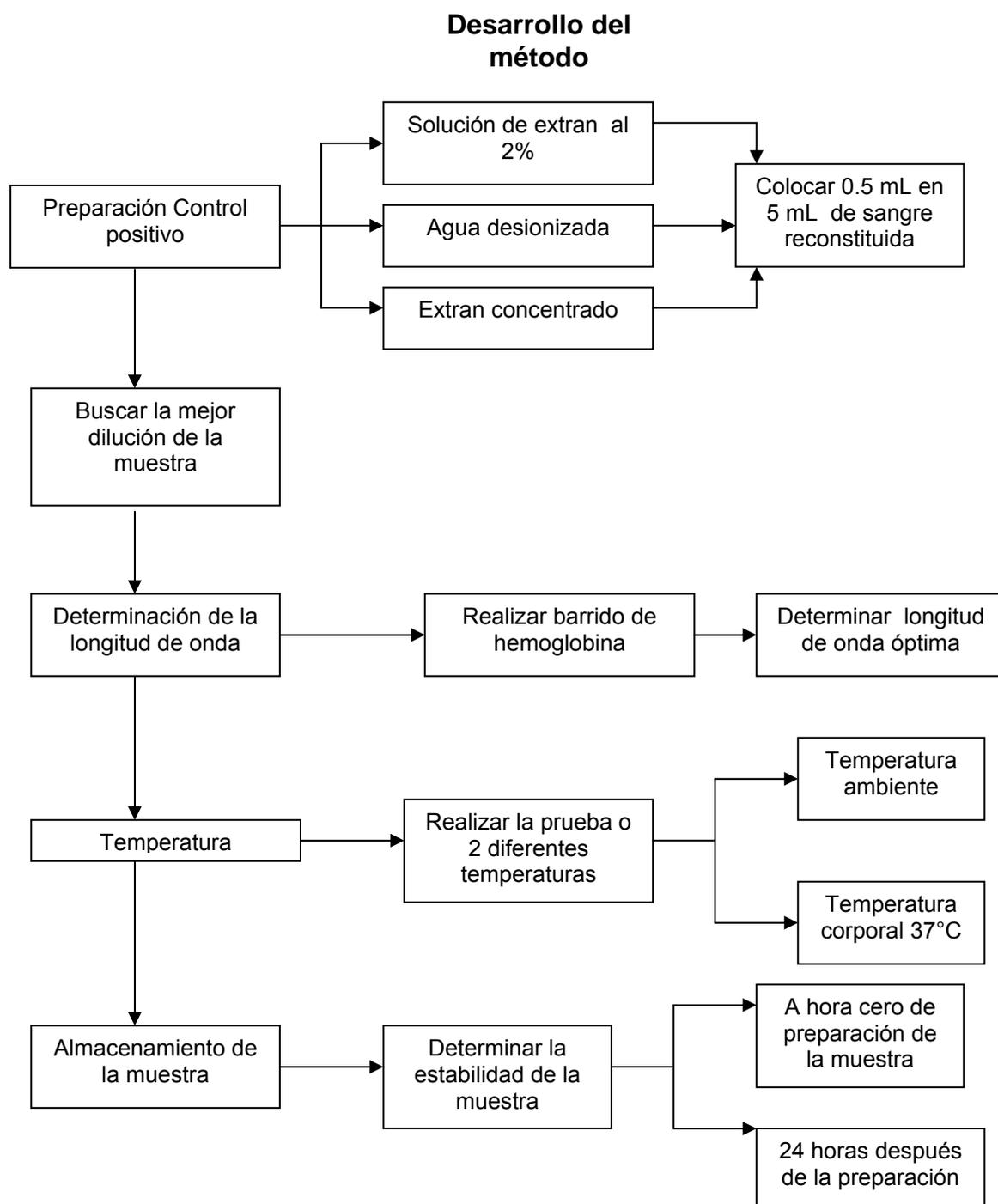
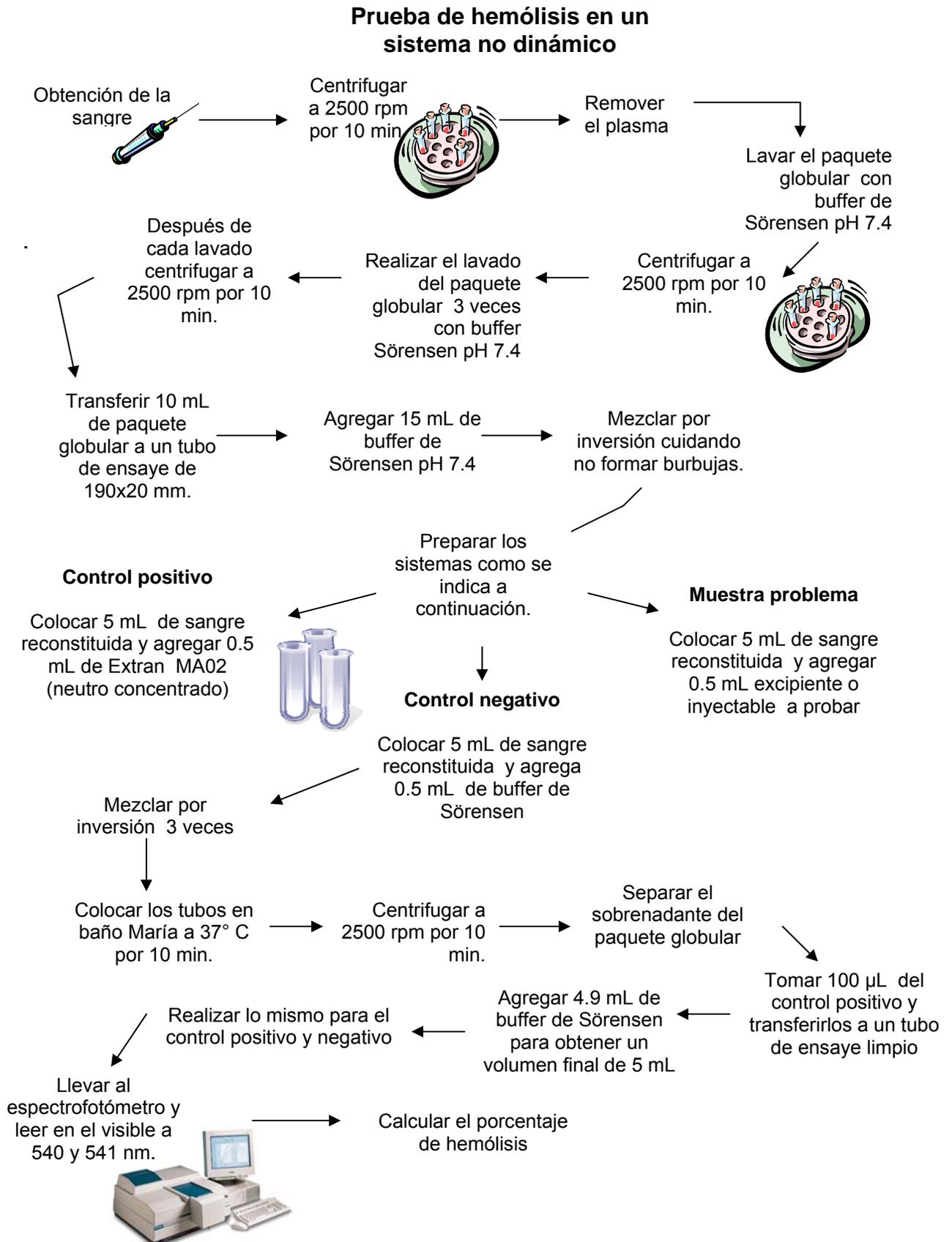


Diagrama del aplicación del método.



2. Materiales y métodos

Reactivos

- Fosfato de sodio dibásico. J. T. Baker
- Fosfato de sodio monobásico. J. T. Baker
- Cloruro sodio. Fermont
- Alcohol bencílico
- Propilenglicol
- Metabisulfito
- Alcohol etílico
- EDTA (Acido etilendiamotetracético)
- Extran. MA 02 Neutro concentrado
- Lisina
- Bicarbonato de sodio J. T. Baker
- Carbonato de sodio. J. T. Baker
- Buffer de Sörensen pH 7.4
- Buffer de Carbonatos pH 10
- Sangre de humano

Equipo

- Espectrofotómetro Cary 100 Conc UV – Visible. Varian
- Centrifuga Damon/IEC Division
- Micropipeta finnpipette de 20-200 µL
- Micropipeta finnpipette de 1-5 mL
- Baño de agua Thelco

Material de vidrio

- Tubos para centrifuga de vidrio
- Tubo de ensaye de 190 X 20 mm
- Matraz volumétrico de 1 L clase A
- Matraz volumétrico de 25 mL clase A
- Vaso de precipitados de 250 mL
- Vaso de precipitados de 100 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipeta volumétrica de 0.5 mL clase A

3. Optimización del método

3.1 Condiciones de estudio

- Sangre de humano
- Temperatura ambiente y a 37°

3.2 Fuentes de variación del método

- Preparación del control positivo.

Para poder obtener el control positivo se vario la cantidad de un agente tensoactivo el cual al hacer contacto con la membrana de los eritrocito se produzca una hemólisis total del paquete globular, por lo cual se probaron tres diferentes niveles de concentración de tensoactivo, quedando de la siguiente manera.

- Extran concentrado
- Extran al 2%
- Agua desionizada
- Dilución empleada para el sobrenadante
- Selección de la longitud de onda para medir la hemoglobina
 - 540 nm. Longitud de onda reportado en la literatura
 - Punto máximo de absorción. Longitud de onda reportada con el espectrofotómetro Cary 100 conc. Varian.
- Tiempo de almacenamiento de las muestras
 - Tiempo cero
 - 24 horas después
- Temperatura
 - Temperatura ambiente: no se controlo la temperatura
 - 37°C: temperatura corporal, por medio de un baño de agua.

3.3 Plan de experiencias

Determinación de las condiciones óptimas del método de hemólisis

Factor de estudio	Nivel del Factor
Concentración de Extran (%)	100
	2
	0
Dilución sobrenadante (μl)	500
	100
Longitud de onda (nm)	541
	540
Tiempo de almacenamiento de la muestra (horas)	24
	0
Temperatura de la muestra (°C)	Ambiente
	37

Tabla 1: Plan de experiencias para la optimización del método

4. Aplicación del método

4.1 Condiciones de estudio

- Sangre de humano
- Temperatura 37°
- Leer a 541 nm en espectrofotómetro Cary 100 Conc UV – Visible. Varian

4.2 Fuentes de variación en la aplicación del método

- Un inyectable
- Propilenglicol
- Propilenglicol + NaCl
- Propilenglicol + buffer de fosfatos
- Alcohol bencílico
- Etanol
- Metabisulfito de sodio
- EDTA
- Buffer de carbonatos
- Lisina

4.3 Respuesta

La respuesta que se obtuvo es el porcentaje de hemólisis (potencial hemolítico) de cada uno de los excipientes en relación con la proporción que lleva cada uno en una posible formulación, con el fin de identificar cual de ellos produce una mayor hemólisis.

$$\% \text{HEMOLISIS} = \frac{At - As}{Ac} \times 100$$

At = Absorbancia del sobrenadante obtenido de la muestra de prueba (Inyectable)

As= Absorbancia del sobrenadante obtenidos de la SSF (NaCl 0.9%)

Ac= Absorbancia de la solución de hemoglobina obtenida de la lisis completa de las células

4.4 Plan de experiencias

- Determinación del potencial hemolítico de los excipientes

Numero de ensayo	Factor (Excipientes)
1	Propilenglicol
2	Propilenglicol + Buffer de fosfatos
3	Propilenglicol + NaCl
4	Alcohol bencílico
5	Etanol
6	Metabisulfito de sodio
7	EDTA
8	Buffer de carbonatos
9	Lisina
10	Inyectable

Tabla 2: Plan de experiencias para determinar el potencial hemolítico de 9 excipientes y 1 inyectable

V. Resultados y Análisis

- *Preparación del control negativo*

En la optimización del método para evaluar la hemólisis se prepararon dos controles, el negativo a hemólisis en el cual se colocaron los eritrocitos en buffer de Sörensen, este tiene la característica de ser isotónico y tiene un pH de 7.4; en este medio los eritrocitos no sufren de hemólisis debido a que las condiciones en las cuales están en sangre son similares.

En el caso del control positivo debe haber una ruptura de los eritrocitos al cien por ciento, para que la hemoglobina contenida en las células sea liberada por completo y podamos referir al 100 por ciento de hemólisis.

Se ha reportado el uso de agua desionizada para producir la hemólisis, esto es debido a que esta agua carece de iones (medio hipotónico), al haber una carencia de iones en el medio donde se encuentran los glóbulos rojos el agua difunde al interior de la célula produciendo la ruptura de la membrana del eritrocito (Ku SH., Cadwallader D. 1974); otros han reportado que generan su control positivo con una solución de saponinas al 2%, la cual tiene una actividad tensoactiva parecida a la del jabón, esta al producir un cambio en la tensión superficial de la membrana del glóbulo rojo produce la ruptura de las membranas y por consecuencia la liberación de la hemoglobina. (Obeng, E.)

En este caso se probó el agua desionizada y como agente tensoactivo el Extran MAO2 neutro en dos concentraciones, al 2% como sugiere Obeng E. y concentrado. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con cada uno en donde se puede ver que el agua desionizada no produce la suficiente hemólisis comparada con la producida por el extran. En el caso del agente tensoactivo se produce la hemólisis debido al cambio que sufren los eritrocitos en su membrana provocando que estos estallen, y aunque el extran al 2% produce una hemólisis, esta no es total como la obtenida con el extran concentrado.

Factor de estudio	Concentración de extran		
Nivel de factor	Concentrado 100%	Diluido (2 %)	Agua desionizada
Hemólisis			

Tabla 3: Resultados de los controles positivos a hemólisis en los cuales se observa una hemólisis completa producida por el extran concentrado. En el caso del extran diluido y el agua desionizada no es suficiente las condiciones para asegurar la ruptura completa.

- *Dilución del sobrenadante*

La dilución del sobrenadante es necesaria debido a que la cantidad de hemoglobina liberada en el control positivo es completa, se probaron dos diluciones:

- 500 μ L en 5 mL
- 100 μ L en 5 mL

En la cual se determinó que la dilución más adecuada es la de 100 μ L en 5 mL ya que en esta se obtuvo un mejor espectro de absorción [Figura 13] que en la dilución 500 μ L en 5 mL en la cual la señal ya no es confiable debido a que ya no se ve bien definido el espectro de absorción de la hemoglobina y en esta dilución la respuesta ya no sería confiable para reportar los resultados.

- *Determinación de la longitud de onda*

La longitud de onda óptima es otro parámetro que se determinó, para esto se realizó un barrido de la hemoglobina en la cual se determinó que el punto máximo de absorción se encuentra a 541 nm para la hemoglobina; ya que la señal que está a 440 nm es producida únicamente por el grupo hemo, el cual es una fracción de la hemoglobina y no la hemoglobina completa.

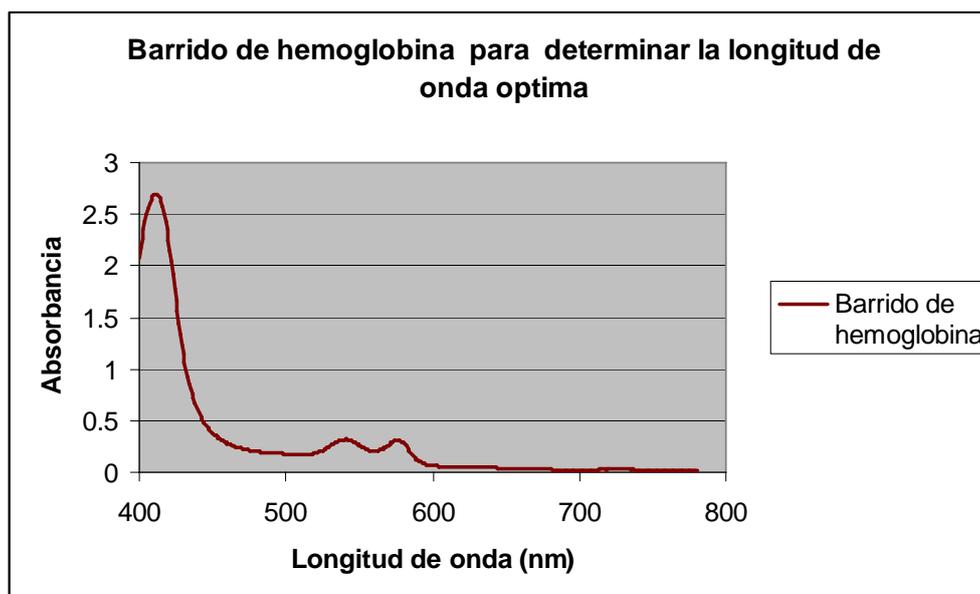


Figura 13: Grafica del barrido de la hemoglobina en el espectro del visible, en el cual se determino que el máximo de absorción es a 541 nm.

En la tabla 4 se muestra la comparación de resultados de las absorbancias a las longitudes de onda de 540 y 541 nm en esta tabla se muestran los coeficientes de variación en donde para el control positivo son de 5.18 a 540 nm y a 541 nm es de 5.29; en el caso del control negativo el coeficiente de variación es de 13.79 a 540 nm y de 7.1 a 541 nm este es muy elevado lo cual indica que entre las muestras existe una variación grande, sin embargo en métodos biológicos es aceptado hasta un coeficiente de variación de 15.

Numero de ensayo	Control positivo Absorbancia (nm)		Control negativo Absorbancia (nm)	
	540 nm	541 nm	540 nm	541 nm
1	1.6086	1.6170	0.0065	0.0063
2	1.6888	1.6814	0.0068	0.0068
3	1.7840	1.7945	0.0052	0.0059
Promedio	1.6938	1.6976	0.0062	0.0063
Desvest	0.0878	0.0899	0.0009	0.0005
CV	5.1840	5.2930	13.7917	7.1199

Tabla 4: Comparación de los resultados obtenidos en las dos longitudes de onda, para el control negativo así como para el positivo.

Al realizar el análisis de varianza del control positivo dio como resultado que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las dos longitudes onda, lo cual indica que el valor teórico reportado de 540 nm es correcto y que la longitud de onda del punto máximo de absorción no difiere estadísticamente con el valor teórico esto se puede ver en la tabla 5.

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de las medias	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	0.0000220417	1	0.0000220417	0.0	0.9604
Dentro del grupo	0.0315685	4	0.00789212		
Total (Corr)	0.0315905	5			

Tabla 5: Análisis de varianza del control positivo a 540 y 541 nm.

Se puede ver de manera representativa en la Figura 14 en la comparación de las medias con un intervalo de confianza del 95%, en la cual se puede observar un traslape casi completo en las dos longitudes de onda lo cual indica que no hay diferencias al usar 540 o 541 nm respectivamente.

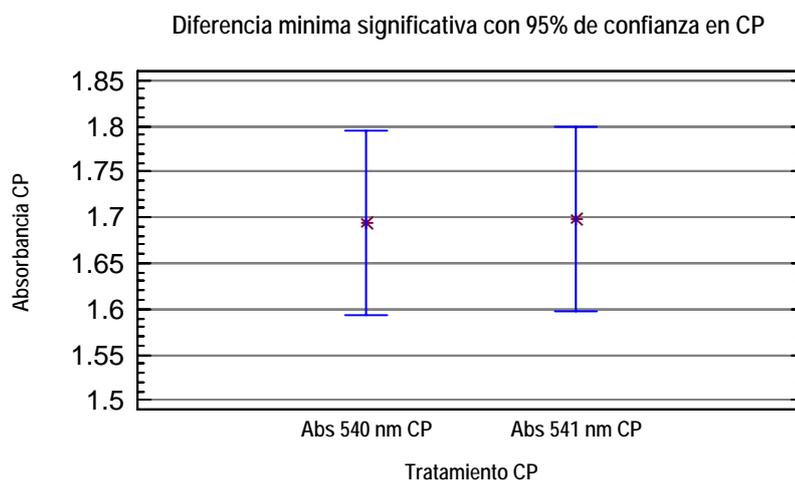


Figura 14: Diferencia mínima significativa con un intervalo de confianza de 95%, en el caso de los controles positivos no hay diferencia a las dos longitudes de onda.

Para el control negativo de igual manera se realizó un análisis de varianza donde no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre las longitudes de onda para el control negativo. [Tabla 6]. En la Figura 15 esto se puede ver de manera más representativa debido a que hay un traslape el cual nos indica que no hay diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95%.

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de las medias	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	4.16667E-8	1	4.16667E-8	0.09	0.7792
Dentro del grupo	0.00000185333	4	4.63333E-7		
Total (Corr)	0.000001895	5			

Tabla 6: Análisis de varianza del control negativo a 540 y 541 nm.

Para la elección de la longitud de onda óptima solo se confirma la reportada por la literatura, ya que aunque experimentalmente el punto máximo de absorción es a 541 nm, al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas con respecto a 540 nm, por lo tanto en las muestras en las que se vaya a determinar el porcentaje de hemólisis tampoco se verá influenciado y es correcto realizar las lecturas de absorbancia a 541 nm como longitud de onda óptima reportada por el equipo en el que se trabajó y por supuesto a la teórica reportada que es a 540 nm.

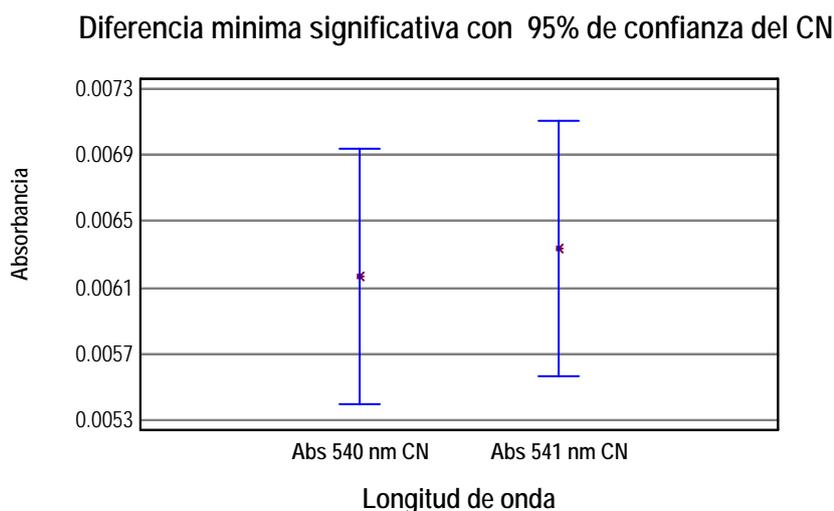


Figura 15: Diferencia mínima significativa con un intervalo de confianza de 95% para el control negativo donde se muestra que no hay diferencia en las dos longitudes de onda.

- Temperatura de la muestra

Al evaluar la influencia de la temperatura sobre los controles positivo y negativo, con la finalidad de determinar si hay diferencia entre trabajar las muestras a temperatura ambiente y trabajar a 37° C. En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en cada ensayo con un coeficiente de variación de 5.13 para el control positivo a temperatura ambiente y de 1.71 a 37° C; y en el caso del control negativo su coeficiente de variación para temperatura ambiente es de 5.80 y a 37° C es 3.26.

Numero de ensayo	Control positivo		Control negativo	
	Ambiente	37°	Ambiente	37°
1	1.2967	1.3809	0.0022	0.0018
2	1.3942	1.4266	0.0017	0.0017
3	1.2642	1.3914	0.0021	0.0017
Promedio	1.31	1.39	0.0020	0.0017
Desvest	0.067	0.027	0.0004	5.77E-05
CV	5.13	1.71	5.80	3.26

Tabla 7: Comparación de los resultados obtenidos en las dos temperaturas, para el control negativo y como para el positivo a la longitud de onda de 541 nm

Para determinar si hay diferencias significativas entre los grupos se realizó un análisis de varianza. En el caso del control positivo estadísticamente no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre trabajar el control positivo a temperatura de 37° y trabajar a temperatura ambiente. [Tabla 8].

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de las medias	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	0.00990641	1	0.00990641	3.85	0.1214
Dentro del grupo	0.0103001	4	0.00257502		
Total (Corr)	0.0202065	5			

Tabla 8: Análisis de varianza del control positivo a temperatura ambiente y a 37° C

En la Figura 16 se muestra la comparación de medias con un intervalo de confianza del 95% por lo tanto no hay diferencia significativa, ya que hay un traslape entre las dos temperaturas, esto indica que al trabajar el control positivo no hay diferencia entre ambas temperaturas y se puede trabajar a 37° C como esta reportado en la literatura y también a temperatura ambiente demostrando que el control positivo no se va a ver influenciado por la temperatura.

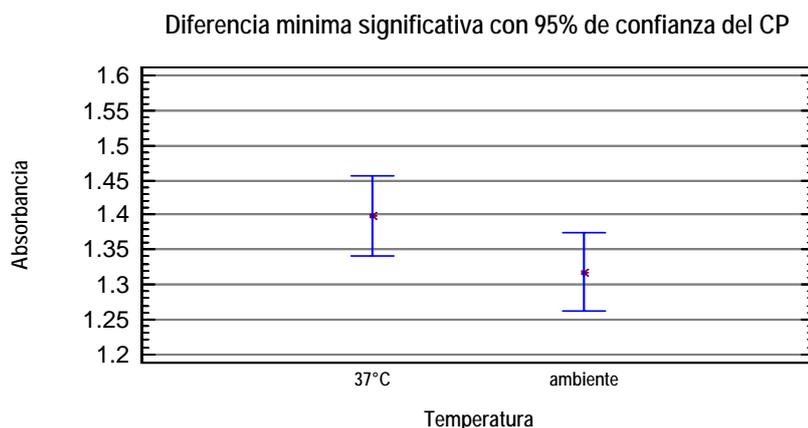


Figura 16: Diferencia mínima significativa con un intervalo de confianza del 95% en el caso del control positivo no hay diferencias entre las temperaturas

En el caso del control negativo se realizó un análisis de varianza en el cual estadísticamente no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) que influyeran en el control negativo; sin embargo en la tabla 7 se puede ver que a temperatura de 37° existe una menor variación que a temperatura ambiente, esto es debido a que la temperatura a la que se encuentra la sangre es de 37° C. En la figura 17 se puede en la comparación de las medias que no hay diferencia mínima significativa con un intervalo de confianza del 95%; sin embargo habría que tomar en cuenta el realizar la prueba a 37° C

	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado de las medias	F-Ratio	P-Value
Entre grupos	1.66667E-7	1	1.66667E-7	5.88	0.0723
Dentro del grupo	1.13333E-7	4	2.83333E-8		
Total (Corr)	2.8E-7	5			

Tabla 9: Análisis de varianza del control negativo a temperatura ambiente y a 37°C

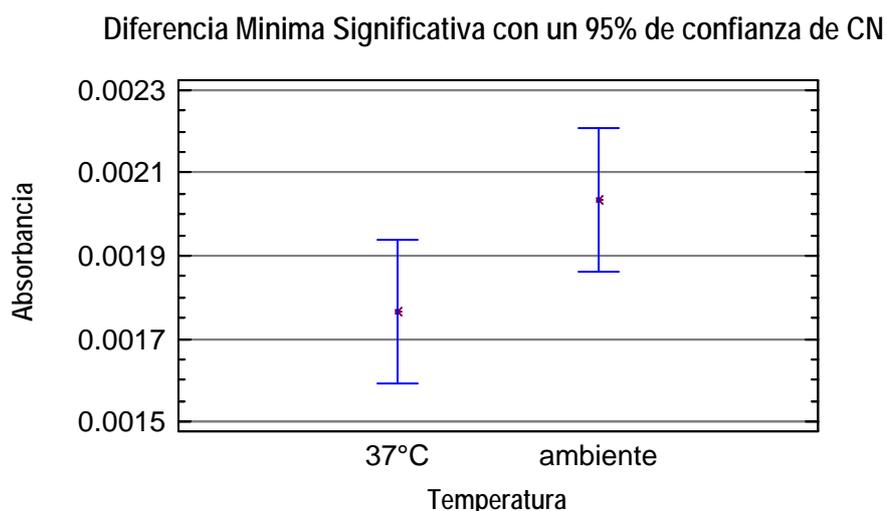


Figura 17: Diferencia mínima significativa con un intervalo de confianza del 95% en el caso del control negativo no hay diferencias entre las temperaturas.

En la optimización del método se tomaron en cuenta dos temperaturas de trabajo: 37°C y la temperatura ambiente en las cuales estadísticamente el control positivo y el negativo no tuvieron diferencias significativas en cuanto trabajar las muestras a temperatura ambiente y a 37°C sin embargo en el control negativo se observa que la variación disminuye al tener las muestras a la temperatura de 37°C.

- **Tiempo de almacenamiento**

El tiempo de almacenamiento es muy importante debido a que la hemoglobina puede sufrir con facilidad oxidaciones, además de que es preferible que las muestras biológicas no se almacenen por mucho tiempo. En este caso el tiempo que transcurre entre la preparación de la muestra y la lectura en el espectrofotómetro fue de 24 horas en la cual se puede ver que hay disminución del porcentaje de hemólisis del 13% al 9%, hay una disminución de la hemólisis con respecto al tiempo en el cual se tenga almacenada la muestra esto se puede apreciar por el cambio notorio en la muestra, ya que esta se torna color café [Tabla 10].

Factor de estudio	Nivel de estudio	Hemólisis (%)	Imagen
Tiempo de almacenamiento de la muestra	Cero horas	13	
	24 horas	9	

Tabla 10: Resultados del almacenamiento de la muestra a cero horas y 24 horas después de la preparación de la muestra.

- **Resultados de la determinación del potencial hemolítico**

Dentro de la formulación de inyectables para administración intravenosa se tienen que tomar en cuenta que las soluciones sean isotónicas [Figura 18], ya que si esta produce hemólisis puede llegar a causar algunos problemas en los pacientes, en el caso de este método es para desde preformulación hasta el control de calidad del producto terminado, esto es con el fin de ayudar al formulador a elegir los excipientes a utilizar al momento de formular.

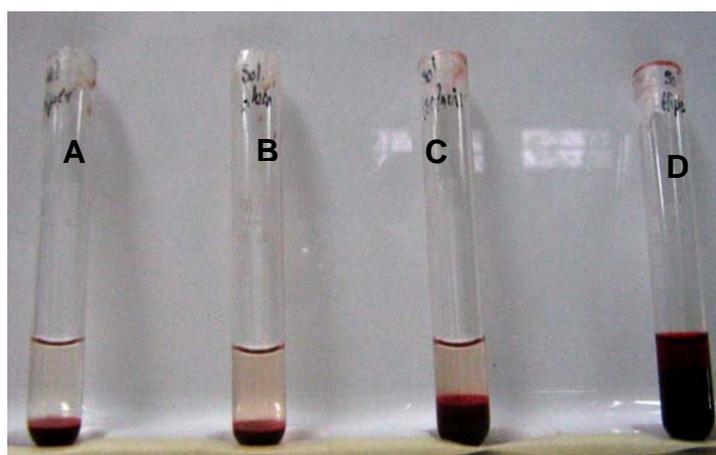


Figura 18: Prueba de hemólisis representando las cuatro variantes. A) Solución hipertónica de NaCl 1.5%, B) Solución isotónica de NaCl al 0.9%, C) Solución salina isotónica glucosada al 5% y D) Solución hipotónica de NaCl al 0.2%.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para los excipientes evaluados, en donde podemos observar que el alcohol bencílico es el que produce una mayor hemólisis, es empleado como preservativo antimicrobiano y anestésico local en formulaciones parenterales en una proporción de 2 a 3% v/v.

En el caso del propilenglicol produce una hemólisis 3.62% a una concentración de 60% v/v y aunque esta es relativamente baja, si a este se le adiciona el buffer de Sørensen el cual contiene sales de fosfato y cloruro de sodio y además es isotónico el porcentaje de hemólisis se ve reducido casi en un 50%; así como cuando se le adiciona cloruro de sodio en la proporción en la que se preparan las soluciones isotónicas (0.9%), la hemólisis también disminuye considerablemente permitiendo mejorar la isotonicidad del inyectable en desarrollo, permitiéndonos disminuir el porcentaje de hemólisis, aun utilizando la proporción mas alta del cosolvente que en este caso se emplea desde un 10 a un 60% v/v de propilenglicol en las formulaciones parenterales.

El etanol no produce hemólisis al igual que las sales que se adicionan como lo es el EDTA el cual es un agente quelante y el metabisulfito de sodio que es un antioxidante lo cual indica que el adicionar estos excipientes no influyen en la producción de hemólisis por inyectables, si no que al ser sales ayudan a obtener soluciones isotónicas.

Numero de ensayo	1	2	3	4	5	6	7
Factor Excipientes	Propilenglicol	Propilenglicol + NaCl	Propilenglicol + Buffer Sørensen	Alcohol bencílico	Etanol	Metabisulfito de sodio	EDTA
Potencial hemolítico	3.62	0.91	1.98	20.3	0.09	0.04	0.09
Imagen							

Tabla 11: Resultados de la prueba de hemólisis a excipientes comúnmente empleados en formulaciones parenterales.

Otros excipientes que son comúnmente empleados son los buffers, en este caso se probaron dos, el buffer de carbonatos pH 9 y el de Sörensen pH 7.4 los cuales no producen hemólisis, también se evaluó un aminoácido (Lisina); estos en algunas ocasiones se pueden adicionar a la formulaciones parenterales, en este caso la lisina no produce hemólisis.

Finalmente se evaluó un inyectable que en la actualidad se encuentra en el mercado [Firac®], se eligió este debido a que es un potente analgésico (clonixinato de lisina) el cual tiene como característica principal que el principio activo es irritante, sin embargo al realizarle la prueba se encontró que no produce hemólisis, esto puede ser debido al empleo de agentes protectores como el NaCl el cual ayuda a disminuir la hemólisis, es decir depende de la formulación para que un inyectable pueda producir o no la hemólisis. [Tabla 12].

Numero de ensayo	8	9	10	11
Factor (Excipientes)	Buffer Carbonatos pH 9	Lisina	Buffer de Sörensen pH 7.4	Inyectable Firac®
Potencial Hemolítico	0.02	0.07	0.01	0.33
Potencial hemolítico				

Tabla 12: Resultados de la prueba de hemólisis de excipientes y un inyectable.

En la figura 19 se muestran como se ve visualmente la prueba de hemólisis en donde el inyectable Firac® no presenta hemólisis así como también se muestra el control positivo el cual es preparado con buffer de Sörensen y el control negativo el cual ejemplifica un cien por ciento de hemólisis producida con un agente tensoactivo.

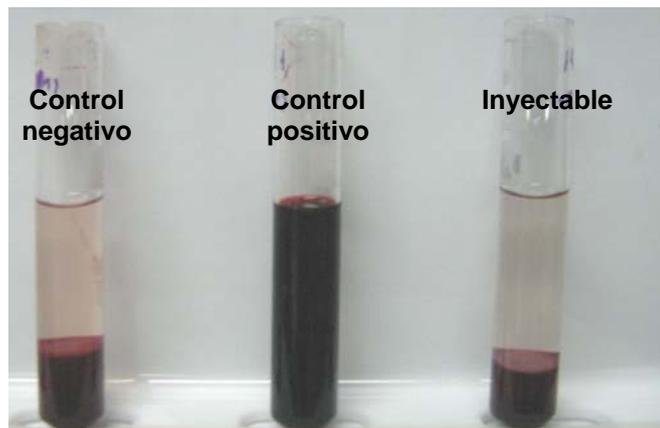


Figura 19: Ejemplo de la prueba de hemólisis aplicada en un inyectable el cual se comercializa.

VI. Conclusiones

- La longitud de onda óptima de la hemoglobina es 540 nm y no existen diferencias significativas entre evaluar a 540 y 541 nm.
- La temperatura no es un factor que influya en el método, ya que no se encontraron diferencias significativas entre la prueba a temperatura ambiente y a 37° C, en el control positivo y en el negativo.
- En cuanto a la estabilidad de la muestra hay una disminución en el porcentaje de hemólisis 24 horas después de la preparación de la muestra, por lo cual sería necesario evaluar exactamente cuanto tiempo es estable la muestra para obtener resultados confiables.
- Al aplicar el método para determinar el potencial hemolítico de los excipientes el alcohol bencílico es el que produce mayor hemólisis, seguido por el propilenglicol el cual al adicionar NaCl como agente protector ayuda a disminuir la hemólisis y en el caso de las sales como EDTA y metabisulfito de sodio no influyen en la hemólisis que pudiera producir un inyectable.
- Al determinar el potencial hemolítico del inyectable Firac® como control de calidad del producto terminado no produce hemólisis.
- Este método In Vitro es una opción para determinar el potencial hemolítico no solo de excipientes que se emplean en la elaboración de inyectables, si no también para evaluar inyectables que están por salir al mercado como una prueba alternativa y/o complementaria a la osmolaridad.

VII. Anexo

➤ Etanol

Sinónimos:

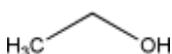
Alcohol etílico, metil carbinol,

Número de registro CAS:

Etanol [64-17-5]

Fórmula empírica y peso molecular

$C_2H_6O = 46.07$

Fórmula estructural**Categoría funcional:**

Antimicrobiano, desinfectante, solvente, preservativo

Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas o tecnología

El etanol y las soluciones acuosas de etanol a varias concentraciones han sido usadas en soluciones farmacéuticas y cosméticas, el etanol es usado principalmente como solvente; también ha sido empleada en algunas soluciones como agente antimicrobiano.

Propiedades Típicas

Actividad antimicrobiana: El alcohol es bactericida en mezclas acuosa a concentraciones entre 60% y 95% v/v, la concentración óptima es generalmente considerada al 70% v/v. La actividad antimicrobiana esta incrementada en presencia de sales de edeteato. El etanol es inactivado en la presencia de surfactantes no iónicos y no es efectivo en la presencia de esporas bacterianas.

Punto de ebullición: 78.15°C

Flamabilidad: Fácilmente flamable, produce flama azul sin humo.

Punto de ignición: 14°C

Solubilidad: Miscible en cloroformo, éter, glicerina y agua.

Gravedad específica: 0.8119–0.8139 a 20°C.

Punto de fusión: –112°C

➤ **Alcohol bencílico**

Sinónimos:

α-Hidroxitolueno; fenilcarbinol; fenilmetanol; α-toluenol

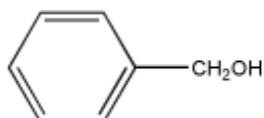
Nombre químico y número de registro CAS:

Benzenometanol [100-51-6]

Fórmula empírica y peso molecular.

$C_7H_8O = 108.14$

Fórmula estructural:



Categoría Funcional:

Preservativo antimicrobiano, desinfectante solvente.

Aplicación en formulaciones o tecnología farmacéutica:

El alcohol bencílico es un antimicrobiano, empleado en cosméticos, comida y en formulaciones farmacéuticas, incluyendo orales y parenterales formulaciones a concentraciones de 2% v/v. En cosméticos a concentraciones arriba del 3% v/v, probablemente usado como preservativo, mientras que al 10% v/v es usada como desinfectante.

El alcohol bencílico al 10% v/v tienen propiedades de anestésico local, lo cual es explotado en algunos parenterales, productos para la tos, soluciones oftálmicas, ungüentos y spray dermatológicos en aerosol. Algunas veces es usado como un preservativo antimicrobiano, el alcohol bencílico ha sido asociado con algunos efectos adversos fatales, cuando es administrado en neonatos.

Descripción:

Incoloro, oleoso líquido con un con ligero aroma.

Propiedades típicas

Acididad y Alcalinidad: En soluciones acuosas es neutral

Actividad Antimicrobiana: El alcohol bencílico es un bacteriostático es empleado como un preservativo antimicrobiano contra bacterias gram positivas, hongos y levaduras aunque alguna veces es empleado por sus propiedades bactericidas. La actividad óptima ocurre a pH debajo de 5 con una menor actividad en pH 8. Su actividad antimicrobiana es reducida en presencia de surfactantes no iónicos como el polisorbato 80

Temperatura de autoignición: 436.5°C

Punto de ebullición: 204.7°C

Flamabilidad: Flamable. Los límites en aire es 1.7–15.0% v/v.

Punto de fusión: –15°C

Coefficiente de partición:

Parafina líquida: agua = 0.2

Aceite de cacahuate: Agua = 1.3

➤ **Cloruro de Sodio**

Sinónimos

Cloruro de sodio, sal común, sal de mesa, sal de mar, sal de grano.

Nombra químico y número de registro CAS

Cloruro de sodio [7647-14-5]

Fórmula empírica y peso molecular

NaCl = 58.44

Fórmula estructural

NaCl

Aplicaciones en formulaciones y tecnología farmacéutica

Es muy usada en una gran variedad de formulaciones farmacéuticas parenterales y no parenterales, es primordialmente empleado para producir soluciones isotónicas. El cloruro de sodio ha sido empleado como lubricante y diluyente en capsulas y en formulación de tabletas de compresión directa, en la actualidad ya no es común hacerlo

El cloruro de sodio ha sido usado para modificar la liberación del principio activo de los geles y formar emulsiones múltiples. También ha sido empleado en el control de tamaño de micelas y para ajustar la viscosidad dispersiones de polímeros por la alteración de carácter iónico en la formulación.

Descripción

El cloruro de sodio es un polvo blanco cristalino, con un sabor salado. El cristal tiene una estructura cúbica

Propiedades típicas

Acidez/ Alcalinidad: pH = 6.7 – 7.3 (En solución acuosa saturada)

Angulo de reposos: 38° para cristales cúbicos

Punto de ebullición: 1413°C

Densidad: 2.17 g/cm³; 1.20 g/cm³ para soluciones acuosas saturadas

Constante dieléctrica: 5.9 a 1 MHz

Higroscopicidad: 0.9 w/v en solución acuosa es iso-osmótica con respecto al suero

➤ Propilenglicol

Sinónimos:

1,2-Dihidroxiopropano; E1520; 2-hidroxiopropanol; metil etilen glicol; metil glicol; propano-1,2-diol.

Número de registro CAS:

1,2-Propanodiol [57-55-6]

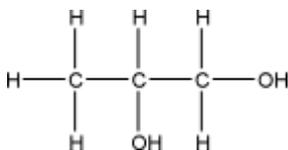
(-)-1,2-Propanodiol [4254-14-2]

(+)-1,2-Propanodiol [4254-15-3]

Fórmula empírica y peso molecular

$C_3H_8O_2 = 76.09$

Fórmula estructural



Categoría funcional:

Preservativo antimicrobiano, desinfectante, humectante, plastificante, solvente, estabilizador de vitaminas, cosolvente miscible en agua.

Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas o tecnología

El propilenglicol ha sido usado como un solvente en formulaciones farmacéuticas y como preservativo en algunos parenterales. En general es un mejor solvente que la glicerina y disuelve una gran variedad de materiales como corticosteroides, fenoles, sulfas, barbitúricos, vitaminas, algunos alcaloides y anestésicos locales

Descripción:

El propilenglicol es claro y no tiene color, es viscoso y prácticamente inodoro

Propiedades Típicas

Temperatura de autoignición: 371° C

Punto de ebullición: 188° C

Flamabilidad: 12.6 % v/v en el aire

Densidad: 1.038 g/cm³ a 20° C

Punto de fusión: -59° C

Punto de inflamación: 99 ° C

Viscosidad (Dinámica): 58.1 mPa

Solubilidad: Miscible con acetona, cloroformo, etanol, glicerina y agua

➤ **Metabisulfito de sodio**

Sinónimos:

Bisulfito de sodio, pirosulfito disódico, ácido disulfuroso, pirosulfito de sodio

Número de registro CAS:

Pirosulfito de sodio [7681-57-4]

Fórmula empírica y peso molecular

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5 = 190.1$

Fórmula estructural

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

Categoría funcional:

Antioxidante

Aplicaciones en formulaciones farmacéuticas o tecnología

El metabisulfito de sodio es usado como antioxidante en orales, parenterales y en formulaciones farmacéuticas tópicas a concentraciones de 0.01-1.0% v/v, por lo general es empleado en soluciones ácidas, ya que para las básicas es empleado el sulfito de sodio. También ha sido empleado como un preservativo antimicrobiano en especial a pH ácido

Descripción:

Son cristales blancos color crema en forma de prisma, tiene un aroma de dióxido de sulfuro.

Osmolaridad: 1.38% w/v en solución acuosa es iso-osmótica con el suero

Punto de fusión: 150° C

VIII. Referencias

1. Alvarez Núñez Fernando A. Rosin Danielle, Yalkowsky Samuel H. A spin filter method for continuous evaluation of hemolysis, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 88 (10), 1041 – 1043
2. Amin Ketan, Dannenfelser Rose-Marie. 2006. In Vitro Hemolysis: Guidance for Pharmaceutical Scientist. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 86 (6), 1173 – 1176.
3. Brown S., Templeton L., Prater D., Potter C. 1989. Use of an In Vitro Haemolysis Test to Predict Irritancy in an Intramuscular Formulation. *Journal of Parenteral Science and Technology*. (43) 3, 117-119.
4. Cherng-Chyi Fu R. Lidgate D. Whatley J., McCullough T. 1986. The biocompatibility of Parenteral vehicles- In Vitro/In Vivo Screening Comparision and Effect of Excipients on hemolysis. *Journal of Parenteral Science and Technology* (41) 5, 164-168
5. Gannong F. William. 2003. *Fisiología Médica* 20° Edición. Editorial Manual Moderno. Pag. 500-502
6. Gupta K. Pramod, Brazeau A. Gayle. 1999. *Injectable Drug Development. Techniques to reduce pain and irritation*. Ed. Interpharm Press. Pag 77-89
7. Ira Fox Stuart. 2003. *Fisiología humana*. 7° edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. Pag. 128-137 y 337-379
8. Johnson J., He Y., Yalkowsky S. 2003. Prediction of precipitation induced phlebitis: a statistical validation of an In Vitro model. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (92) 8, 1574-1581
9. Krzyzaniak F., Alvarez Núñez Fernando A., Dawn M. Raymond, Yalkowsky H. Samuel. Lysis of human red blood cells. 4. Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 86 (11), 1215 – 1217
10. Krzyzaniak F., Raymond M., Yalkowsky S. 1997. Lysis of human red blood cells 2: effect of contact time on cosolvent induced hemolysis. *International Journal of Pharmaceutics*. 152, 193 – 200.
11. Krzyzaniak JF, Raymond DM, Yalkowsky. Lysis of human red blood cells 1: Effect of contact time on water induced hemolysis. *PDA J Pharmaceutical Sciences and Technology*. 1996. 50(4), 223-226
12. Ku SH., Cadwallader D. 1974. Behavior of erythrocytes in various solvent systems VII: Water-Monohydric alcohols. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. (63)1, 60-64

13. Lynch M., Raphael S., Mellor L., Spare P. y Inwood M. 1977. Métodos de laboratorio. Volumen 1. 2° edición. Editorial Nueva Editorial Interamericana. Mexico. Pag 743-758
14. Obeng, E., Cadwallader, D. 1989. In Vitro Dynamic Method for evaluating the Hemolytic Potential of Intravenous Solutions. *Journal of Parenteral Science and Technology*. (43) 4, 167-173.
15. Peñuela Oscar Andrés. 2005. Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica*. 40 (3), 215-225
16. Reed W. Kenneth, Yalkowsky S. 1986. Lysis of Human red blood cells in the presence of various cosolvents. II. The effect of differing NaCl Concentrations. *Journal of Parenteral Science and Technology*. (40) 3, 88-94.
17. Reed W. Kenneth, Yalkowsky S. 1987. Lysis of Human Red Blood Cells in the Presence of Presence of Various Cosolvents. III. The relationship between Hemolytic Potential and Structure. *Journal of Parenteral Science and Technology*. (41) 1, 37-39
18. Tortora J., Derrickson B. 2003 *Principios de Anatomía y Fisiología*. 11° Ed. Editorial Medica Panamericana. Pag. 671-679
19. Yalkowsky S., Kryzaniak J. F., Ward G. H. 1998. Formulation-Related Problems Associated with Intravenous Drug. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 87 (7), 787 – 795.