



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA) UTILIZADO
EN SUERO FISIOLÓGICO, PARA TRATAMIENTO MÉDICO
HOSPITALARIO COMO EXPANSOR DE VOLUMEN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

ADRIANA TENORIO HERNÁNDEZ



Ciudad Universitaria, Cd. de México 2020



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Elizabeth Reyes López

VOCAL: Profesor: Gustavo Adolfo Zelada Guillen

SECRETARIO: Profesor: Salvador López Morales

1er. SUPLENTE: Profesor: Claudia Inés Rivera Cárdenas

2° SUPLENTE: Profesor: Juan Ronaldo Vázquez Miranda

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE REOLOGÍA, LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES (IIM).

SALVADOR LÓPEZ MORALES
ASESOR DEL TEMA

ADRIANA TENORIO HERNÁNDEZ
SUSTENTA

AVANT PROPOS

Congresos-Presentaciones de Póster

A. Tenorio, S. López, G. Cedillo, L. Huerta, & M.A. Canseco, Comparative Analysis of Biomacromolecules Used for Restoring Blood Plasma Volume, INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYMERS AND ADVANCED MATERIALS "Polimat-Huatulco-2017". ([Apéndice 1.1](#))

A. Tenorio, S. López, R. Suárez, E. Morales, M.A. Canseco, L. Huerta & G. Cedillo, Characterization of Hydroxyethyl Starch (HES) Used in Medical Treatment, XXVI INTERNATIONAL MATERIALS RESEARCH CONGRESS, "IMRC-Cancún-2017". ([Apéndice 1.2](#))

Ponencias

S. López Morales, A. Tenorio Hernández, R. D. Venegas Lancon, G. Cedillo Valverde, L. Huerta Arcos and M. M. A. Canseco Martínez. Evaluation and regulation of some medical devices for use in humans, INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYMERS AND ADVANCED MATERIALS, "Polimat-Huatulco-2019". ([Apéndice 2.1](#))

A. Tenorio, S. López, G. Cedillo, L. Huerta, & M. Canseco, Caracterización de Hidroxietil Almidón (HEA) Usado en Tratamiento Médico, "Simposio Anual de Estudiantes Asociados al IIM 2018". ([Apéndice 2.2](#))

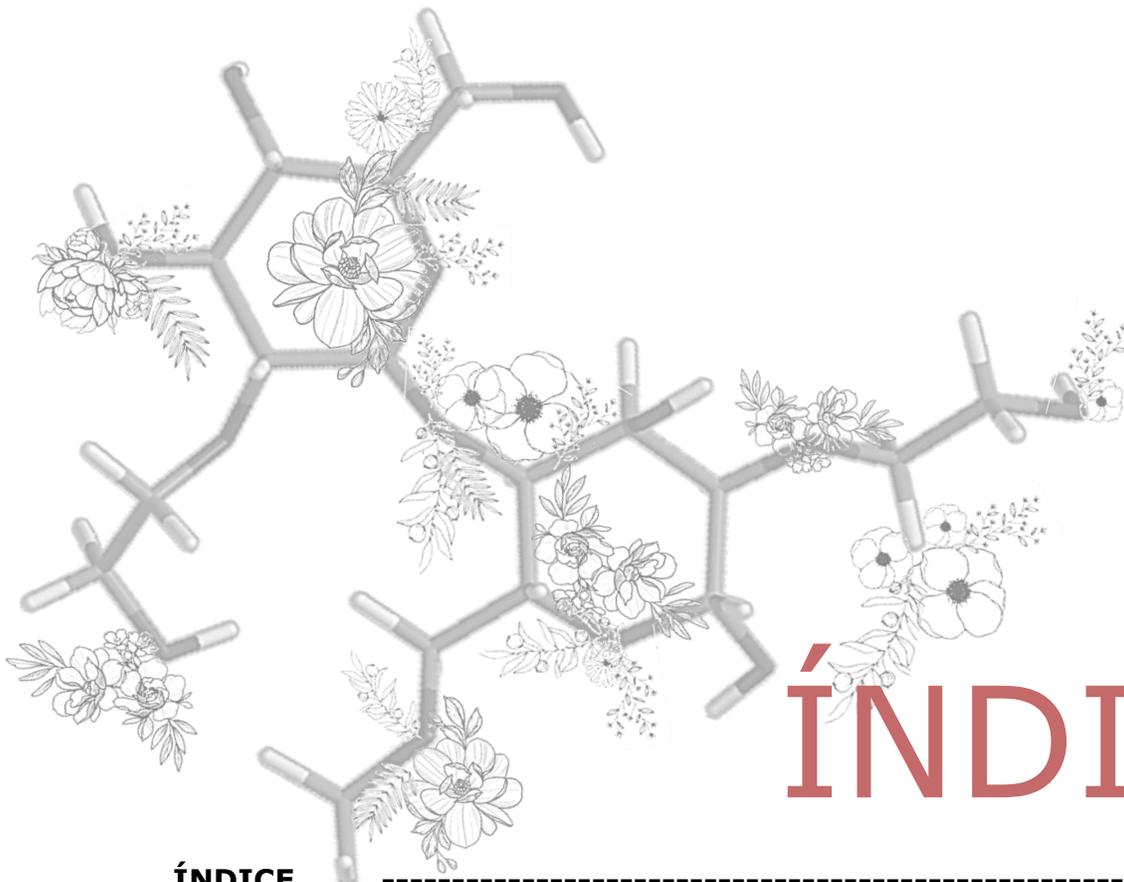
A. Tenorio, S. López, El peso de la partícula HES... sí importa, Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), "Puertas abiertas 2017". (Apéndice 2.3)

S. López Morales, A. Hernández Acevedo, Y. G. López Urrutia, A. Tenorio Hernández, A. K. Vizcaíno Sixto y N. Wilson Bello, Caracterización de Hidroxietil almidón (HES) HPSEC-MALLS/NANOWAVE, Investigaciones en Materiales (IIM), "Puertas abiertas 2016". (Apéndice 2.4)

Artículos Académicos

A. Tenorio, S. López, Influencia Química del Disolvente Sobre la Molécula de Hidroxietil Almidón por Análisis Computacional, Proyectos académicos de Química Computacional, SEM-1-2018. (Apéndice 3.1)

A. Tenorio, S. López, Determinación de Masa Molecular (Mw) de Nanopartículas de Hidroxietil Almidón por Dispersión de Luz Dinámica (DLS), Seminario II y Trabajo de investigación II, SEM-2-2018. (Apéndice 3.2)



ÍNDICE

ÍNDICE	V
ABREVIATURAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS	XII
INTRODUCCIÓN	XIII
1. ANTECEDENTES	1
1.1 <i>COLOIDE</i>	1
1.2 <i>ALMIDÓN</i>	2
1.2.1 Composición del almidón	2
1.2.2 Degradación metabólica del almidón	4
1.3 <i>HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)</i>	6
1.3.1 Definición de hidroxietil almidón (HEA)	6
1.3.2 Análisis estructural de hidroxietil almidón (HEA)	7
1.3.3 Método de síntesis de hidroxietil almidón (HEA)	8
1.3.4 Clasificación de hidroxietil almidón (HEA)	10

1.3.5	Farmacodinámica de hidroxietil almidón (HEA) -----	12
1.3.6	Farmacocinética de hidroxietil almidón (HEA) -----	17
1.3.7	Efectos colaterales por perfusión de hidroxietil almidón (HEA) -----	20
1.3.8	Restricciones de uso de hidroxietil almidón (HEA) ---	21
1.3.9	Caracterización de hidroxietil Almidón (HEA) -----	23
2.	JUSTIFICACIÓN -----	26
3.	OBJETIVOS -----	28
3.1.	<i>OBJETIVO GENERAL -----</i>	<i>28</i>
3.2.	<i>OBJETIVOS PARTICULARES -----</i>	<i>28</i>
4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL -----	29
4.1	<i>ORIGEN DE MUESTRA -----</i>	<i>29</i>
4.1.1	Manejo y Almacenamiento de HEA -----	29
4.2	<i>IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA HEA -----</i>	<i>29</i>
4.2.1	Registro de muestra y estándar de HEA-----	29
4.3	<i>MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)-----</i>	<i>31</i>
4.3.1	Calorimetría diferencial de barrido (DSC) -----	31
4.3.2	Espectroscopia infrarroja (FTIR) -----	32
4.3.3	Dispersión de luz dinámica (DLS) -----	33
4.3.4	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) 36	
4.3.5	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) -	38
4.3.6	Picnometría de gas -----	39
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS-----	41
5.1	<i>CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) -----</i>	<i>41</i>
5.2	<i>ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) -----</i>	<i>46</i>
5.3	<i>DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)-----</i>	<i>48</i>

5.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN)-----	53
5.5 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES DE RAYOS X (XPS)-----	55
5.6 PICNOMETRIA DE GAS -----	58
5.7 CARACTERIZACION CONJUNTA DE HIDROXETIL ALMIDON -----	60
6. CONCLUSIONES -----	62
APENDICES -----	63
REFERENCIAS -----	81

ABREVIATURAS

C2:C6	Proporción de grupos hidroxilos en la posición del carbono 2 respecto a, carbono 6 de las moléculas de glucosa del HEA
CRS	Sustancia de referencia química
Da	Dalton, unidad de masa atómica unificada [g/mol]
DLS	Dispersión de luz dinámica
DS	Grado de sustitución molar
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ESCA	Espectroscopía electrónica para análisis químico
EOI	Final de perfusión, por sus siglas en ingles end of infusión
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HEA	Hidroxietil almidón
HPSEC	Cromatografía por exclusión de tamaño de alta resolución
IIM	Instituto de Investigaciones en Materiales
MS	Índice de sustitución molar
PM o Mw	Peso molecular medio
PRAC	Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia europeo

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SS	Solución salina
SSB	Solución salina balanceada
XPS	Espectroscopía de fotoelectrones de rayos x

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DIAGRAMA DE DIFERENTES TIPOS DE COLOIDES	1
FIGURA 2. ESTRUCTURA MOLECULAR DE AMILOSA	3
FIGURA 3. ESTRUCTURA MOLECULAR DE AMILOPECTINA	4
FIGURA 4. DEGRADACIÓN METABÓLICA DEL ALMIDÓN A GLUCOSA Y LAS ENZIMAS RESPONSABLES E INVOLUCRADAS	5
FIGURA 5. ESTRUCTURA MOLECULAR DE HIDROXIETIL ALMIDÓN	6
FIGURA 6. ESTRUCTURA MOLECULAR REPETITIVA DE HIDROXIETIL ALMIDÓN	7
FIGURA 7. SITIOS DE MAYOR REACTIVIDAD EN LA MOLÉCULA DE HEA.....	7
FIGURA 8. ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS DE ALMIDÓN PARA OBTENER HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)	9
FIGURA 9. MECANISMO DE REACCIÓN - ETOXILACIÓN DE ALMIDÓN PARA OBTENER HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)	9
FIGURA 10. CORTE LONGITUDINAL SECCIONAL DE SISTEMA VASCULAR (A) COMPORTAMIENTO VASCULAR NORMAL Y (B) COMPORTAMIENTO VASCULAR POR PERDIDA DE VOLUMEN PLASMÁTICO	13
FIGURA 11. CORTE LONGITUDINAL SECCIONAL DE SISTEMA VASCULAR (C) COMPORTAMIENTO VASCULAR AL INICIO DE PERFUSIÓN Y (D) COMPORTAMIENTO VASCULAR AL FINAL DE PERFUSIÓN (EOI)	15
FIGURA 12. PRESENTACIÓN COMERCIAL DE SOLUCIÓN DE PERFUSIÓN DE HEA	17
FIGURA 13. GRÁFICA DE CONCENTRACIÓN PORCENTUAL DE HEA RESIDUAL EN PLASMA DURANTE LAS PRIMERAS 24 HORAS POSTERIOR A EOI=END OF INFUSION, FINAL DE LA PERFUSIÓN	18
FIGURA 14. DIAGRAMA VÍAS BIOLÓGICAS DEL PROCESO DE ELIMINACIÓN DE SUERO HEA <i>IN VIVO</i> POSTERIOR A LA INFUSIÓN.....	19
FIGURA 15. EFECTOS COLATERALES POSTERIORES A LA PERFUSIÓN DE SUERO HEA20	
FIGURA 16. RESTRICCIONES SEGÚN LA FDA, RESPECTO AL USO DE SUEROS CON CONTENIDO DE HIDROXIETIL ALMIDÓN EN PACIENTES EN SHOCK Y ESTADO CRITICO	22

FIGURA 17. MÉTODOS DE ANÁLISIS QUE EN COMBINACIÓN CARACTERIZAN A HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)	24
FIGURA 18. MÉTODOS DE CÁLCULO PARA DETERMINAR LA DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR, ESPECIFICADOS EN SOFTWARE NANOTRAC FLEX®.....	34
FIGURA 19. TERMOGRAMA - HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA) DE CALENTAMIENTO POR DSC CON DOS MUESTRAS ESTÁNDAR (CRS)	42
FIGURA 20. TERMOGRAMA - HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA) DE RECALENTAMIENTO POR DSC, CON DOS MUESTRAS ESTÁNDAR (CRS)	43
FIGURA 21. ANÁLISIS POR FTIR DE HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA).....	46
FIGURA 22. DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR Y DIÁMETRO HIDRODINÁMICO PROMEDIO PARA HIDROXIETIL ALMIDÓN POR ANÁLISIS DLS MÉTODOS PLOT DEBYE Y DEBYE-HIDRO.....	51
FIGURA 23. ESPECTRO RMN ¹ H DE HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)	53
FIGURA 24. ANÁLISIS DE ESPECTRO RMN ¹ H DE HIDROXIETIL ALMIDÓN EN D ₂ O..	55
FIGURA 25. ESPECTRO XPS DE HIDROXIETIL ALMIDÓN	56
FIGURA 26. ESPECTRO XPS C ^{1s} NORMALIZADO DE LOS PRINCIPALES GRUPOS FUNCIONALES DE HIDROXIETIL ALMIDÓN	57
FIGURA 27. DENSIDAD DE PARTÍCULA PROMEDIO PARA HIDROXIETIL ALMIDÓN POR ANÁLISIS PICNOMETRÍA DE GAS	59
FIGURA 28. ANÁLISIS DE CARACTERIZACIÓN CONJUNTA DE HIDROXIETIL ALMIDÓN	60

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. DIFERENCIA ESTRUCTURAL EN CONTENIDO PORCENTUAL DE AMILOSA Y AMILOPECTINA EN ALMIDÓN DE DIVERSAS FUENTES VEGETALES	3
TABLA 2. TIPOS DE HIDROXIETIL ALMIDÓN DE ACUERDO A SUS CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	11
TABLA 3. ESPECIFICACIONES DE PRESENTACIÓN COMERCIAL DISPONIBLE DE SUERO FISIOLÓGICO DE HIDROXIETIL ALMIDÓN	16
TABLA 4. FARMACOCINÉTICA Y CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS RESIDUALES DE DIFERENTES TIPOS DE HEA DESPUÉS DE MÚLTIPLES INFUSIONES.....	18
TABLA 5. CLASIFICACIÓN EN INTERVALOS DE DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR PROPUESTO POR LA EUROPEAN PHARMAPOEIA 8.0	24
TABLA 6. REGISTRO DE IDENTIFICACIÓN; PROPIEDAD DE ORIGEN Y DE ESTUDIO EN MUESTRAS Y ESTÁNDAR DE HEA, EN IIM-UNAM	30
TABLA 7. IDENTIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE DISOLUCIONES HIDROXIETIL ALMIDÓN PARA ANÁLISIS DLS.....	36
TABLA 8. IDENTIFICACIÓN DE BANDAS Y ATRIBUCIÓN ASOCIADA AL ANÁLISIS DE FTIR PARA HIDROXIETIL ALMIDÓN	47
TABLA 9. DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR PARA DISOLUCIONES DE HIDROXIETIL ALMIDÓN EN ANÁLISIS DLS POR MÉTODO DEBYE	49
TABLA 10. DISTRIBUCIÓN DE PESO MOLECULAR PARA DISOLUCIONES DE HIDROXIETIL ALMIDÓN EN ANÁLISIS DLS POR MÉTODO DEBYE - HYDRO.....	50
TABLA 11. IDENTIFICACIÓN DE PICOS MÁXIMOS Y ATRIBUCIÓN ASOCIADA EN ANÁLISIS DE ESPECTROSCOPIA RMN ¹ H PARA HIDROXIETIL ALMIDÓN	54
TABLA 12. VALORES DE DENSIDAD DE PARTÍCULA DE HIDROXIETIL ALMIDÓN OBTENIDOS MEDIANTE PICNOMETRÍA DE GAS	58

INTRODUCCIÓN

La caracterización de un polímero consiste en determinar parámetros cualitativos y/o cuantitativos, que describan el comportamiento a nivel macro y microscópicos de las partículas que lo componen, con base en sus propiedades fisicoquímicas. La importancia del presente estudio radica, en particular en el área de la química, ya que; otorga el conocimiento necesario para que de esta manera se puedan implementar nuevos y mejores métodos de síntesis y análisis, con la finalidad de abrir diferentes opciones en los diversos campos de aplicación a la industria de biopolímeros, farmacológica, medicina humana y veterinaria, por mencionar algunos.

En el caso de sustancias coloidales, utilizadas en sueros de perfusión de uso clínico, en pacientes con trauma y/o en estado de shock, es decir, cuando el paciente está sangrando abundantemente, la pérdida de volumen de líquido en sus venas puede conducir hasta ese estado, por lo cual, necesitan reanimación líquida, por vía intravenosa.

El estudio de materia prima utilizada en dichos sueros se ha colocado como punto focal del ojo científico, en el análisis de daños y efectos adversos que provocan fallas de coagulación e insuficiencia renal. Hasta nuestros días sigue la intensa búsqueda en encontrar el coloide ideal.

El aporte científico en la presente búsqueda se complementa con base en la caracterización de la materia prima utilizada para dicho fin. Utilizando las técnicas FTIR, DSC, DLS, RMN, XPS y Picnometría de desplazamiento de gas (Helio), con las cuales se pretende tener un panorama más amplio de las posibles causas o efectos que podría acarrear el utilizar HEA como suero plasmático.

1. ANTECEDENTES

1.1 COLOIDE

Los coloides son partículas suspendidas en un fluido con diámetro alrededor de 10^{-9} a 10^{-5} m, en algunos casos de alto peso molecular, las cuales atraviesan con dificultad las membranas capilares, de forma que son capaces de aumentar la presión oncótica plasmática y retener agua en el espacio intravascular^[1] aumentando el volumen plasmático.

En medicina una sustancia coloidal, se define como el líquido de reposición que contiene azúcares complejas o proteínas en suspensión diluidas en una solución electrolítica^[2]. Se dividen en (Figura 1) sintéticos (gelatinas, almidones y dextrans) y naturales (albúmina).

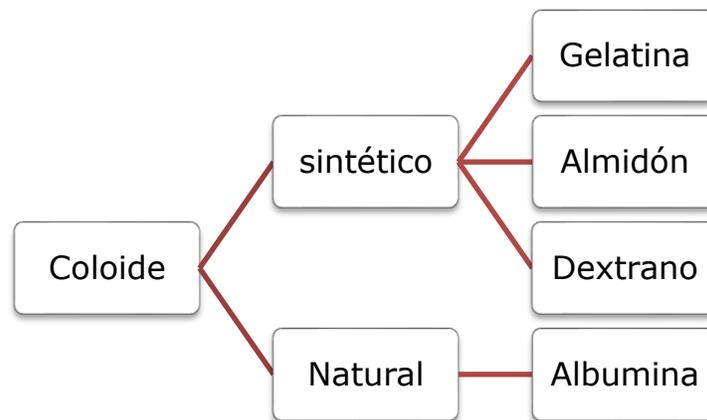


Figura 1. Diagrama de diferentes tipos de coloides

Una sustancia coloidal, causa una expansión inicial del volumen plasmático, cuya magnitud y duración depende de la rapidez de infusión,

de la presión oncótica de la disolución, del número de osmoles introducidos y de la velocidad de aclaramiento de la misma^[3].

Recordemos que, el osmol (osm) es igual a 1 mol ($6,02 \times 10^{23}$ moléculas) partículas de soluto y la osmolaridad, por tanto, describe el número de partículas en solución, es decir, corresponde al número de partículas que contribuyen a la presión osmótica en un litro de disolución y se mide en miliosmoles por litro (mOsm/L). Los valores normales de la osmolaridad plasmática oscilan entre 282 ± 4 mOsm/L.^[4]

1.2 ALMIDÓN

1.2.1 Composición del almidón

Está formado por un solo tipo de monosacárido que es D-glucosa, es decir, un polisacárido homoglucono (compuesto de dos polisacáridos que son amilosa y amilopectina) dependiendo en las proporciones en las que se encuentren ambos polisacáridos además de la morfología, calidad y tamaño del gránulo, será la funcionalidad y las propiedades que caracterizan al almidón.

Se encuentra en tejidos de origen botánico (Tabla 1), incluyendo frutos, semillas, hojas y más comúnmente en tubérculos^[5] como la papa, cereales como el trigo, arroz, pseudocereales, legumbres, algunas frutas tropicales y principalmente en maíz donde su producción es más considerable.

Se obtiene de las plantas superiores, es decir, plantas con órganos diferenciados y tejidos vasculares^[3] por métodos físicos, como son la maceración, secado, separación, centrifugación, etc.

Tabla 1. Diferencia estructural en contenido porcentual de amilosa y amilopectina en almidón de diversas fuentes vegetales

Almidón	Amilosa (%)	Amilopectina (%)
Papa ^a	20.1 – 31.0	70.0 – 80.0
Maíz ^a	22.4 – 32.5	68 – 75
Arroz ^b	28.5	81.0
Trigo ^b	30.0	75.0
Yuca ^c	17.0	83.0
Quinoa ^b	10.0 – 21.2	85.0
Camote ^d	19.6	80.4

Fuente^[6]: a) Raghunathan, Hoover, Waduge, Liu, y Warkentin (2001); b) Shevkani, Singh, Bajaj y Kaur (2017); c) Li, Wang, y Zhu (2016); d) Betancur (2001)

La **amilosa** es un polímero de cadena lineal en la cual las unidades de D-glucosa se presentan como anillos de piranosa unidos en α -1,4 y un bajo grado de ramificación en enlaces α -1,6^[7], la unidad de disacárido que se repite es la maltosa y debido a la presencia de grupos hidroxilo, presenta propiedades hidrofílicas (Figura 2)^[8] siendo soluble en agua. La molécula tiene un peso molecular promedio de 1×10^5 a 1×10^6 g/mol^[9], sin embargo, varía según sea su derivado vegetal, proceso de síntesis y métodos de aislamiento utilizados.

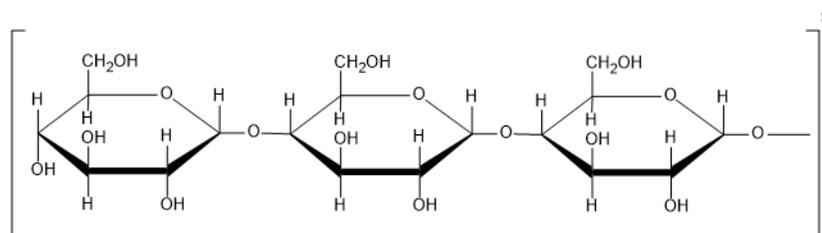


Figura 2. Estructura molecular de amilosa

La **amilopectina** es un polímero de unidades de D-glucosa de cadenas ramificadas de longitud media (24 a 30 unidades por ramificación) con enlaces glucosídicos en la cadena principal en un 94-96% del tipo α -1,4 y 4-6% con enlace en los puntos de ramificación (aproximadamente cada 15-25 unidades de glucosa)^[3], del tipo α -1,6 formando una estructura ramificada (Figura 3)^[8]. La molécula tiene un peso molecular medio de 1×10^7 a 1×10^8 g/mol^[7], con mayor peso molecular respecto a la amilosa y es parcialmente soluble en agua caliente.

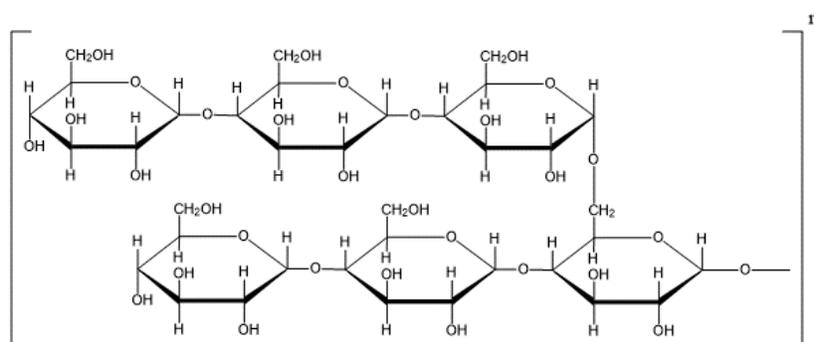


Figura 3. Estructura molecular de amilopectina

1.2.2 Degradación metabólica del almidón

El almidón, presenta un comportamiento inestable, en cuanto a propiedades mecánicas y químicas; principalmente por su alta degradación al ser rápidamente hidrolizado por acción de dos enzimas glucolíticas: alfa y beta amilasa^[10] (Figura 4), la primera de estas enzimas es producida, en caso humano, principalmente en el páncreas y en menor cantidad en las glándulas salivales y la segunda enzima, debido a su origen vegetal, se encuentran en almendras y semillas de germinación.^[11] Ambas actúan en los procesos de digestión de carbohidratos, encargadas de la transformación de almidón en azúcares más simples, desdoblando

el almidón hasta alfa dextrinas y maltodextrinas que son fragmentos de polisacárido, que posteriormente son degradados hasta glucosa, con la finalidad de producir un monosacárido simple que es fácilmente procesada por el cuerpo humano.

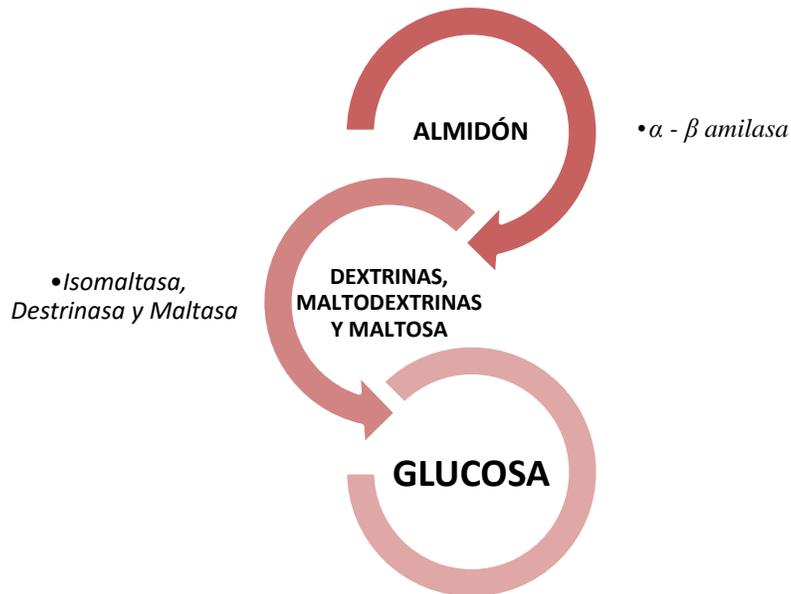


Figura 4. Degradación metabólica del almidón a glucosa y las enzimas responsables e involucradas

Diversos azúcares como disacáridos o polisacáridos pueden ser descompuestos al disolverse en agua, cuando el hidrógeno de ésta se une al oxígeno del extremo de la molécula de azúcar, mientras el ion hidroxilo (OH-) se une al resto de la misma molécula. De este modo se simplifica el azúcar, lo cual permite llevar moléculas complejas a otras semejantes mucho más simples^[12], y es un proceso llevado a cabo regularmente por las formas de vida.

1.3 HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)

1.3.1 Definición de hidroxietil almidón (HEA)

Su nombre químico es poli(oxi-2-hidroxietil)almidón^[13] y fórmula química $[C_6H_{10}O_5(C_2H_4O_x)]_n$, mayormente conocido por su nombre genérico **hidroxietil almidón**^[14] (Figura 5) es derivado no iónico del almidón natural, formado por polisacáridos naturales, específicamente por dos polímeros de glucosa, amilosa y amilopectina con sustitución de los grupos hidroxilos(-OH) en los carbonos 2, 3 y 6 por grupos hidroxietiléter(-CH₂CH₂OH) en las moléculas de glucosa. Dando lugar a la formación de polímero sintético conformado por macromoléculas HEA de alto peso molecular organizadas en gránulos semicristalinos (1-100 μ m)^[15] que influyen de manera determinante en las propiedades reológicas del hidroxietil almidón, principalmente en su capacidad de hidratación.^[16] Las moléculas de HEA se organizan en anillos concéntricos para originar una estructura granular.

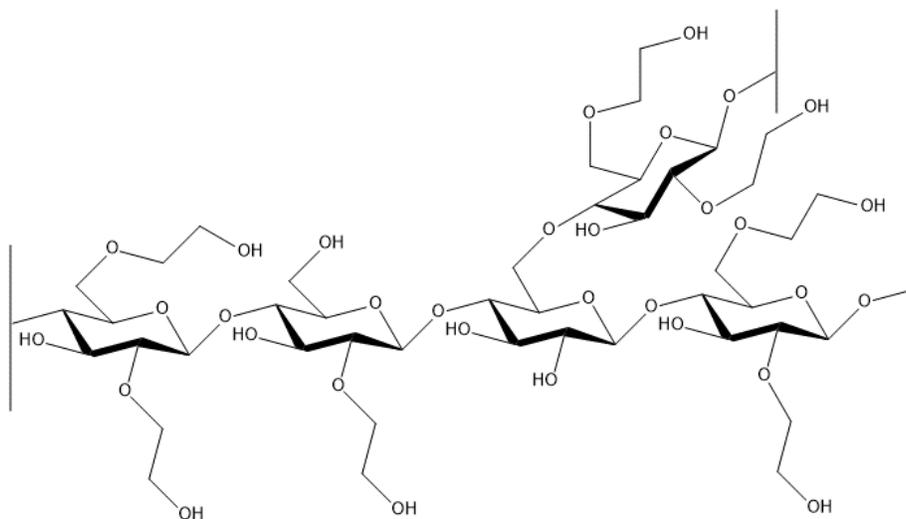


Figura 5. Estructura molecular de hidroxietil almidón

1.3.2 Análisis estructural de hidroxietil almidón (HEA)

La sustitución se representa en grado de sustitución (DS) y está relacionado con la modificación química e indica el promedio del número de sustituciones de grupos hidroxietilo ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) por unidad de glucosa (Figura 6)^[14], donde el máximo grado de sustitución es tres, debido a que se presentan tres grupos hidroxilo disponibles por unidad de glucosa en posiciones de carbono C_2 , C_3 y C_6 .

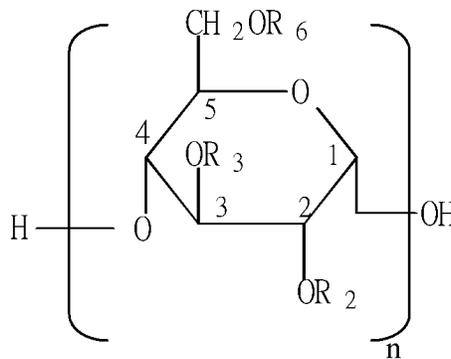


Figura 6. Estructura molecular repetitiva de hidroxietil almidón

Se considera que, los tres diferentes grupos hidroxilo tienen diferente reactividad. El primer $-\text{OH}$ en el carbono 6 (C_6), es más reactivo y la hidroxietilación es llevada a cabo más fácilmente que en los carbonos 2 (C_2) y carbono 3 (C_3). De los grupos $-\text{OH}$ secundarios, el grupo $-\text{OH}$ en el C_2 es más reactivo que el del C_3 ^[17] (Figura 7).

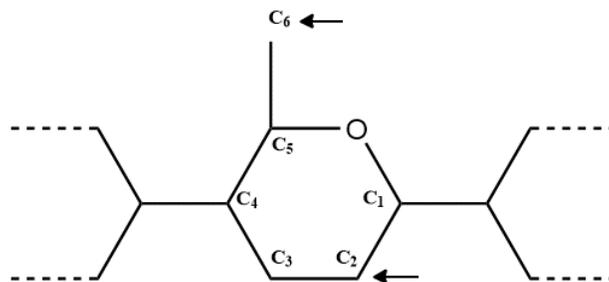


Figura 7. Sitios de mayor reactividad en la molécula de HEA.

1.3.3 Método de síntesis de hidroxietil almidón (HEA)

Se lleva a cabo una derivatización que consiste en transformar el almidón en un producto que posee una estructura química similar, para conferir estabilidad plasmática. Se realiza por cuatro métodos, los cuales son reacciones de cambio de tipo físico, químico y microbiano o por una combinación entre estas. Las transformaciones químicas son reacciones vía éter, formación de ésteres, oxidación y hidrólisis de los grupos hidroxilos^[18], que permite modificar la naturaleza hidrofílica, reducir la tendencia a la retrogradación, es decir, la insolubilización y la precipitación espontánea de las moléculas de amilosa, debido a que sus cadenas lineales se orientan paralelamente por puentes de hidrógeno^[19] y obtener cambios significativos en las propiedades mecánicas y térmicas del almidón.

Tomando en cuenta las múltiples transformaciones químicas existentes para obtener hidroxietil almidón, el presente trabajo, solo explica el mecanismo de reacción con base en el método de síntesis de polietoxilación con la finalidad de comprender la obtención de las muestras de hidroxietil almidón a caracterizar, en el cual, el almidón reacciona con epóxido, para este caso en particular éter cíclico como lo es el óxido de etileno, en presencia de un medio catalizador alcalinizante, preferentemente hidróxidos metálicos alcalinos, por ejemplo, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, para producir grupos hidroxialquil, que están directamente relacionadas con las reacciones de los grupos hidroxilo del polímero de almidón, dando lugar a la formación de macromoléculas poli(*O*-hidroxietil)almidón ó hidroxietil almidón, que posteriormente, es purificado por ultrafiltración para la eliminación de moléculas pequeñas. (Figura 8) ^[20].

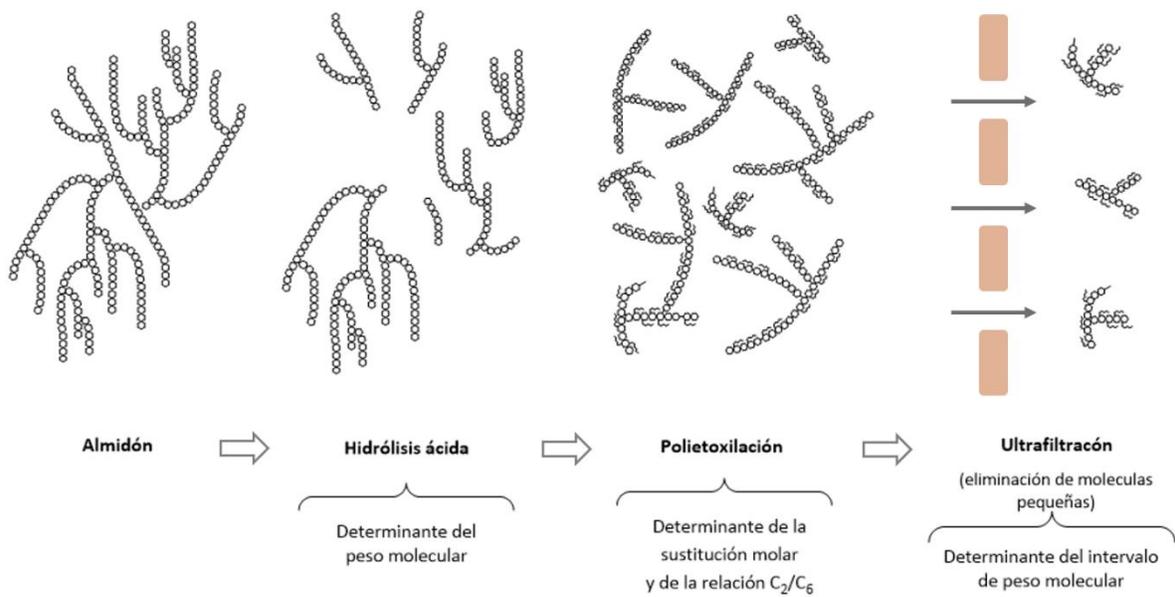


Figura 8. Esquema general de síntesis de almidón para obtener hidroxietil almidón (HEA).

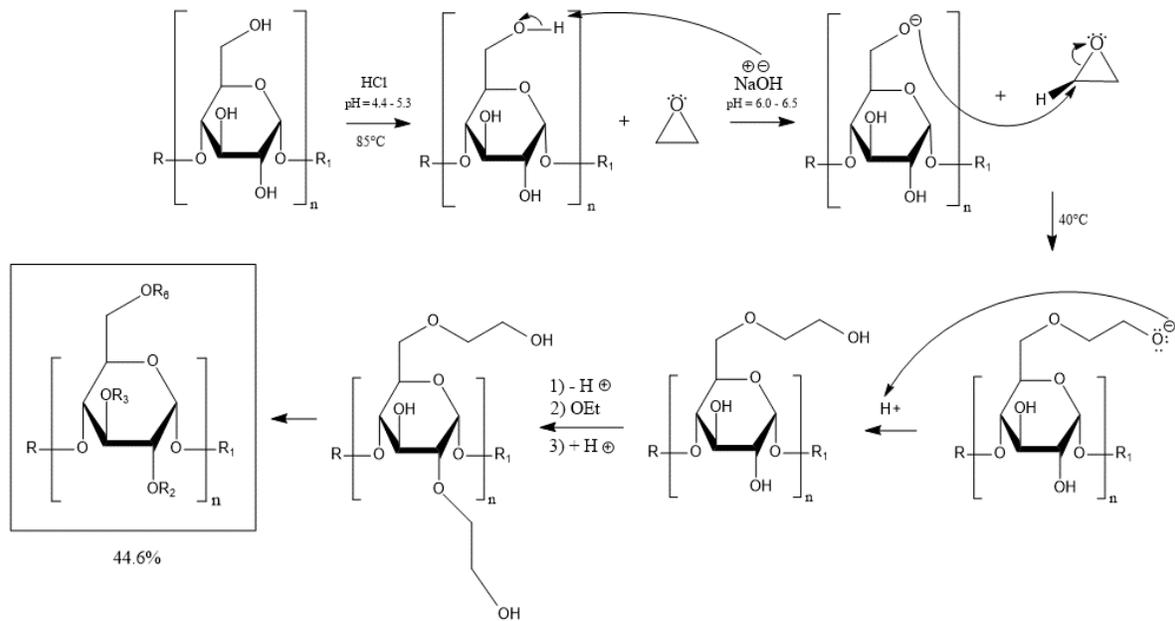


Figura 9. Mecanismo de reacción - etoxilación de almidón para obtener hidroxietil almidón (HEA).

Donde; R, R_1 y $R_6 = H, CH_2CH_2OH$ o enlace glucosídico α -1,6, $R_2, R_3 = H$ o CH_2CH_2OH , R_2 y R_3 pueden ser iguales o diferentes y $n =$ número

de unidades estructurales repetitivas de unidades de glucosa o hidroxietilo.

El mecanismo (Figura 9)^[14] muestra una sustitución nucleofílica, como primer paso, se adiciona ácido clorhídrico (HCl) hasta alcanzar un intervalo de acidez entre $4.4 < \text{pH} < 5.3$ lo cual evita la degradación total del reactivo almidón y con la finalidad de aumentar la solubilidad en medio acuoso. La adición de la base (NaOH) lleva a una basicidad del medio en un intervalo entre $6.0 < \text{pH} < 6.5$, lo que permite formar alcóxidos a partir de la desprotonación de los respectivos alcoholes primarios (R-OH) de los grupos hidroxilo presentes en $C_3 < C_2 < C_6$, en el anillo de la molécula de anhidroglucosa del almidón, que actúa como nucleófilo, en presencia del medio alcalino, para posteriormente hacer el ataque regioselectivamente de modo anti al oxígeno del epóxido y finalmente la formación del hidroxietilo con la protonación del oxígeno con un protón del medio. La reacción termina con la etoxilación en el orden antes mencionado de los grupos hidroxilo activos. Dicha etoxilación, dependerá de las condiciones de reacción y de la naturaleza del almidón.

1.3.4 Clasificación de hidroxietil almidón (HEA)

Existen dos características fisicoquímicas de interés que orientan sobre el comportamiento de HEA en el organismo (Tabla 2) es el *peso molecular* (*Mw*) por sus siglas en inglés, que determina su actividad coloidal, y el *grado de hidroxietilación*, que determina su vida media, este último se cuantifica por el índice de sustitución molar (MS) por sus siglas en inglés, relación de sustitución en C_2/C_6 , es decir, el número de moléculas de glucosa que han sido sustituidas por formas hidroxietiladas

de glucosa preferentemente en las posiciones 2 y 6 de la molécula, ya que son las que confieren estabilidad. Cabe mencionar que, la hidroxietilación en el C₂ es la que confiere la mayor estabilidad a la macromolécula^[10].

Tabla 2. Tipos de hidroxietil almidón de acuerdo a sus características y propiedades fisicoquímicas

Generación HEA	Clasificación	Nombre Genérico	Peso molecular (Mw) [Da]	Sustitución molar (MS)	Ratio C ₂ /C ₆
1^{ra} Generación (1974)		HEA 450/0.7 ^b	450 000	0.7	5:1
2^{da} Generación (1978 - 1980)	Hetalmidón	HEA 670/0.75 ^a	670 000	0.75	4.5:1
		HEA 600/0.7 ^a	600 000	0.7	5:1
	Hexalmidón	HEA 260/0.62 ^b	260 000	0.62	9:1
		Pentalmidón	HEA 200/0.5 ^a	200 000	0.5
3^{ra} Generación (1999)	Tetralmidón	HEA 130/0.42 ^b	130 000	0.42	6:1
4^{ta} Generación (2002)		HEA 130/0.4 ^a	130 000	0.4	9:1
	Pentalmidón	HEA 70/0.5 ^c	70 000	0.5	3:1

a) Francés, Nadal, y Armengol (2015)^[21], b) Kozek Langenecker, S, (2005)^[22], c) Boldt J., Suttner S., (2003)^[23].

El índice de sustitución molar (MS) y el ratio (relación cuantificada de la proporción C₂/C₆) de hidroxietilación^[24], que es un patrón de sustitución que determina la proporción de grupos hidroxilos en la posición C₂ con respecto a C₆ de las moléculas de glucosa del HEA^[21],

consideran la afinidad de la molécula por el agua, ya que, los grupos hidroxietílicos son de carácter hidrófilo de tal manera, para un mismo peso molecular la cantidad de moléculas de agua atraídas será mayor en las sustancias que contengan compuestos de HEA con mayor grado de sustitución molar.

1.3.5 Farmacodinámica de hidroxietil almidón (HEA)

Hidroxietil almidón (HEA) es la materia prima para soluciones de perfusión, por ejemplo suero fisiológico, utilizado como agente expansor de volumen plasmático coloidal artificial en medicina humana y veterinaria, remplazando inmediatamente el volumen plasmático perdido después de su administración vía intravenosa durante el tratamiento del paciente crítico a causa de cirugía, hemorragia, trauma, sepsis, quemaduras o en cirugía de rutina, hemodilución normovolémica aguda^[25], que provoca shock hipovolémico o shock hemorrágico^[26], síndrome que se desarrolla cuando el volumen plasmático circulante baja drásticamente a tal grado que, el corazón se vuelve incapaz de distribuir el flujo sanguíneo adecuado requerido por el organismo, es decir, se produce fallo en la hemodinámica que es la deficiencia de microcirculación y suministro inadecuado de nutrientes importantes como el oxígeno (O₂), que conduce a hipoxia celular en metabolismo anaeróbico por falta de O₂^[27] y acidosis metabólica que es el trastorno del equilibrio ácido-base, caracterizado por aumento de la acidez del plasma sanguíneo^[28] por presencia de ácido láctico en exceso, provocando muerte celular y con ello insuficiencia orgánica vital que causa el deceso del paciente.

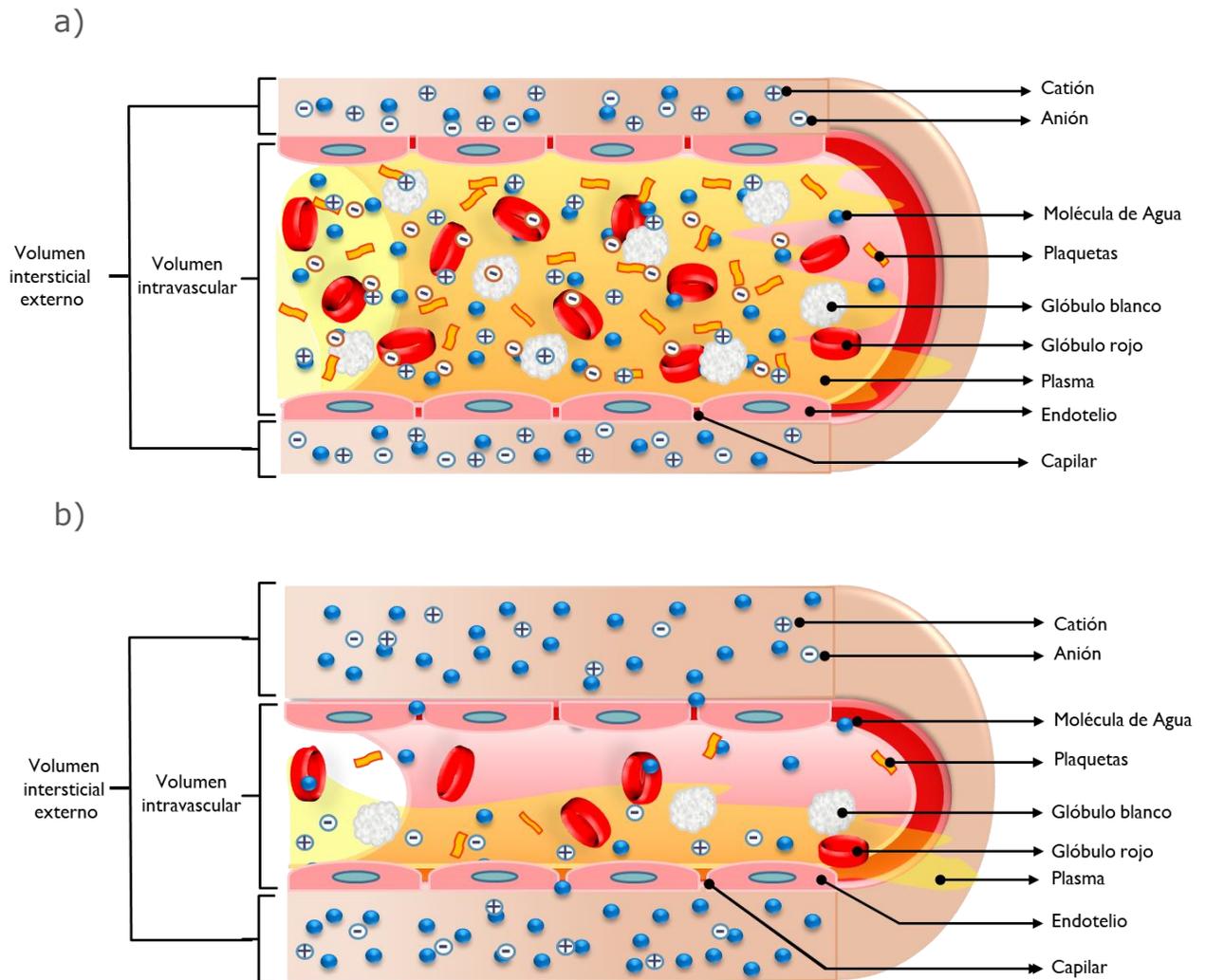


Figura 10. Corte longitudinal seccional de sistema vascular (a) Comportamiento vascular normal y (b) Comportamiento vascular por pérdida de volumen plasmático

En el organismo sano, el sistema circulatorio se encuentra en equilibrio entre la presión oncótica, osmótica e hidrostática, 25 mmHg, 285 osmol/kg y 15-30mmHg, respectivamente^[29] (Figura 10a), el cual es modificado durante la pérdida de volumen plasmático sanguíneo, ya que; hay pérdida de concentración eritrocitaria, agua y electrolitos, en general una pérdida de volumen intravascular, que provoca desplazamiento de agua y electrolitos por difusión a través de los espacios de unión de los

endotelios, epitelio plano formado por células endoteliales^[30], que realiza la función de capilar, por dicho efecto, aumenta el volumen intersticial externo, disminuyendo la presión oncótica del espacio intravascular y aumentando la presión osmótica y hidrostática del espacio intersticial externo, que promueve a la vasoconstricción, es decir, el radio del conducto donde fluye la sangre se contrae, desplazando el volumen de líquido plasmático que fluye aun, hacia la circulación central como respuesta simpática adrenérgica del organismo para compensar dicha pérdida. (Figura 10b)

Posterior a la infusión del suero fisiológico en el espacio intravascular, las partículas HEA en suspensión, debido a su alto peso molecular, no atraviesan los capilares de la red de epitelios que sirve como membrana permeable (Figura 11c), por lo tanto permanecen en el líquido intravascular aumentando la presión oncótica^[31] y obligando a que las partículas de agua y electrolitos regresen al espacio intravascular por efecto de difusión, provocando el ensanchamiento normal del espacio intravascular que se encontraba comprimido, reestableciendo así, el volumen plasmático y la hemodinámica del sistema circulatorio con el transporte eficiente de electrolitos y nutrientes presentes en el plasma sanguíneo^[32] (Figura 11d).

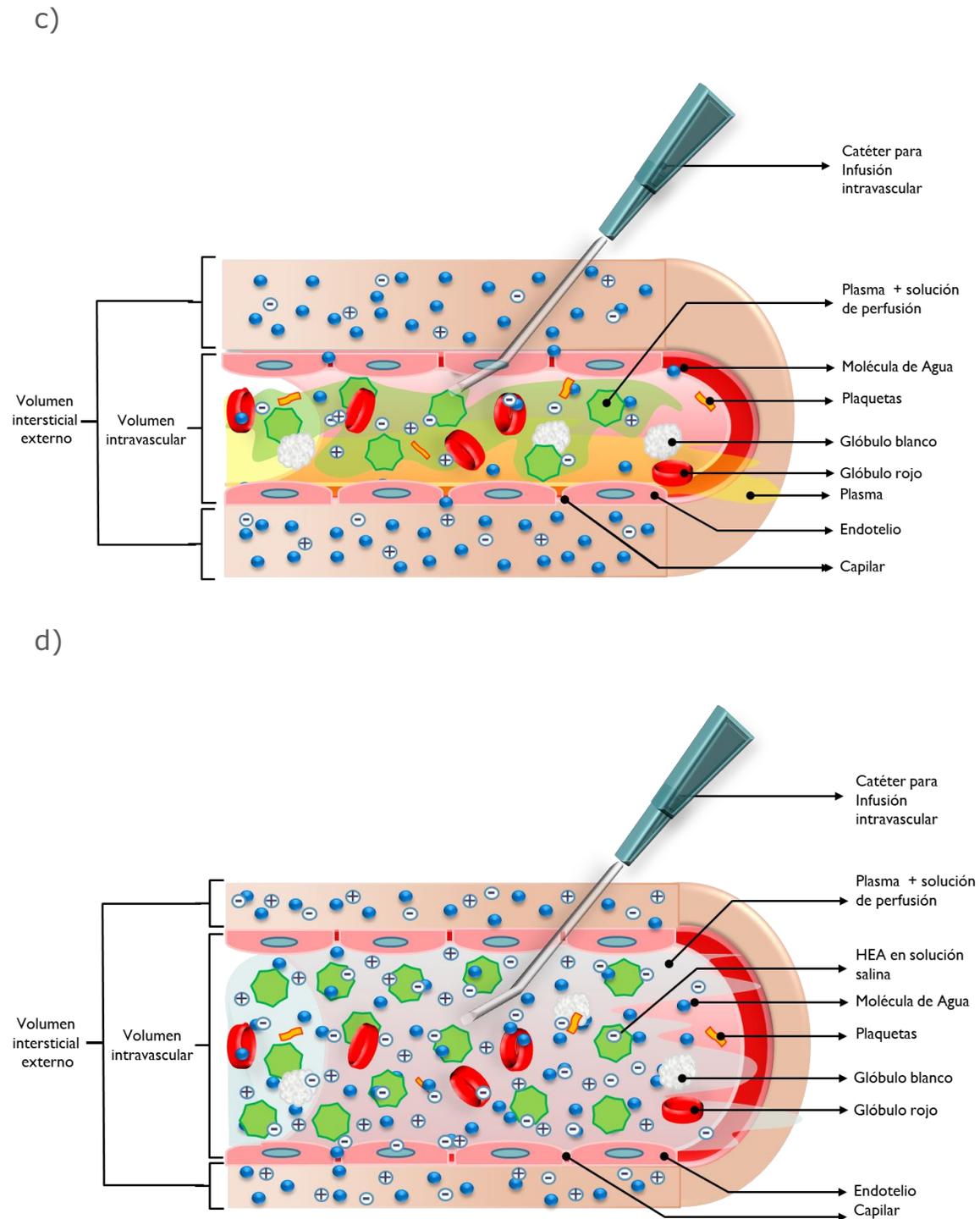


Figura 11. Corte longitudinal seccional de sistema vascular (c) Comportamiento vascular al inicio de perfusión y (d) Comportamiento vascular al final de perfusión (EOI)

La distribución comercial a nivel mundial del suero, se encuentra disponible en dos concentraciones HEA 6 y 10% (Tabla 3), ambas, en dos tipos de disolución, solución salina (SS) que contiene 9.0g (154.0mmol) de NaCl y solución salina balanceada (SSB)^[33] que contiene 0.640g de NaCl, 0.075g de KCl, 0.048g de CaCl, 0.030g de MgCl, 0.390g de NaCH₃COO, 0.170g de Na₃(C₃H₅O(COO)₃) por cada 100mL de disolución, en envase de PVC, de polipropileno (Freeflex) y de polietileno con 500mL^[34]. Cual quiera de las dos presentaciones tienen apariencia física clara o ligeramente opalescente, incolora a ligeramente amarilla. Los proveedores farmacéuticos en América latina, comercializan diversas marcas: Voluven® (Figura 12), Volulyte®, Hespan®, Hextend®, Hemohes®, Isohes®, Elohes® entre otras.

Tabla 3. Especificaciones de presentación comercial disponible de suero fisiológico de hidroxietil almidón

	HEA 6%	HEA 10%%
Osmolalidad efectiva	Solución Isooncótico	Solución hiperoncótica
Tonacidad efectiva	Solutos efectivos en concentraciones iguales a las que habitualmente hay en el plasma sanguíneo	Solutos efectivos en concentraciones mayores de las que habitualmente hay en el plasma sanguíneo
Función de solución para perfusión	1L de solución reemplaza 1L de sangre perdido	El efecto volémico excede al volumen infundido de la solución a un 145% aprox.



Figura 12. Presentación comercial de solución de perfusión de HEA

Si una solución tiene la misma osmolaridad que el plasma es isotónica, es decir, cuando tiene mayor osmolaridad es hipertónica. Por el contrario, si su osmolaridad es menor que la del plasma, es hipotónica. El término de *tonacidad* se usa para describir la *osmolaridad* que es la concentración de las soluciones biológicas.^[29]

1.3.6 Farmacocinética de hidroxietil almidón (HEA)

La farmacocinética de hidroxietil almidón (HEA) depende en mayor grado del peso molecular medio (PM), el cual define el efecto de expansión plasmático y en combinación con el grado de sustitución (GS)^[35], determina fundamentalmente la capacidad de dicha expansión (Tabla 4)^[36-37].

Tabla 4. Farmacocinética y concentraciones plasmáticas residuales de diferentes tipos de HEA después de múltiples infusiones

Tipo de HEA	Programa de infusión (g/día)	Dosis total (g)	Eliminación plasmática de HEA (mL/min)	Observaciones
450/0,7	30/3	90	<1	-
260/0,6	30/5	150	0.98	Valor medio para días 1 al 5
200/0,5	50/5	250	4.86	Valor medio para días 1 al 5
130/0,4	50/10	500	22.80	Día 1: 23.7, Día 10: 21.8

Los datos de concentración de plasma de las publicaciones originales se han convertido a % de concentración máxima (%C_{MAX}), para un mejor análisis de permanencia de los diferentes tipos de HEA:

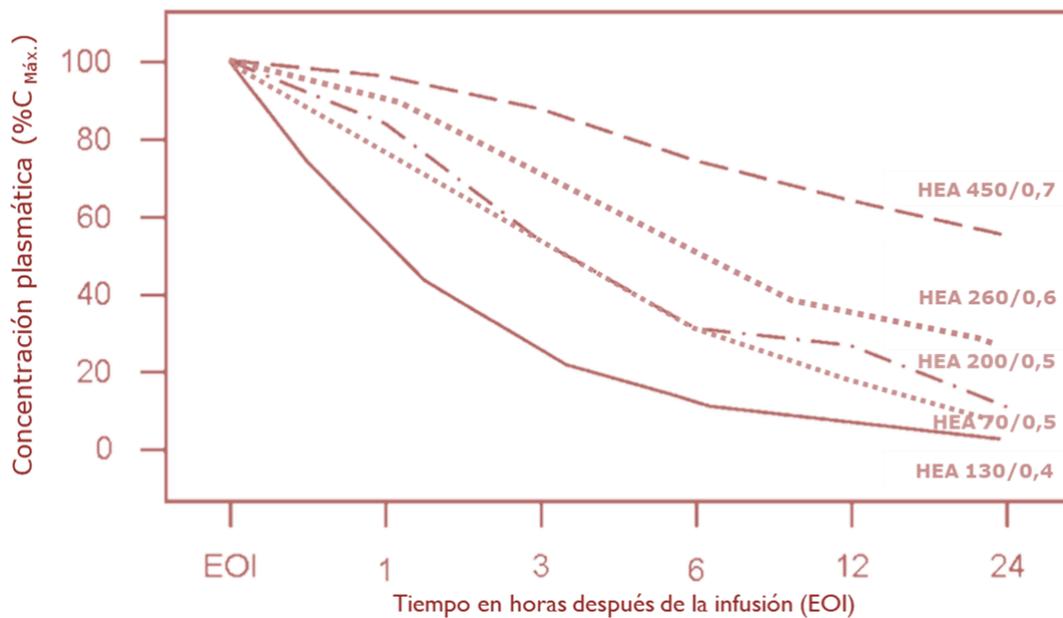


Figura 13. Gráfica de concentración porcentual de HEA residual en plasma durante las primeras 24 horas posterior a EOI=end of infusion, final de la perfusión

La gráfica (Figura 13)^[36-37], presenta el comportamiento de cuatro diferentes tipos de HEA: hetalmidón, hexalmidón, pentalmidón y tetralmidón, después de una infusión de dosis única de 500mL para HEA 450/0.7 y 130/0.4, cada una en voluntarios sanos sin sangrado previo. Para infusión de HEA 200/0.5, se extrajeron 400mL de sangre, antes de la dosificación repetitiva. Se observa el comportamiento de manera creciente, para el aclaramiento de HEA en el plasma a las 24 horas, es decir, la permanencia de HEA en plasma es HEA 130/0.4 < HEA 70/0.5 < HEA 200/0.5 << HEA 260/0.6 << HEA 450/0.7.

Posterior a la perfusión, la distribución de peso molecular medio original de hidroxietil almidón en suero fisiológico *in vivo* se modifica, debido a la hidrólisis parcial para eliminación del HEA circulante (Figura 14), el cual, se lleva a cabo por dos vías mayores, excreción renal y redistribución^[20] está última por acción de la amilasa después de 24 a 36 horas y durante los días 2 al 17, respectivamente.^[38]

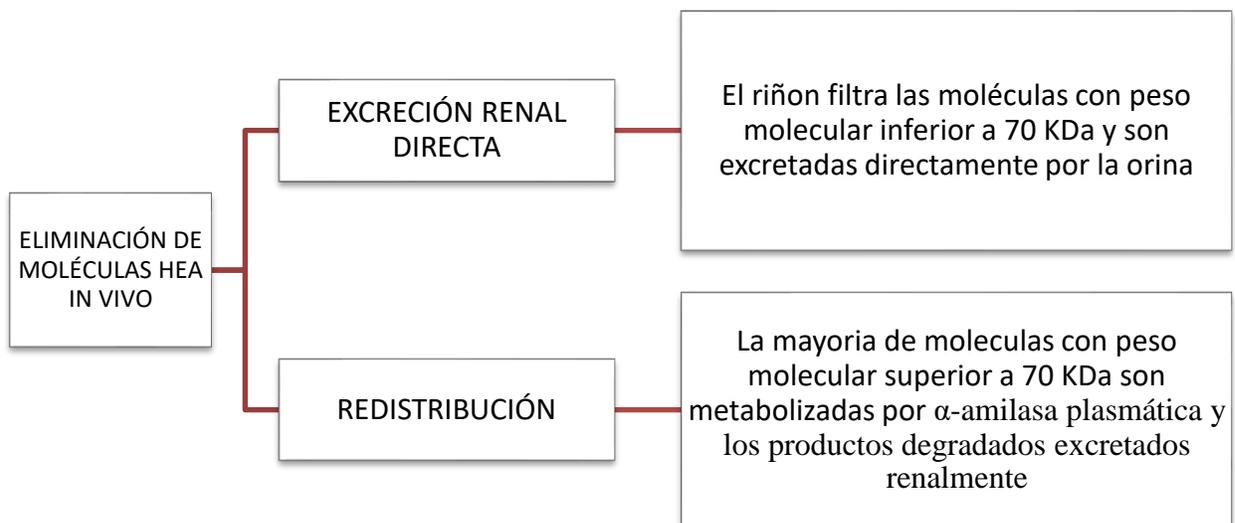


Figura 14. Diagrama vías biológicas del proceso de eliminación de suero HEA *in vivo* posterior a la infusión

1.3.7 Efectos colaterales por perfusión de hidroxietil almidón (HEA)

El peso molecular original (M_w) y el índice de sustitución C_2/C_6 (MS), son los parámetros críticos que determina sus efectos colaterales (Figura 15). Sin embargo, aunque todos los HEA sean de la misma familia, cada uno tiene propiedades que lo definen de forma particular y tienen su reflejo en la clínica, tipo de paciente y su estado al momento de la administración ^[39], ya que, la estadística en resultados de numerosos estudios, indican una tendencia más grave de los efectos colaterales para la mayoría de pacientes de países Europeos y Asiáticos que en los pocos países de Centroamérica y Sudamérica, debido a que, en América latina se tiene un mayor consumo de alimentos con alto contenido de almidón resistente^[40], factor biológico positivo que permite tener una velocidad mayor a metabolizar polisacáridos de alto peso molecular.



Figura 15. Efectos colaterales posteriores a la perfusión de suero HEA

Las moléculas de HEA de peso molecular superior a 70 KDa, superan el umbral renal, acumulándose en el tejido renal y el sistema reticuloendotelial, causando daño severo en la función renal seguida por el fracaso renal agudo, es decir, remplazo de riñón, por acumulación y permanencia prolongada, mayor a 17 días de las moléculas de hidroxietil almidón que no se eliminaron por ninguna de las dos vías principales; excreción renal y metabolización.

1.3.8 Restricciones de uso de hidroxietil almidón (HEA)

A partir del año 2008 se comienza a llevar a cabo la revisión a nivel mundial, del balance beneficio-riesgo de los medicamentos que contienen hidroxietil almidón y tras el análisis de diversos estudios de monitoreo de concentración plasmática, durante las 36 horas posteriores a la perfusión intravenosa, en pacientes tratados con sueros que contienen hidroxietil almidón, se demuestran efectos colaterales que incluyen insuficiencia renal principalmente en pacientes en estado crítico y mortalidad en pacientes con sepsis, por ello, en junio del año 2013 el Comité para la Evaluación de Riesgos en Farmacovigilancia Europeo (PRAC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA)^[41], que fomenta el acceso y el uso adecuado de medicamentos, pone en alerta a nivel global, a través de un boletín electrónico^[42] recomendando la suspensión de distribución, comercialización y administración de soluciones para perfusión con contenido de hidroxietil almidón. A partir de ese año, el análisis clínico-científico recaudo estadísticamente tasas sobre los efectos secundarios, fallo renal agudo y mortalidad, principalmente.

Para el año 2017, en países de Europa, Asia y Estados Unidos de América (EUA) se reemplazó el uso de sueros hechos con hidroxietil almidón por coloides naturales y cristaloides en fluidoterapia. Mientras que en México, países de Centroamérica y Sudamérica, han mantenido el uso de suero HEA de acuerdo con la clasificación en intervalos de distribución en peso molecular de hidroxietil almidón, considerados óptimos para el uso en suero fisiológico establecidos por la European Pharmacopoeia 8.0^[41] en conjunto con la información proporcionada para el uso adecuado en la administración médica por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).^[43] (Figura 16)



Figura 16. Restricciones según la FDA, respecto al uso de sueros con contenido de hidroxietil almidón en pacientes en shock y estado crítico

A nivel mundial, profesionales médicos respetan las guías de administración respecto al uso restringido de HEA.

En enero de 2019 se han hecho públicas todas las marcas de sueros de perfusión que son distribuidas, las cuales, deben de especificar el peso molecular y grado de sustitución permitido de la siguiente manera HEA 130/0.4 y 70/0.5.^[44]

Sin embargo, sigue en libre venta HEA 200/0.5^[45] y su administración médica en México por el Instituto Mexicano del Seguro Social con instrucciones de perfusión en su guía de Grupo No. 21 - Soluciones Electrolíticas y Sustitutos del Plasma^[46].

1.3.9 Caracterización de hidroxietil Almidón (HEA)

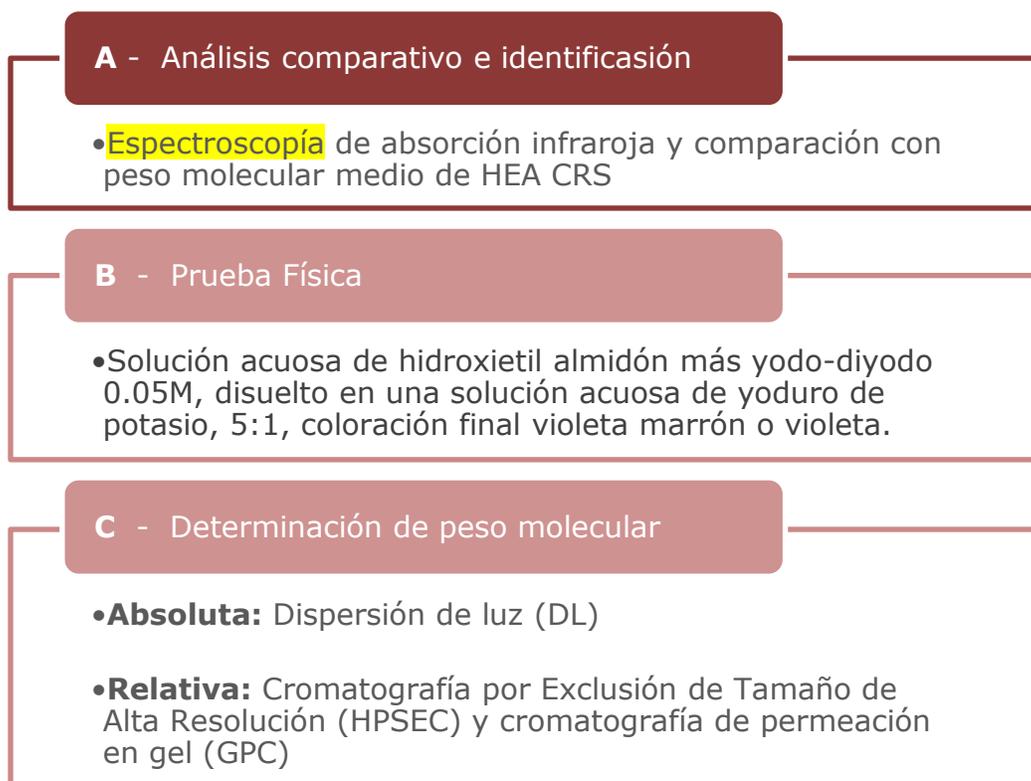
Los métodos analíticos son importantes para la caracterización de hidroxietil almidón tanto in vitro como in vivo. Este trabajo se centra en la caracterización específica de hidroxietil almidón determinando la distribución de peso molecular, complementada con técnicas de identificación para dar continuidad al control de calidad de la materia prima, que es de suma importancia para el suero de perfusión como producto final.

La Farmacopea Europea en su 8º edición (2013) establece intervalos de distribución de peso molecular (Tabla 5)^[47] y dos procesos que implican la combinación de métodos experimentales de identificación A y C o B y C. En Figura 17, se muestra a detalle las especificaciones de cada proceso, además de otros métodos de análisis para determinar peso molecular de polímeros sintéticos, como lo es hidroxietil almidón.

Tabla 5. Clasificación en intervalos de distribución de peso molecular propuesto por la European Pharmacopoeia 8.0

Distribución peso molecular (Da)		
Bajo	Medio	Alto
2 000 - 100 000	100 000 - 300 000	300 000 - 900 000

Clasificando la distribución de peso molecular *medio*, como el intervalo de peso óptimo para hidroxietil almidón en productos de uso clínico.



(A) Pharmacopoeia European 8.0(2013)^[47] (B) Ramírez Gama, R.M. y Luna Milla, B. (2011)^[35] y (C) Saviour A., U. y Moses M., S. (2016)^[48]

Figura 17. Métodos de análisis que en combinación caracterizan a hidroxietil almidón (HEA)

La combinación de los procesos experimentales anteriores da lugar a caracterizar hidroxietil almidón de manera adecuada, otorgando bases suficientes que sustenten el control de calidad de hidroxietil almidón obtenidos para uso médico hospitalario.

2. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, ha incrementado la investigación de nuevos compuestos en solución coloidal, almidones y gelatinas con modificación química, utilizada en medicina humana y veterinaria en el área de urgencias, shock, trauma, ortopedia y urgencias ginecológicas, debido a sus propiedades fisicoquímicas con capacidad de restablecer inmediatamente la deficiencia o pérdida del volumen plasmático sanguíneo y que a su vez, posterior a la infusión sea desechado de forma gradual del cuerpo sin que durante el periodo de permanencia en el cuerpo humano produzca síntomas alérgicos y toxicidad especialmente en el tejido renal.

La investigación ha trascendido desde la búsqueda de un proceso sintético adecuado para la obtención de hidroxietil almidón de peso molecular óptimo, así como el control de calidad, por medio de dos parámetros, los cuales son el grado de sustitución molar y peso molecular, siendo éste último de nuestro mayor interés pues se obtiene por distribución de peso molecular mediante el empleo de técnicas analíticas de viscosimetría, técnicas más costeables como cromatografía por exclusión de tamaño de alta resolución (HPSEC), osmometría, sedimentación y dispersión de luz, las cuales son más complejas y costosas, todas ellas permiten tener un mejor conocimiento del comportamiento de HEA en disolución.

En las últimas décadas, investigadores se han enfocado principalmente en pruebas de análisis estadístico en pacientes que requieren de la infusión de solución coloidal de hidroxietil almidón (suero comercial) con peso molecular medio óptimo de 130 KDa, establecido por

la European Pharmacopoeia 8.0, tomando como factor variante el volumen de infusión para evaluar los efectos colaterales. Sin embargo, existe información limitada respecto al estudio detallado de la macromolécula de HEA, que defina su comportamiento fisicoquímico. en solución acuosa y reguladora que ayude a la expansión de la búsqueda de nuevos métodos sintéticos que lo aproximen a ser el coloide ideal.

En el presente trabajo, se realiza la caracterización de hidroxietil almidón (HEA), determinando a través de una distribución de tamaño de partícula el peso molecular parámetro que caracteriza al HEA. Se lleva a cabo por método analítico de dispersión de luz dinámica, el cuál define la conducta en disolución de las partículas. Así mismo, en conjunto con otras técnicas, tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS), infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y picnometría de gas, complementan la caracterización propuesta a diversas muestras de hidroxietil almidón. Haciendo énfasis, de lo importante que es recurrir a diversos métodos de análisis que sustenten la caracterización de hidroxietil almidón para la verificación continua del control de calidad en el producto final como lo es el suero de perfusión.

La caracterización radica en la responsabilidad de evaluar si el peso molecular *medio* de $100\ 000 < M_w < 300\ 000$ Da (Ph. Eur. 8th 2013), de hidroxietil almidón obtenido, se encuentran dentro del intervalo óptimo para utilizarlo en soluciones de perfusión de administración médica, ya que, fuera de éste se presentan efectos colaterales e irreversibles como problemas de coagulación, reacciones alérgicas, por mencionar algunos, falla renal siendo el efecto adverso más grave, con remplazo del órgano en casos extremos, debido a la acumulación de permanencia prolongada en el tejido que forma al riñón.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

- Verificar si diversas muestras comerciales (lotes) de hidroxietil almidón (HEA) se encuentra dentro del intervalo de peso molecular óptimo para uso clínico, establecido por la farmacopea europea 8^oed (2013)

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el peso molecular, por dispersión de luz dinámica (DLS).
- Determinar cualitativamente la capacidad de hidratación de muestras hidroxietil almidón (HEA) por calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- Identificar cada muestra de hidroxietil almidón (HEA) por técnicas analíticas instrumentales: espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS), resonancia magnética nuclear (RMN) y picnometría de gas.

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1 ORIGEN DE MUESTRA

4.1.1 Manejo y Almacenamiento de HEA

Las muestras de hidroxietil almidón, son obtenidas a partir del almidón de maíz y fueron otorgadas por Laboratorios RIMSA, cada muestra fue etiquetada y almacenada en frascos de vidrio color ámbar perfectamente cerrados, para limitar el contacto con el aire del medio ambiente debido a que la muestra es higroscópica, así como minimizar la exposición a la luz que contribuye al proceso de degradación respecto al paso del tiempo. Además, de evitar una posible contaminación.

4.2 IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA HEA

4.2.1 Registro de muestra y estándar de HEA

A continuación, se presenta de manera detallada el registro de cada muestra de hidroxietil almidón y la muestra de referencia, sometidas al análisis.

Tabla 6. Registro de identificación; propiedad de origen y de estudio en muestras y estándar de HEA, en IIM-UNAM

Identificación de registro en IIM

Código de la muestra	HEA 981, HEA 880 y HEA 340
----------------------	----------------------------

Objetivo de muestreo	Obtención de tamaño de partícula por técnicas de cromatografía HPSEC -MALLS
----------------------	---

Identificación propiedad de origen

Nombre	HEA 981, HEA 880 y HEA 340
Fecha/Periodo	Septiembre 2015
Ciudad/Localidad	Jalisco, Zapopan
Propietario	Laboratorios RIMSA
Característica física	Polvo fino blanco

Identificación de estudio en IIM

Fecha de adquisición de la muestra	Agosto 2012
Persona a cargo	Salvador López Morales
Lugar	Laboratorio de Cromatografía, Instituto de investigaciones en Materiales (IIM)

Investigación y análisis	Para obtener el peso molecular medio, el polímero se caracteriza por cromatografía de exclusión de tamaño (SEC) junto con la dispersión de luz láser multi-ángulo (MALLS) (Anexo 4.1)
--------------------------	---

Identificación de estándar HEA en IIM

Nombre	European Pharmacopoeia Reference standar Hydroxyethyl Starch (Medium Mw) CRS
Fecha de apertura del frasco	Septiembre 2012 y junio 2016

4.3 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DE HIDROXIETIL ALMIDÓN (HEA)

4.3.1 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Es una técnica de análisis térmico que proporciona información sobre los efectos térmicos los cuales son caracterizados por un cambio en la entalpía y por un intervalo de temperatura en función del tiempo, cuando la muestra se calienta o se enfría. Dichos cambios comprenden la fusión, cristalización, ebullición, sublimación, la transición vítrea, transformaciones polimórficas, entalpías de fusión, capacidad calorífica,

el % de pureza, % de cristalinidad, la compatibilidad en formulaciones (principio activo y excipientes), etc.^[49]

Para el análisis térmico, se utilizó un calorímetro diferencial de barrido (DSC) Modelo 2910 de TA Instruments, cuya sensibilidad es de $3\mu\text{W}$ y la precisión en temperatura es de $\pm 0.1^\circ\text{C}$ y calibrado previamente con un estándar de indio. La atmósfera utilizada de nitrógeno (grado 5.0 analítico) con flujo controlado a $50\text{mL}/\text{min}$, de acuerdo con la norma ASTM D3418-15 – Calorimetría diferencial de barrido (DSC), parte I a III.

La muestra fue preparada en cápsula de aluminio hermética, colocando directamente en la cápsula la muestra de hidroxietil almidón, 5.0mg aproximadamente, calculada en balanza analítica. Se utilizó cápsula vacía de aluminio como referencia.

El análisis térmico se llevó a cabo, con rampa a velocidad de calentamiento fija a $2^\circ\text{C}/\text{min}$, en un intervalo de 5 a 120°C , se llevó por duplicado para cada una de las cinco muestras sólidas de hidroxietil almidón etiquetas como HEA 340, HEA 980, HEA 880, HEA STD 0616 y HEA STD 0912.

4.3.2 Espectroscopia infrarroja (FTIR)

El análisis se realiza mediante espectrometría infrarroja, es de tipo cualitativo. La técnica, permite identificar grupos funcionales de muestras sólidas, líquidas o gaseosas, ya sean orgánicas o inorgánicas.^[49]

La prueba FTIR se basa en la luz infrarroja para escanear muestras y observar las propiedades de enlace.

Los experimentos de análisis FTIR pueden identificar compuestos y el tipo general de material que se analiza cuando hay incógnitas. Esta técnica se utiliza para evaluar la pureza de algunas muestras inorgánicas y es altamente confiable para identificar la composición del polímero.^[50]

El análisis espectroscópico, se llevó a cabo, con espectrofotómetro Bruker modelo Equinox 55, intervalo de frecuencia 370-25000cm⁻¹, resolución 0.5cm⁻¹.

La preparación de la muestra consistió en colocar en la celda, cantidades pequeñas de muestra hidroxietil almidón. El análisis se realizó para las tres muestras HEA y dos muestras de referencia HEA (CRS), etiquetas como HEA 340, HEA 880 y HEA 981, HEA STD 0616 y HEA STD 0912, respetivamente.

4.3.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica sensible para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en solución, por movimiento browniano que es un efecto que se desarrolla como resultado de moléculas y/o partículas que fluyen chocando entre sí y causando su movimiento.^[51] Dicho movimiento de partículas, da lugar a la difusión a través de la suspensión, donde la velocidad de difusión depende del tamaño de las partículas, por ejemplo; es más rápida para las partículas pequeñas.

Las partículas se mueven bajo ciertas condiciones, que producen cambios en la medición de la frecuencia de luz que interactúa. La determinación del desplazamiento de frecuencia que ocurre cuando la luz interactúa con partículas de diferente tamaño, permite el cálculo de tamaño de partícula y con éste el peso molecular.^[48]

El análisis por dispersión de luz dinámica (DLS) se llevó a cabo con el equipo Microtrac Nanotrac Wave, con un alcance en tamaño de partícula de 0.8 a 6,500.0nm y peso molecular de 300 a 20×10^6 Daltons (Da), ángulo de 180° e intervalo de pH 2 a 12, utilizando Software Microtrac FLEX® 11.0.02 y métodos de cálculo; Debye y Debye-Hydro (Figura. 18).

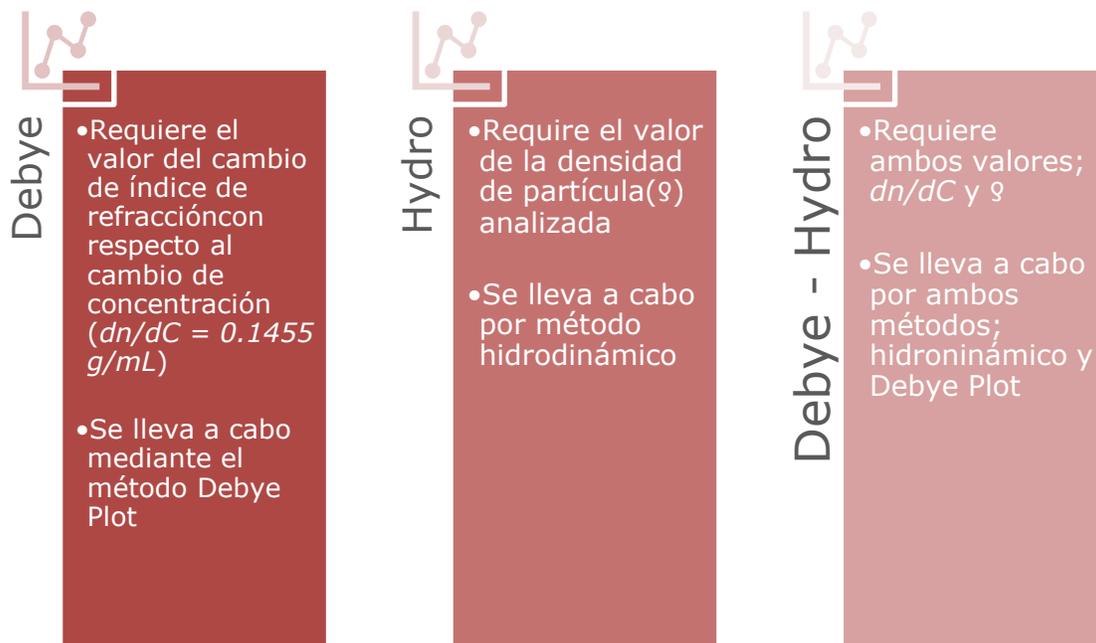


Figura 18. Métodos de cálculo para determinar la distribución de peso molecular, especificados en Software Nanotrac FLEX®

Preparación de muestras

- **Disolución Buffer:**

Se disolvieron 54.34g de acetato de sodio (99%*m/m*) en agua desionizada (H_2O)_{des}, se agregaron 100.0mL de ácido acético glacial al (99.5% *v/v*) ambos adquiridos en Sigma Aldrich México. La disolución se llevó hasta marca de aforo a 1000.0mL con agua desionizada.

- **Preparación de disoluciones de HEA:**

Se prepararon cinco disoluciones por cada lote, referente a tres muestras (lotes) de hidroxietil almidón otorgadas por Laboratorios RIMSA y cinco disoluciones de la muestra de referencia (CRS), con la fecha de abertura de frasco más reciente, otorgada en el Instituto de Investigaciones en Materiales en laboratorio de Cromatografía, cada una, llevada hasta marca de aforo en 25.0mL con disolución buffer de acetatos, antes mencionada, en un intervalo de concentración de 1.2 a 70.0 mg/mL aproximadamente (Tabla 7).

Tanto las muestras, como el estándar de HEA fueron previamente secadas en estufa a 90°C y posteriormente colocadas en desecador, se pesaron utilizando balanza analítica calibrada marca Ainswoth, modelo AA-250 y resolución de 0.1mg.

Tabla 7. Identificación y concentración de disoluciones hidroxietil almidón para análisis DLS

Identificación	Nombre de la muestra	No. de muestra	Concentración (mg/mL)
A: HEA 981	HEA 37 981	A1	1.358
		A2	2.932
		A3	4.964
		A4	12.438
		A5	20.918
B: HEA 880	HEA 37 880	B1	1.286
		B2	2.834
		B3	4.866
		B4	12.230
		B5	20.542
C: HEA 340	HEA 37 340	C1	35.680
		C2	53.630
		C3	71.600
		C4	77.290
D: STD 016	HEA STD 0616	D1	0.188
		D2	0.296
		D3	0.638
		D4	1.308
		D5	2.848

La medición se llevó a cabo colocando en celda del Microtrac, 2.0mL de disolución de hidroxietil almidón, enjuagando la celda con agua destilada previó a cada medición, la cual, se llevó a cabo por triplicado para cada concentración. Se utilizó agua destilada como blanco.

4.3.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Es una de las herramientas más potentes con la que se cuenta para la determinación de estructuras moleculares.^[49]

La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) está basada en el parámetro cuántico (s) o espín nuclear del núcleo atómico, el cual, se orienta y hace un movimiento de precesión al estar bajo la influencia de un campo magnético (B). A su vez, dicho movimiento queda en el rango de las radiofrecuencias de modo que, si el núcleo es bombardeado con una radiofrecuencia que modifique tal orientación será posible observar el fenómeno de resonancia.^[52] Además, es una técnica rápida y se utiliza una cantidad pequeña de muestra y no es destructiva.

Se recurrió a la espectroscopia de resonancia magnética nuclear como herramienta analítica útil para identificar la compleja estructura a escala molecular de hidroxietil almidón.

El análisis de espectroscopía se realizó con equipo de resonancia magnética nuclear Bruker modelo RMN Avance 400, software XWIN-NMR 3.1 en plataforma WINDOWS 2000, de acuerdo con la norma ASTM E0386-90R04-Práctica para la presentación de datos relacionados con la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) de alta resolución.

Los experimentos realizados fueron protón en una dimensión (1D). Para el procesamiento de calibrado se tomó la señal del disolvente como señal de referencia.

La preparación de la muestra consistió, en disolver una cantidad mínima de muestra de HEA (punta de espátula) en 1.0mL de agua deuterada (D₂O) posteriormente la disolución se transvaso con pipeta Pasteur a un tubo de RMN de cinco milímetros (0.5cm) de diámetro y seis pulgadas (15.24cm) de alto, se llenó hasta una altura de cinco centímetros (5cm) y se tapó con tapón de plástico respectivo. El análisis se llevó a cabo para la muestra referencia de hidroxietil almidón etiquetada como HEA STD 0616.

4.3.5 Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)

El análisis de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X, también conocida como espectroscopía electrónica para análisis químico (ESCA)^[53] es una técnica para analizar la química de la superficie de un material y es una de las herramientas estándar para la caracterización de superficies,^[54] ya que, la superficie del material es el punto de interacción con el entorno externo y otros materiales.

Por espectroscopía XPS se determina la composición elemental, la fórmula empírica, el estado químico y el estado electrónico de los elementos dentro de un material.^[55]

El experimento consiste en colocar la superficie a analizar en un entorno de vacío para posteriormente irradiarla con fotones. Para XPS, la fuente de fotones está en el rango de energía de rayos X. Los átomos irradiados emiten electrones (fotoelectrones) después de la transferencia directa de energía desde el fotón a los electrones a nivel del núcleo. Los fotoelectrones emitidos por los átomos cercanos a la superficie pueden escapar a la cámara de vacío y separarse de acuerdo con la energía y contarse.^[53]

Es un método analítico conocido como espectroscopia electrónica, llamadas así porque se miden los electrones^[53], es decir, el espectro de fotoelectrones se registra contando los electrones expulsados en un rango de energías cinética de electrones, en el cual, se muestran picos, los cuales, aparecen en el espectro de los átomos que emiten electrones de una energía característica particular. Las energías e intensidades de los picos de fotoelectrones permiten la identificación, proporcionando información cualitativa y cuantitativa sobre todos los elementos presentes

a nivel nanométrico en la parte exterior de la superficie a excepción de helio e hidrógeno.^[56]

El análisis de espectroscopía XPS se llevó a cabo con equipo Physical Electronics modelo VERSAPROBE II, fuente de luz ultravioleta (UPS), resolución espacial de 10 micras, haz monocromático de aluminio, interfaz SmartSoft y software PHI MultiPak®.

4.3.6 Picnometría de gas

La densidad es un valor útil para clasificar, detectar diferencias en la composición química entre muestras similares, indicar fases mineralógicas o cambios de fase, calcular la porosidad total cuando se conoce la densidad aparente^[57] y cualquier otro método de prueba que requiera este valor para el cálculo de resultados.

La picnometría de gases es la técnica que utiliza el método de desplazamiento de gas inerte^[57] como el helio o el nitrógeno, ya que, las moléculas de ambos gases llenan rápidamente poros tan pequeños aproximadamente de un angstrom (1\AA) de diámetro^[58] y permite medir de manera verdadera y absoluta el volumen y densidad de forma no destructiva.

El proceso de experimentación instrumental es rápido y totalmente automático en el que el control exhaustivo de temperatura y de presión del gas brinda resultados con alta precisión^[57]. El funcionamiento en general consiste en introducir la muestra en el compartimento sellado de volumen conocido. Bajo indicaciones de manejo automático, se introduce

gas inerte apropiado y después se expande a otro volumen interno de precisión. Las presiones observadas al llenar la cámara de muestreo y luego descargarla en una segunda cámara vacía permite el cálculo del volumen de la fase sólida de la muestra. El valor obtenido se divide entre el peso de la muestra dando como resultado la densidad por desplazamiento de gas.

El análisis de densidad absoluta se llevó a cabo, en equipo picnómetro Micrometrics modelo AccuPyc II 1340, reproducibilidad de $\pm 0.01\%$ del volumen nominal de la celda en cámara de muestra a escala completa y reproducibilidad de $\pm 0.02\%$ del volumen nominal a gran escala en muestras limpias, secas y térmicamente equilibradas utilizando helio en el rango de 15 a 35°C, con software Accupyc II v1.09, con gas helio grado técnico, de acuerdo con la norma ASTM C604-02 - Método de prueba estándar para la gravedad específica verdadera de materiales refractarios por picnómetro de comparación de gas.

Se colocaron las muestras de hidroxietil almidón en la celda de compartimento de muestra, previamente fueron secadas en estufa a 90°C y posteriormente colocadas en desecador. Se pesaron utilizando balanza analítica calibrada marca Ainswoth modelo AA-250 y resolución de 0.1mg.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS

5.1 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

El análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para hidroxietil almidón se ha utilizado como método de identificación y reconocimiento de transiciones o modificaciones con aporte a la caracterización en las propiedades térmicas como capacidad de hidratación, asociada al gránulo de hidroxietil almidón.

Midiendo el flujo de calor, en función de la temperatura se obtuvieron los termogramas respectivos al análisis térmico: calentamiento (Figura 19) y recalentamiento (Figura 20) de las muestras hidroxietil almidón frente a dos muestras de referencia con el objetivo de seleccionar la muestra estándar más adecuada con base en el reconocimiento del comportamiento de mayor similitud respecto a las demás muestras HEA.

Se realizó el recalentamiento de la muestra para tener mayor conocimiento del comportamiento de hidroxietil almidón, ya que, algunos estudios^[59-60] por DSC han demostrado transformaciones durante el calentamiento posterior al enfriamiento.

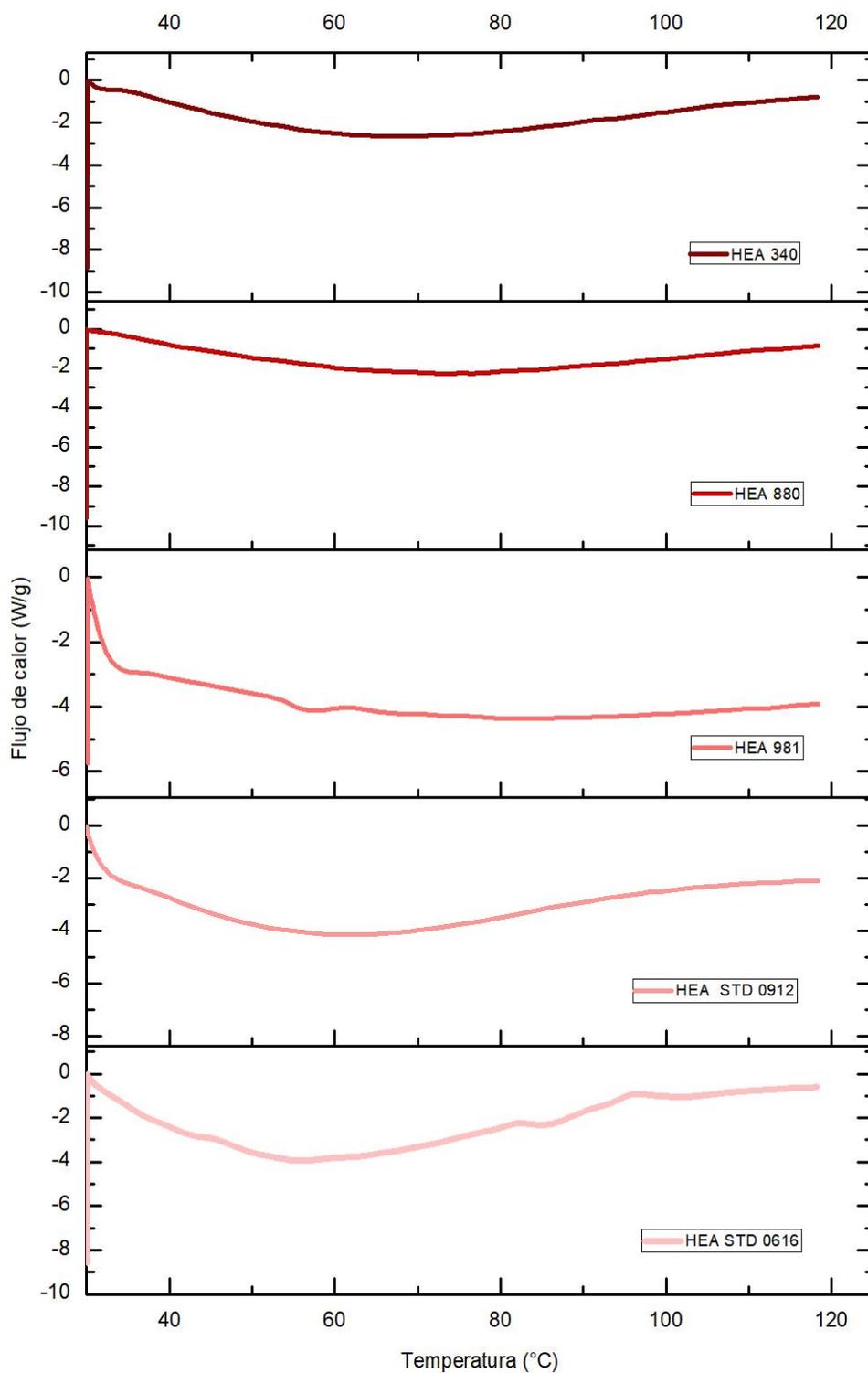


Figura 19. Termograma - hidroxietil almidón (HEA) de calentamiento por DSC con dos muestras estándar (CRS)

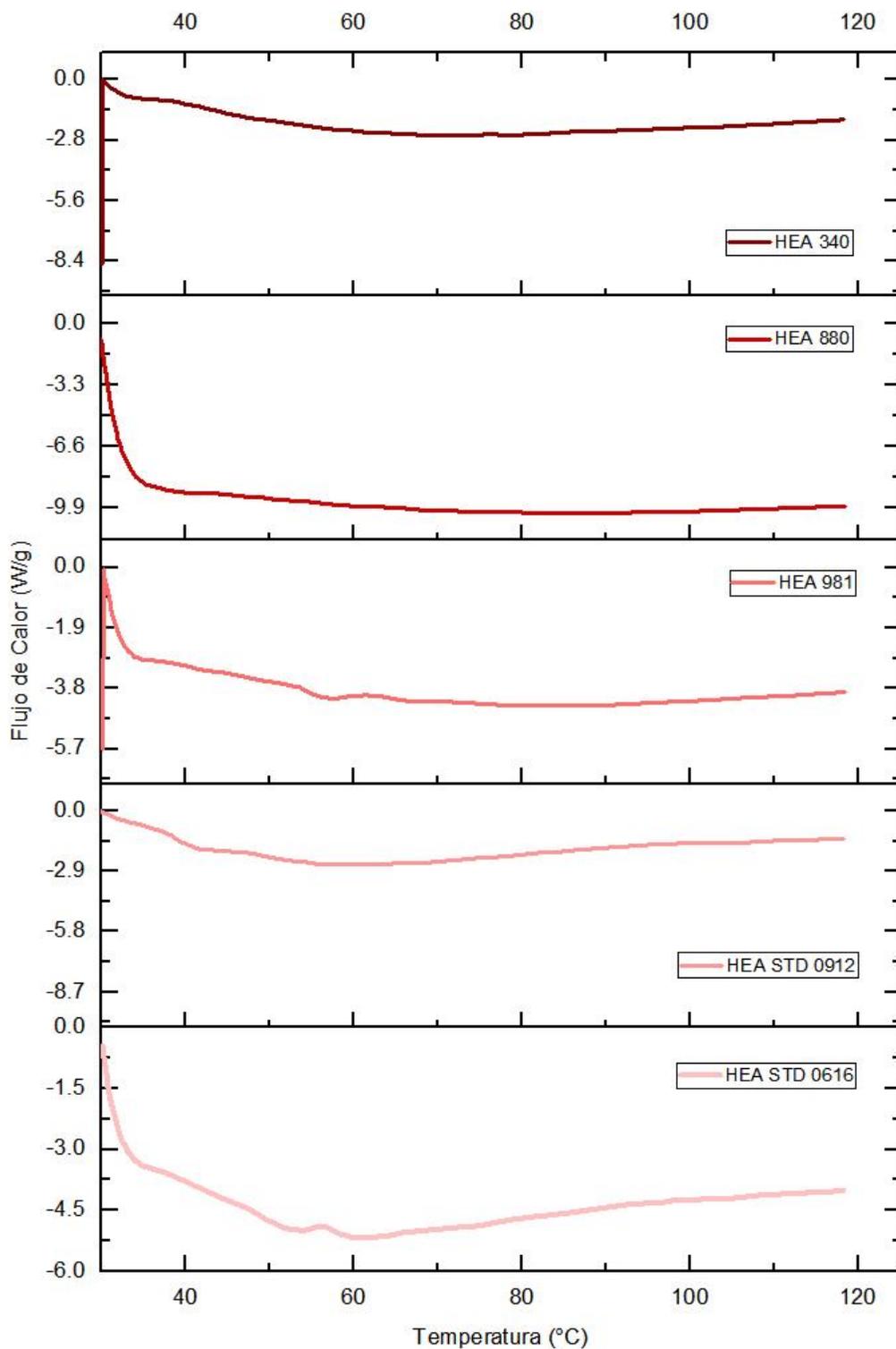


Figura 20. Termograma - hidroxietil almidón (HEA) de recalentamiento por DSC, con dos muestras estándar (CRS)

En termograma de recalentamiento se presenta un cambio de tendencia exponencial a diferentes valores de flujo de calor a valores cercanos a -3.0 W/g para las muestras HEA 981, STD 0616 y -7.6 W/g para la muestra HEA 880, esta diferencia, se asocia a un estado de transición en el estado fisicoquímico del granulo de hidroxietil almidón, que implica la transformación de estructuras amorfas a cristalinas en la molécula de hidroxietil almidón.

Por otro lado, el termograma de calentamiento muestra, tendencia general con similitud en todas las muestras, en el cual, se observa a temperatura $<70^{\circ}\text{C}$ que la pendiente cambia levemente de ser negativa a positiva, este cambio tan pequeño se atribuye para todos los casos en fenómenos relacionados con la capacidad de hidratación asociado al proceso de absorción de moléculas de agua hacia las zonas estructurales amorfas y cristalinas del granulo característico que forma HEA, las cuales terminan ligándose provocando disminución en número y tamaño de las regiones ordenadas, es decir, la leve meseta observada durante el aumento de temperatura se relaciona al hinchamiento del granulo, asociado a la capacidad de adsorción de moléculas de agua que se encuentran en la superficie de la muestra de hidroxietil almidón, las cuales se absorben a regiones amorfas, amilosa hidroxetilada, y posteriormente a las regiones cristalinas, amilopectina hidroxetilada, conforme se incrementan las condiciones de temperatura, provocando el aumento en volumen del granulo por fenómeno de enlaces tipo puente de hidrogeno, entre los grupos hidróxido del hidroxietil almidón y los hidrógenos de las moléculas de agua.

Esta capacidad de hidratación que modifica la naturaleza estructural del hidroxietil almidón debería observarse en dos pequeñas mesetas, identificada a cada región estructural amorfa $<70^{\circ}\text{C}$ y cristalina $<100^{\circ}\text{C}$, como lo es el caso de la muestra HEA STD 0616 (Figura 18). Sin embargo,

el hecho de que solo se observe la primera meseta en intervalo de temperatura de 50 a 70°C, asociada a la región amorfa, nos indica que la región cristalina formada por la amilopectina, contiene mayor proporción de ramificaciones de tipo H, CH₂CH₂OH o enlace glucosídico α-1,6, estudiado en el análisis estructural de hidroxietil almidón sección 1.3.2, lo que conlleva a la formación de cadenas cortas y débiles interacciones por impedimento estérico, dificultando mantener la integridad de los gránulos hinchados, los cuales se rompen cooperativamente durante el calentamiento y no permite la observación por análisis calorimétrico DSC a velocidad de calentamiento 2 °C/min. Cabe destacar, que las muestras de hidroxietil almidón son provenientes del maíz, con un alto contenido en amilopectina >75% (sección, 1.2.1).

Esta analogía es aplicable a polímeros sintéticos como un proceso facilitado por partículas del medio que hacen la función de solvente.^[61]

Fuera de este análisis térmico que ha permitido identificar en un sistema compuesto por hidroxietil almidón y agua en la estructura del gránulo, no se muestra comportamiento de transiciones de fase, polimorfismos o descomposición del hidroxietil almidón.

Para una mejor observación de los endotermas, se recomienda realizar el análisis térmico a velocidades de calentamiento superiores a 2°C/min.

Se seleccionó el estándar de hidroxietil almidón etiquetado como HEA STD 0616, para pruebas posteriores, ya que, muestra con mayor similitud una tendencia respecto a las demás muestras.

5.2 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A continuación, se muestra el espectro de hidroxietil almidón (Fig. 21). La recopilación de análisis de identificación de bandas asociadas a cada señal en el espectro obtenido se muestra en Tabla 8.

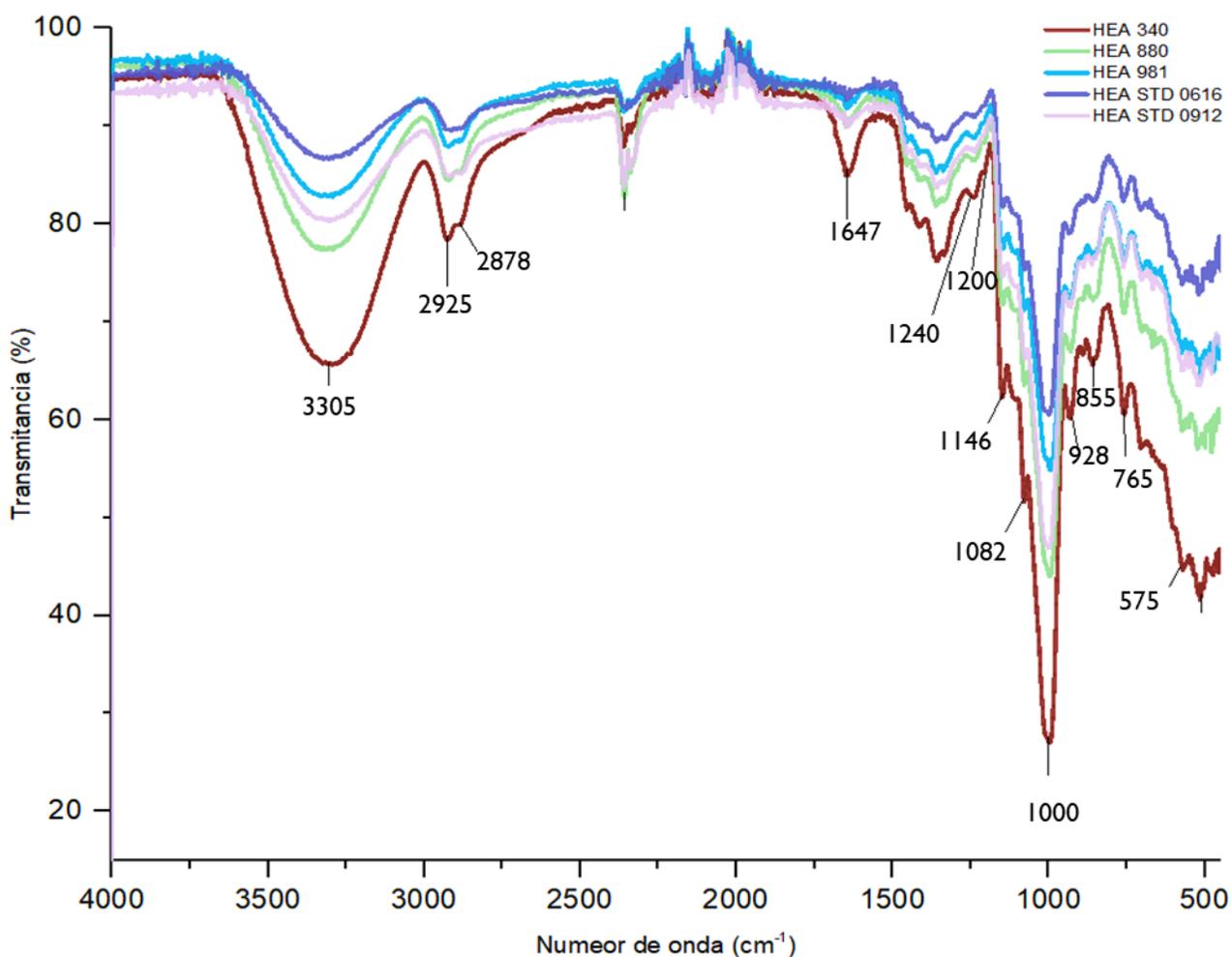


Figura 21. Análisis por FTIR de hidroxietil almidón (HEA)

Tabla 8. Identificación de bandas y atribución asociada al análisis de FTIR para hidroxietil almidón

Banda (cm ⁻¹)	Asignación
3650 - 3300	Estiramiento o tensión grupo -O-H
2950 - 2850	Vibración de tensión del grupo -C-H (sp ³)
1647	Vibración por flexión grupo -O-H
1450 - 1360	Vibraciones de flexión -C-H Vibraciones de tensión del grupo C-O-C Vibraciones de flexión por grupo -OH
1280 - 900	Estiramiento de enlace -C-O
1000	Vibración, deformación y tensión grupo -C-O-C
928, 861, 765, 575 y 510	Vibraciones de estiramiento, anillo anhidro glucosa

El espectro obtenido de ambas muestras de referencia etiquetadas como HEA STD 0616 y 0912 muestra las mismas bandas de absorción que el espectro obtenido para las muestras de hidroxietil almidón etiquetadas como HEA 880, 981 y 340. Sin embargo, todas difieren en la intensidad de algunas bandas de absorción, debido a mayor o menor contribución de los grupos funcionales, por ejemplo, la señal observada en 3305cm⁻¹, correspondiente a los grupos hidroxilo (-OH). La amplitud de la banda indica principalmente la variación respecto a la cantidad de muestra de hidroxietil almidón colocada y la presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares asociadas a la cantidad de partículas de agua presentes en la muestra marcando la siguiente tendencia respecto a la cantidad de humedad:

HEA 340 > HEA 880 > HEA STD 0912 > HEA 981 > HEA STD 0616,

Además, la banda en 1647cm⁻¹ correspondiente a flexión de grupos -OH del agua, lo que nos indica que el polímero es higroscópico.

En la región de 1000 a 1150cm⁻¹ se observa una fuerte banda con tres señales (picos) característica de los compuestos polisacáridos^[62]

atribuida a deformaciones por vibraciones de tensión del grupo C–O–C y a vibraciones de flexión por grupos -OH debido a que en la estructura de hidroxietil almidón las interacciones de enlace C-O se presentan en diferentes ambientes químicos, los cuales son C-OH, $-(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ y C-O-C.

Se corrobora la elección de la muestra estándar HEA STD 0616 para pruebas de análisis posteriores, ya que, las señales fueron al mismo número de onda con respecto a las demás muestras HEA, se consideró también, la fecha de apertura del frasco siendo éste el estándar más recientemente abierto.

Cabe destacar que todas las muestras de hidroxietil almidón, analizadas por espectroscopía FTIR presentan bandas de absorción a las longitudes de onda asociadas a grupos específicos, los cuales, están presentes en la estructura hidroxietil almidón, como se observa en las Figuras 6 y 7 (sección 1.3.1).

5.3 DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

En la caracterización anterior de análisis térmico por DSC y espectroscopía FTIR se observó la alta capacidad de adsorción en el granulo de HEA, es por ello que, para el análisis de dispersión de luz se utilizó una solución buffer de acetatos como disolvente que además de amortiguar la disolución a pH=4.3 tendrá una mayor interacción con las moléculas de agua del medio dejando a la molécula de hidroxietil almidón en menor grado de solvatación, es decir, de esta manera se logra minimizar las interacciones de los grupos hidroxilo (-OH) de HEA con los hidrógenos de las moléculas de agua y que en presencia de un medio no amortiguado

las moléculas de agua que rodean al granulo de hidroxietil almidón tendrían una influencia importante con valores mayores en la medición de tamaño y volumen de partícula, parámetros que conllevan a la medición del peso molecular por DLS. Además, la disolución de hidroxietil almidón a valores menores de pH provoca la hidrólisis de la molécula de HEA, generando resultados de peso molecular mucho menores y erróneos al peso molecular verdadero de la molécula.

Tabla 9. Distribución de peso molecular para disoluciones de hidroxietil almidón en análisis DLS por método Debye

DEBYE				
Muestra	No. de Corrida	Mw (Da)	A₂ (mL/g · Da)	R
STD 0616	1	154 000.0	4.53 x10 ⁻⁴	0.830
	2	158 000.0	2.47 x10 ⁻⁴	0.933
	3	144 000.0	5.47 x10 ⁻⁴	0.780
HEA 981	1	133 000.0	4.07 x10 ⁻⁴	0.655
	2	132 000.0	5.52 x10 ⁻⁴	0.944
	3	130 000.0	3.34 x10 ⁻⁴	0.625
HEA 880	1	129 000.0	3.07 x10 ⁻⁴	0.974
	2	138 000.0	3.48 x10 ⁻⁴	0.889
	3	137 000.0	4.35 x10 ⁻⁴	0.910
HEA 340	1	142 000.0	3.49 x10 ⁻⁴	0.991
	2	165 000.0	3.26 x10 ⁻⁴	0.995
	3	136 000.0	3.63 x10 ⁻⁴	0.984

[63] Mw = Distribución de peso molecular, A₂ = 2do coeficiente del virial (Apèndice 3.2-Sec. III), R = Coeficiente de correlación.

Tabla 10. Distribución de peso molecular para disoluciones de hidroxietil almidón en análisis DLS por método Debye - Hydro

<u>DEBYE - HYDRO</u>				
Muestra	No. de Corrida	Mw (Da)	A₂ (mL/g · Da)	R
STD 0616	1	145 000.0	3.79 ×10 ⁻⁴	0.654
	2	150 000.0	4.60 ×10 ⁻⁴	0.972
	3	140 000.0	12.90 ×10 ⁻⁴	0.999
HEA 981	1	120 000.0	7.59 ×10 ⁻⁴	0.783
	2	143 000.0	2.97 ×10 ⁻⁴	0.982
	3	116 000.0	1.90 ×10 ⁻⁴	0.950
HEA 880	1	108 000.0	14.10 ×10 ⁻⁴	0.953
	2	138 000.0	3.35 ×10 ⁻⁴	0.947
	3	135 000.0	4.79 ×10 ⁻⁴	0.992
HEA 340	1	150 000.0	4.60 ×10 ⁻⁴	0.972
	2	158 000.0	3.90 ×10 ⁻⁴	0.984
	3	120 000.0	2.59 ×10 ⁻⁴	0.985

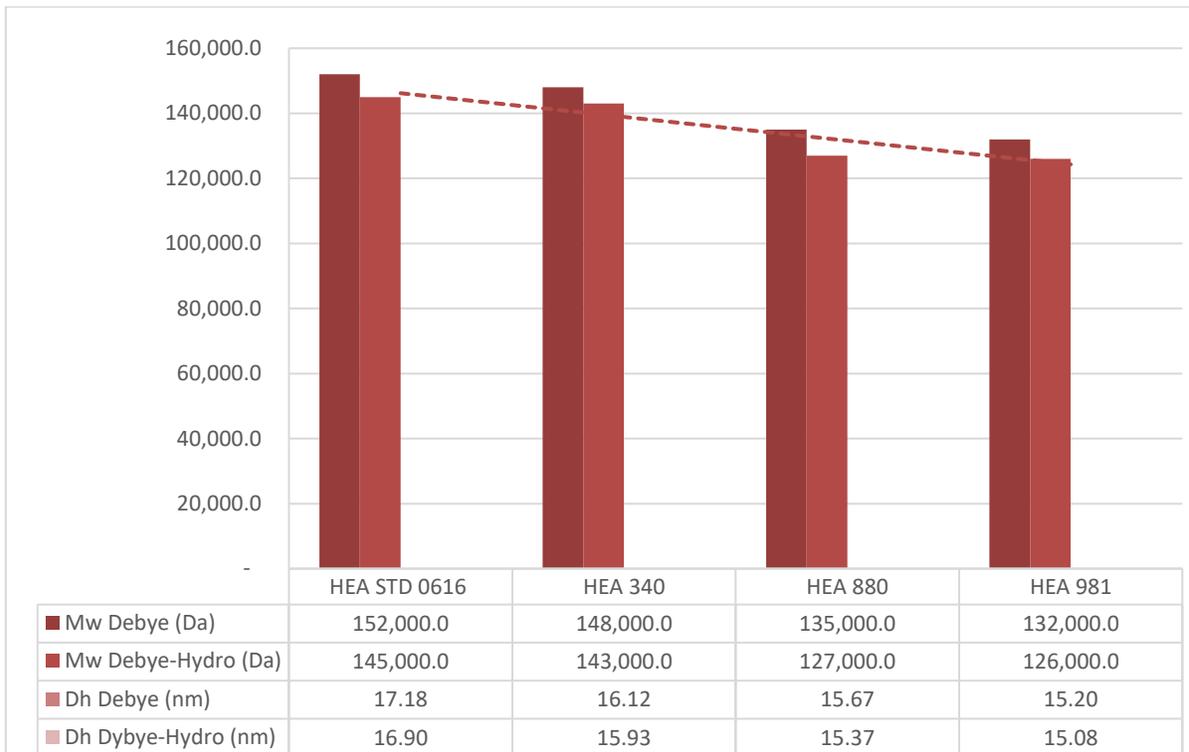
[63] Mw = Distribución de peso molecular, A₂ = 2do coeficiente del virial (Apèndice 3.2-Sec. III), R = Coeficiente de correlación.

Los resultados obtenidos por el análisis de dispersión de luz dinámica se encuentran recopilados en Tabla 9 y 10, el análisis se realizó por triplicado para cada disolución de hidroxietil almidón, por diferentes métodos Debye y Debye – Hydro, con la finalidad de obtener información sobre ambos métodos y comparar la distribución de peso molecular obtenido entre sí.

La determinación del peso molecular promedio (Mw), se basa en el hecho de que una molécula más grande contiene más de la masa total de la

muestra polimérica que las moléculas pequeñas^[64], radica en un análisis estadístico de las mediciones de parámetros hidrodinámicos; radio y diámetro hidrodinámico (Rh y Dh) que implica la distribución de volumen y tamaño de las partículas suspendidas en la disolución coloidal de hidroxietil almidón.

Para mayor comprensión de este análisis se realiza una recopilación, la cual, muestra en la Figura 22 los valores promedio del peso molecular y el diámetro hidrodinámico obtenido en cada método y para cada muestra.



Mw = Distribución de peso molecular, Dh = Diámetro hidrodinámico

Figura 22. Distribución de peso molecular y diámetro hidrodinámico promedio para hidroxietil almidón por análisis DLS métodos plot Debye y Debye-Hidro

El método Debye proporciona valores de distribución de peso molecular mayores respecto a los obtenidos por el método Debye-Hydro, ya que, no considera el parámetro de densidad de partícula en función del peso y volumen de las partículas.

En ambos métodos se observa la misma tendencia del mayor peso molecular y diámetro hidrodinámico para HEA STD 0616 y el menor para HEA 981

Para las muestras HEA 880 y 981 se observa una pequeña diferencia de 1 000 Da ,respecto al peso molecular, indicándonos que ambas moléculas tienen similitud.

Hay que tomar en consideración, con respecto a los valores obtenidos, que el sistema de análisis de dispersión es sistema coloidal de hidroxietil almidón en dos disolventes, en el cual, uno de los disolventes solvata preferencialmente al polímero HEA, para este caso el agua, los valores de la intensidad difundida por el polímero se ven afectados por variaciones locales en el índice de refracción^[65] debidas al fenómeno de solvatación preferencial. Esto da lugar a que se obtengan pesos moleculares aparentes, pero aproximados, para el polímero al efectuar la extrapolación y metodología de cálculo.

Completando el análisis recurrimos al estudio en disolución de hidroxietil almidón por dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando solo agua como disolvente, presentado anteriormente en artículos académicos el análisis teórico cuántico de la solvatación de la macromolécula de hidroxietil almidón ([Apéndice 3.1](#)) y el análisis experimental por DLS del comportamiento de hidroxietil almidón ([Apéndice 3.2](#)) ambos en disolución acuosa que indicaron valores mayores en la medición de tamaño y volumen de partícula debido a la influencia de moléculas de agua en la molécula en un medio acuoso sin disolución buffer.

5.4 ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Solamente la muestra de hidroxietil almidón etiquetada como HEA STD 0616 fue caracterizada por RMN y se ilustra en la Figura 23 el análisis de espectroscopía RMN ^1H , el cual muestra diversos picos, los cuales, se analizan por secciones y debido a que el hidroxietil almidón es molécula biológica algunas de las señales se traslapan.

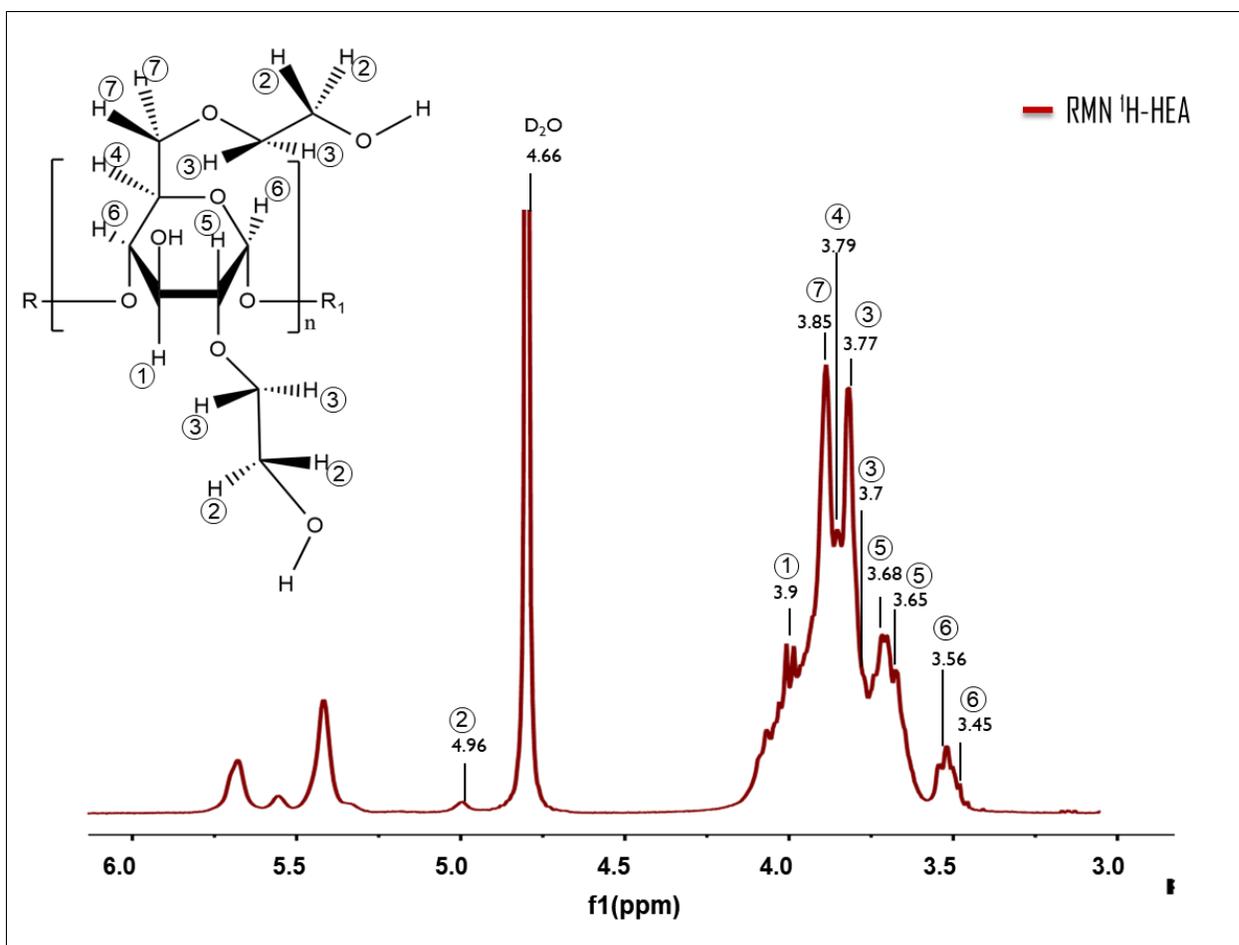


Figura 23. Espectro RMN ^1H de hidroxietil almidón (HEA)

Las señales en 3.0 a 5.9ppm están asociadas a los componentes presentes en la estructura de hidroxietil almidón.

La señal en 4.6ppm corresponde a las antenas del disolvente deuterio y el intervalo 0.5 a 2.0ppm está asociada a impurezas del mismo utilizado para el análisis de muestras en el laboratorio de resonancia y que fue reconocido al correr muestras posteriores de compuestos diferentes a hidroxietil almidón, dicha intervalo se eliminó.

Se representa el análisis de protón en 1D (Figura 24), mostrando las señales de picos máximos, las cuales, han sido identificadas y asignadas, con base en literatura, correspondiente a cada uno de los hidrógenos presentes en la estructura de hidroxietil almidón y se han recopilado en Tabla 11.

Tabla 11. Identificación de picos máximos y atribución asociada en análisis de espectroscopia RMN ^1H para hidroxietil almidón

Señal (ppm)	Asignación
4.8 – 4.6	Agua residual y disolvente D_2O
3.6 – 3.4	Hidrógenos de almidón (enlazados al anillo) vecinos al enlace glucosídico
3.8 – 3.7	Hidrógenos producto de la etoxilación
3.9 - 3.8	Hidrógenos vecinos al enlace glucosídico y adyacentes a grupo -OH
0 – 3.0	Impurezas del disolvente (D_2O)

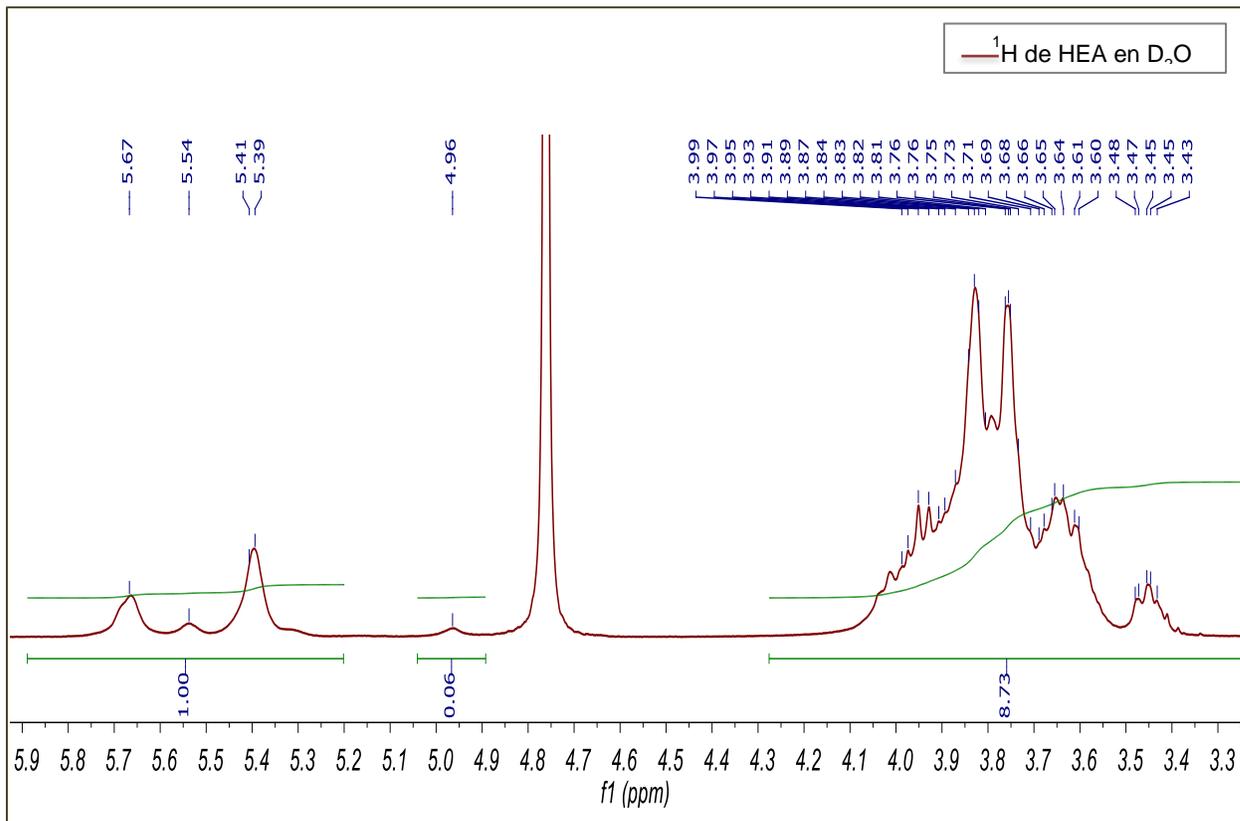


Figura 24. Análisis de espectro RMN ¹H de hidroxietil almidón en D₂O

5.5 ESPECTROSCOPIA DE FOTOELECTRONES DE RAYOS X (XPS)

El análisis de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X realizado a muestras de hidroxietil almidón, etiquetadas como HEA 340, 880, 981 y STD 0616 obtuvo el espectro observado en Figura 25.

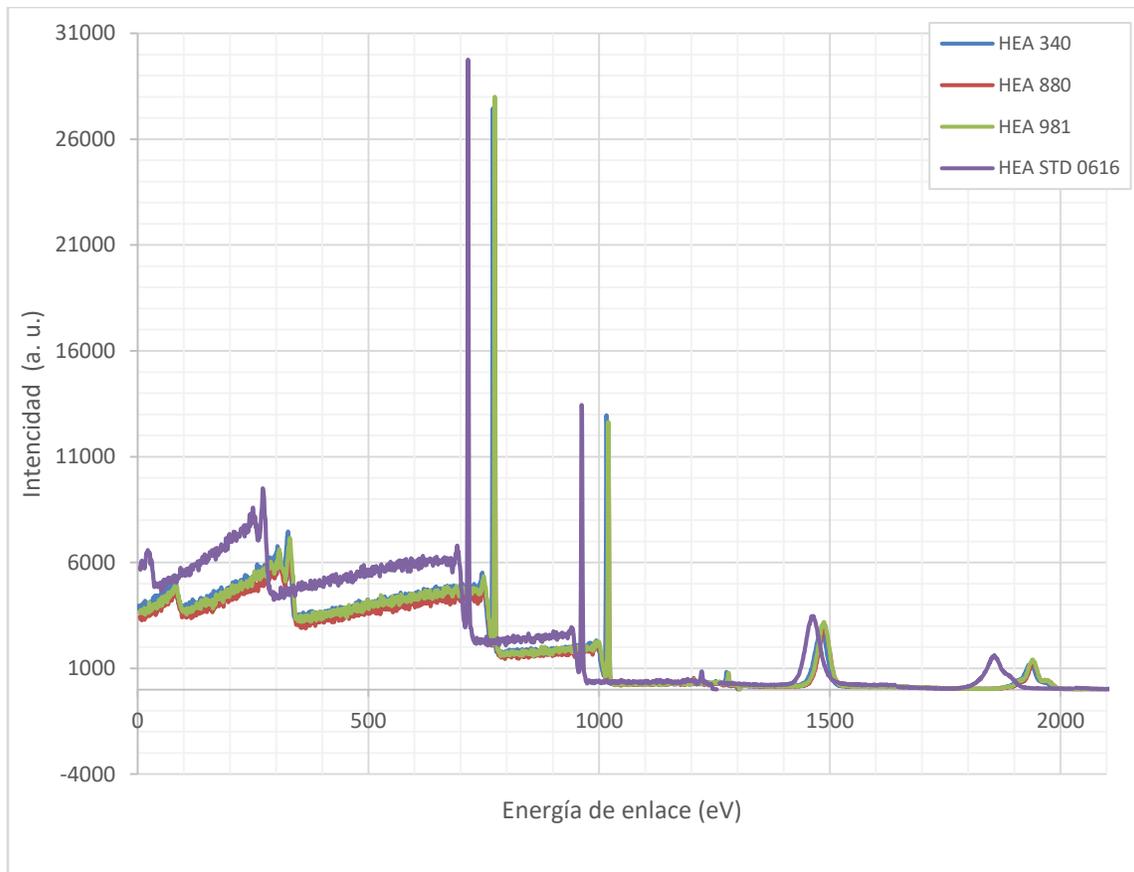


Figura 25. Espectro XPS de hidroxietil almidón

Se llevó a cabo el análisis en función gaussiana (Figura 26) al espectro obtenido, con el objetivo de tener una mejor identificación de las contribuciones asociadas a los grupos de átomos presentes en la molécula.

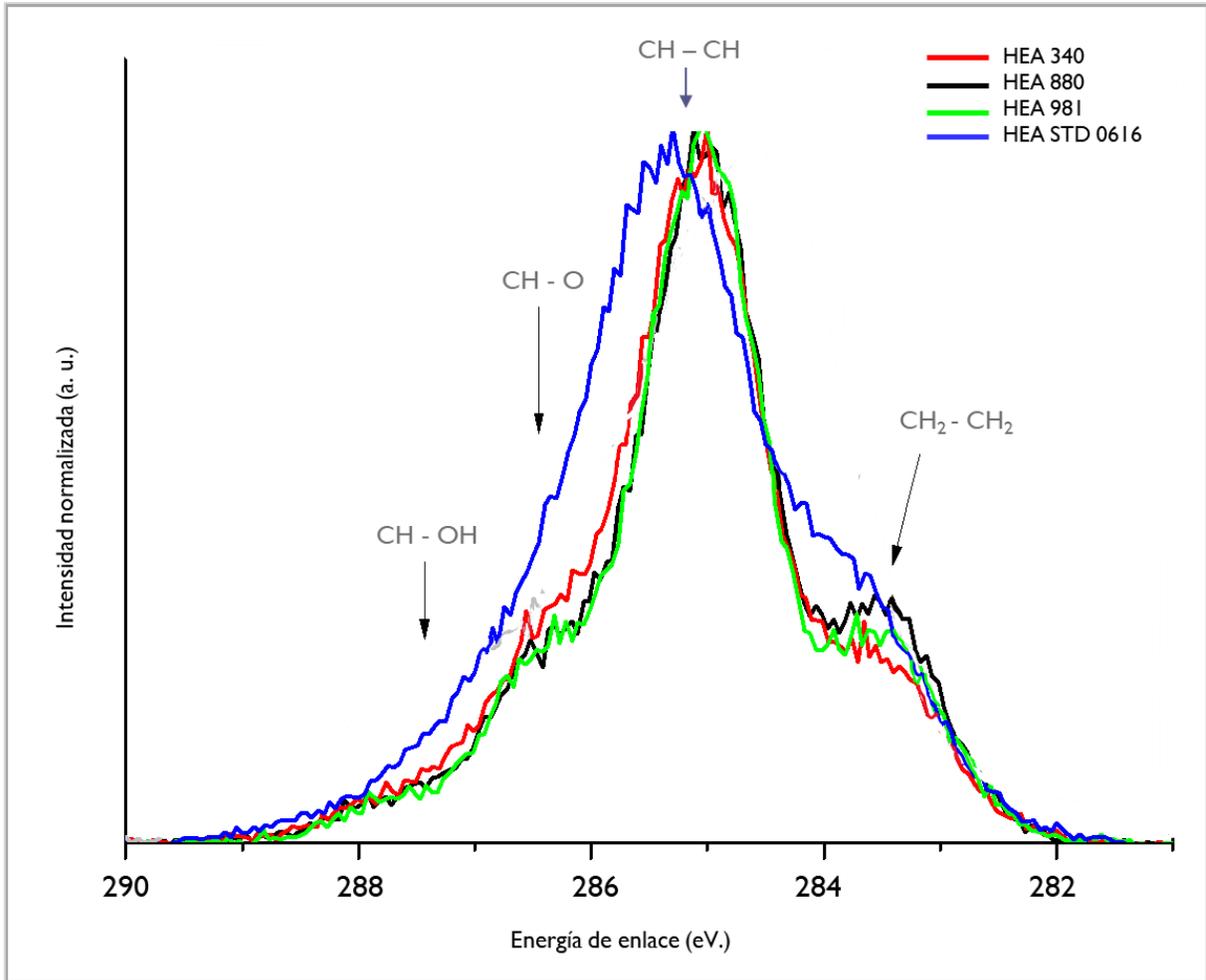


Figura 26. Espectro XPS C^{1s} normalizado de los principales grupos funcionales de hidroxietil almidón

El espectro normalizado muestra variaciones de peso molecular en las muestras de hidroxietil almidón debido a la contribución de grupos H₂C-CH₂, CH-CH, CH-O y muy poca contribución de grupos HC-OH del carbono C^{1s}.

La muestra HEA STD 0616 tiene las más altas contribuciones, indicándonos que es la molécula con mayor peso molecular.

Las muestras HEA 981 y 880 tienen contribuciones muy similares pues los espectros obtenidos se traslapan en la mayoría de las zonas confirmando la similitud del peso molecular obtenido en análisis DLS.

Para el caso de HEA 340 se tiene igual contribución de grupos CH-CH, mayor contribución de grupo CH-O y menor contribución considerable del grupo CH₂-CH₂, respecto a las muestras HEA 880 y 981 indicando que el peso molecular es mayor, sin embargo, su comportamiento químico es diferente.

5.6 PICNOMETRÍA DE GAS

El análisis de picnometría de gas otorga valores de densidad de partícula parámetro requerido para el análisis DLS por método Dybye-Hydro para la determinación de peso molecular.

Los resultados obtenidos para cada muestra de hidroxietil almidón etiquetadas como HEA 981, 880, 340 y STD 0616 se recopilan en Tabla 12.

Tabla 12. Valores de densidad de partícula de hidroxietil almidón obtenidos mediante picnometría de gas

Muestra	Densidad de partícula(g/cm ³)		
	1	2	Promedio
HEA STD 0616	1.3553	1.3388	1.3471
HEA 340	1.0687	1.0896	1.0792
HEA 880	1.0770	1.0664	1.0717
HEA 981	1.0626	1.0554	1.0590

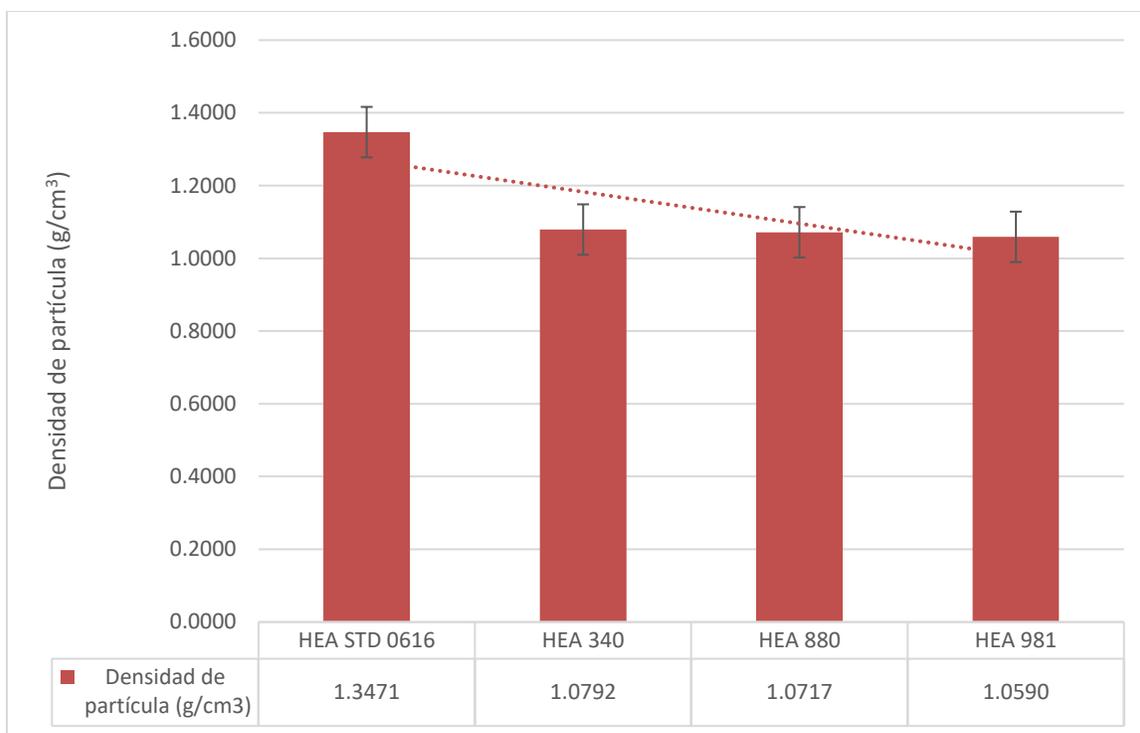


Figura 27. Densidad de partícula promedio para hidroxietil almidón por análisis picnometría de gas

La tendencia observada en forma decreciente:

HEA STD 0616 > HEA 340 > HEA 880 > HEA 981

coincide con la tendencia obtenida en análisis DLS y análisis XPS respecto a los pesos moleculares obtenidos y las contribuciones de los grupos, respectivamente.

5.7 CARACTERIZACIÓN CONJUNTA DE HIDROXETIL ALMIDÓN

Las tendencias evidentes observadas en el análisis individual de cada muestra de hidroxietil almidón (Figura 28) presentan a alta distribución de peso molecular, alta densidad de partícula, alta contribución de grupos C1s y mayor radio hidrodinámico. A Menor capacidad de absorción y de adsorción, entonces, mayor capacidad de hidratación observada por análisis térmico.

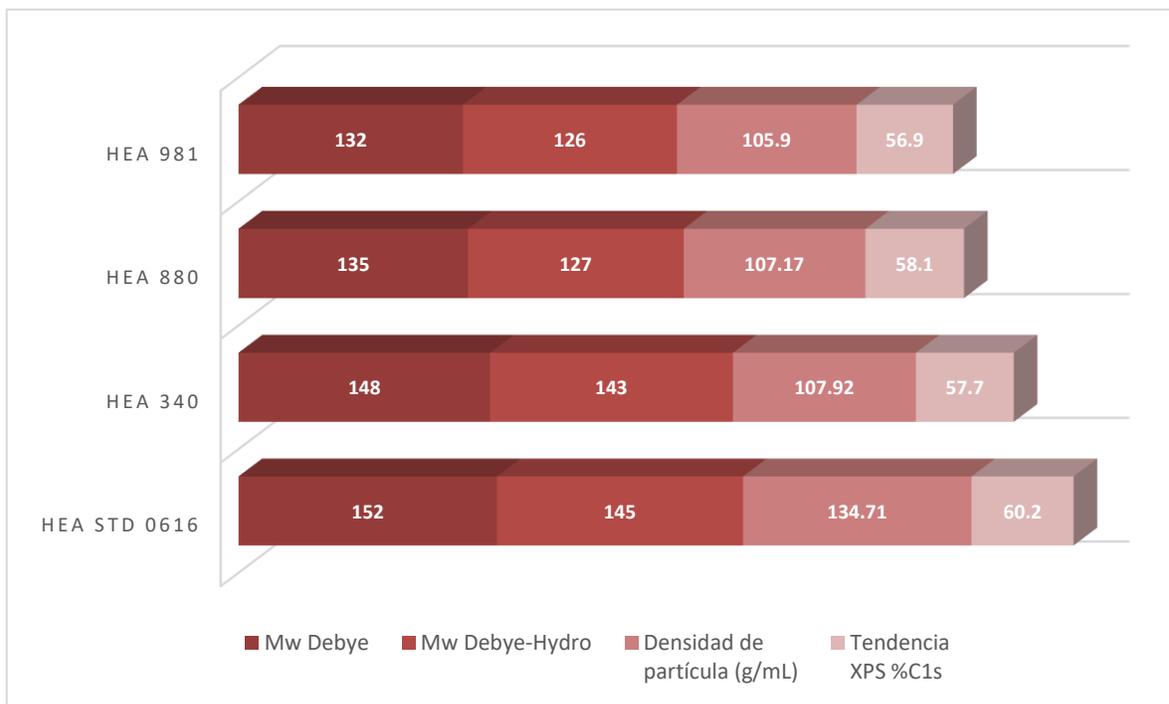


Figura 28. Análisis de caracterización conjunta de hidroxietil almidón

El análisis en conjunto de diversas técnicas analíticas llevadas a cabo tales como espectroscopia FTIR, RMN y DSC, identifican y describen el comportamiento de hidroxietil almidón mostrando la determinación

objetiva de parámetros como peso molecular, densidad de partícula y proporción de grupos C1s y que en actividad junta respaldan la caracterización.

6. CONCLUSIONES

Se caracterizaron satisfactoriamente diferentes muestras de hidroxietil almidón (HEA), mediante técnicas analíticas de picnometría de gas, calorimetría diferencial de barrido (DSC), dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopía FTIR, resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). La técnica de análisis por dispersión de luz dinámica (DLS) con método Debye permitió determinar la distribución de peso molecular de las muestras de hidroxietil almidón HEA STD 0616 = 152 000Da, HEA 340 = 148 000Da, HEA 880 = 135 000Da y HEA 981 = 132 000Da. A igual técnica, pero con método Debye-Hydro la distribución de peso molecular obtenida fue para HEA STD 0616 = 145 000Da, HEA 340 = 143 000Da, HEA 880 = 127 000Da y HEA 981 = 126 000Da. Los valores obtenidos nos permitieron estipular que todas las muestras de hidroxietil almidón (HEA) se encuentra dentro del intervalo de peso molecular óptimo entre 130 000 a 300 000Da, lo cual, da pauta a que sean utilizados para un fin clínico, que respalda a lo establecido por la farmacopea europea 8^oed (2013). Agregado a la caracterización de las muestras de hidroxietil almidón (HEA), se determinó de manera cualitativa la tendencia HEA 340 > HEA 880 > HEA STD 0912 > HEA 981 > HEA STD 0616 asociada a la capacidad de hidratación del granulo de hidroxietil almidón por estudio calorimétrico diferencial de barrido (DSC).

► Apéndice 1.1



Comparative Analysis of Biomacromolecules Used for Restoring Blood Plasma Volume



S. López Morales, A. Tenorio Hernández*, L. Huerta, G. Cedillo, y M. A. Canseco Martínez

Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior s/n, Coyoacán 04510, Ciudad de México. *e-mail: adriterher@comunidad.unam.mx.

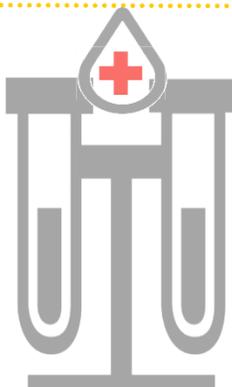
HYDROXYETHYL STARCH (HES)

It is obtained from **corn starch (98% amilopectin) or potato (75% amilopectin)**, by acid hydrolysis and reaction with ethylene oxide Purified by ultracentrifugation.^[2]

It is used as a **volumen expander** and artificial colloidal blood plasma in human and veterinary medicine, for restoring the total volumen and blood.^[1-2]

According to the European Pharmacopoeia, the optimal **Molecular Weight distribution range (Mw)** is set from **100,000 a 300,000 Da**.

Mean life time 10Hr—days. Optimum molar substitute index (MS) of 0.42^[3], is the number of glucose molecules that have been substituted in (C2 and C6), wich confer stability to the molecule.



POLYGELLINE

It is obtained from **polydisperse polypeptides of animal derivatives**, specific from **hydrolysis of bovine collagen**.

It is used as a **colloidal serum**, exerting an initial osmotic effect that **restores blood volume** but rapidly disappears from circulation by glomerular filtration.

Molecular Weight (Mw) is 30,000 to 35,000 Daltons, which means that its **half-life intravascular is 2 to 4 hours** in normal people.

Average half life in the human body is <3 hours. Is the most economical plasma expanders.

ABSTRACT

Test are conducted to find differences in the physical and chemical properties between both colloids. They were characterized by Laser Light Scattering (LLS) to determine the optimal average Molecular Weight Distribution (MWD), according to European Pharmacopoeia 8.0. Measurement were performed for HES; in water (H₂O), with buffer solution (sodium acetate and glacial acetic acid) at pH = 4.0 and for Polygeline; H₂O and saline, both at room temperature in a concentration range of 0.0012 to 0.071 mg/mL. Structural analysis, were analyzed by ¹H-RMN and chemical composition by XPS.

INTRODUCTION

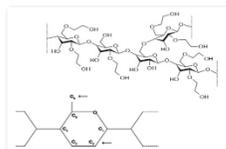


Figure 1—HES structure and active substitution sites.

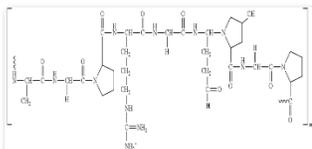


Figure 2—Polygeline structure.

HES formed by two macromolecules of glucose; amylase and amylopectin. The distribution of the amylase within the concentric rings differs between the center and the periphery of granule, since they only occupy the available sites leaving the amylopectin after being synthesized^[4]. Polygeline is the union of several polypeptides derived from gelatin, a strong alkali is added, forming a peptide chain of low molecular weigh which are processed with hexamethyl diisocyanated, whereby a free carboxyl group is attached to a free amino group, resulting in a urea bridge^[5].

DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT

Determination of the value of the hydrodynamic molecular weight from the size of molecules suspended by dynamic light scattering:

Mw = Molecular weight [g · mol⁻¹], **N** = Avogadro's number [mol⁻¹], **ρ** = molecular density [g/cm³], **D** = Hydrodynamic diameter [cm]

$$Mw = N\rho\pi D^3/6$$

Equation (1)

Table 1 - Parameters obtained for both colloids: Mw, 2nd virial coefficient, (A₂) and Debye method.

Sample	Particle density of HES (g/cm ³)	HES			Polygeline		
		Molecular Weight (Da)	A ₂ (mL/g Da)	R	Molecular Weight (Da)	A ₂ (mL/g Da)	R
A	1.059	1.12 x10 ⁵	4.17 x10 ⁻⁴	0.788	2.64 x10 ⁵	6.61 x10 ⁻⁴	0.170
B	1.072	1.45 x10 ⁵	3.81 x10 ⁻⁴	0.924	5.71 x10 ⁴	*2.43 x10 ⁻⁴	0.232
C	1.079	1.05 x10 ⁵	8.12 x10 ⁻⁴	0.898	9.18 x10 ⁴	*1.05 x10 ⁻³	0.533

¹H-NMR SPECTROSCOPY

Table 2— Identification of signals and associated attribution.

Signal (ppm)	Association
HES	
4.2 - 3.3	Starch Hydrogens
5.8 - 5.2	Unknown
Polygeline	
8.7 - 7.6	-NH ⁺ s
7.4 - 6.8	Unknown
4.8 - 4.1	Ring-binding hydrogens
4.15	CH 2 between carbonyl and NH
3.9 - 3.4	CH2 and CH of the ring between N and OH
3.3 - 1.1	CH2 of the ring between nitrogen and CH of main chain
1.1 - 0.75	CH3, possibly modifications to collagen

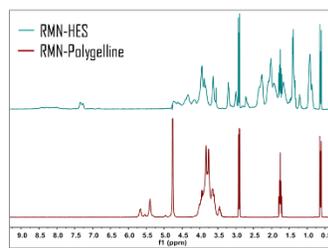


Figure 3— ¹H-NMR spectrum samples HES and Polygeline.

XPS SPECTROSCOPY

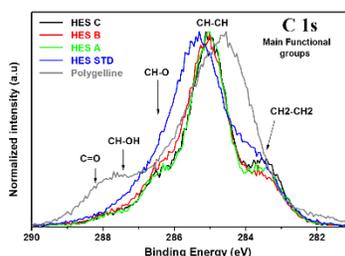


Figure 4— Spectrum XPS normalized samples HES, Standar and polygeline.

The difference of a higher molecular weight for HES with respect to polygeline, is the contribution mainly of the C=O and HC-OH groups of the C1s carbón and various functional groups.

The difference between HES simple (A to C) in molecular weight, is due to the contribution of H₂C-CH₂ and O-CH groups. HES-A and C being similar and of lower molecular weight with respect to HES-B.

CONCLUSION

HES samples A, B, and C are within the range of optimum molecular weight established by the European Pharmacopoeia, 8.0, 2011, can be used for the preparation of perfusion solutions. HES (Mw=10.05⁴ - 14.5x10⁴ Da) has higher molecular weight than polygeline (Mw=2.64x10⁴ - 9.18x10⁴). ¹H-NMR do not shows any structural difference between HES and Polygeline samples. The HES molecule is mostly retained by the vascular system than the polygeline molecule and thus major factor causing renal and cardiovascular damage.

Acknowledgements: The authors thanks to C. González, A. López, A. Pompa and J. M. García León of IIM-UNAM, for their technical support.

[1] Mark A. Warner: Hydroxyethyl Starches, *Immunobiology*, 11: 187- 202, (2002).
 [2] J.M. Vellido González, S.J. Yanes Vidal, P. Gibert Noveros: Hidroxiel almidón y su papel en la optimización de la Resucitación. *Info. Colloids, Fresenius Kabi, Barcelona, España*, 18, 3-35, (2008).
 [3] European Pharmacopoeia, 8.0 Edition, (10/2011)PS, 2007-2008.
 [4] L. C. Tedlow, M. K. Meier and K. J. Enns: Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J. Exp. Bot.*, 55, 209-245, (2004)
 [5] A. I. Lenda, C. Gómez, M. E. Roca, *Rev. Col. Anest.*, 33, 15, (2015)

► Apéndice 1.2



Characterization of Hydroxyethyl Starch (HES) Used In Medical Treatment

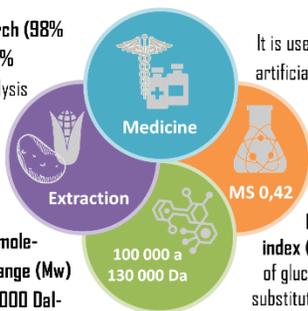


A. Tenorio Hernández*, L. Huerta, Eriseth R-Morales, M. A. Canseco, G. Cedillo, M. Raal Suárez L. y S. López Morales

Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior s/n, Coyoacán 04510, Ciudad de México. *e-mail: adritenher@comunidad.unam.mx

It is obtained from **corn starch (98% amylopectin) or potato (75% Amylopectin)**, by acid hydrolysis and reaction with ethylene oxide purified by ultracentrifugation^[2].

According to the European Pharmacopoeia, the optimal **molecular weight distribution range (Mw)** is set from **100,000 to 300,000 Daltons**.



It is used as a **volume expander** and artificial colloidal blood plasma in human and veterinary medicine, restoring the total volume of blood^[1-2].

Optimum molar substitution index (MS) of 0.42^[1], is the number of glucose molecules that have been substituted in (C2 and C6), which confer stability to the molecule.



Hydroxyethyl Starch

It is a non-ionic derivative of starch, formed by natural polysaccharides that by **chemical modification** proceeds to a hydroxyethylation, that is to say: substitution of the hydroxyl groups by hydroxyethyl ether groups on the amylopectin glucose molecules.

Above and below the optimal MS and Mw intervals, they present **renal damage**; HEA derived from maize ratio 9:1 and HEA derived from potato ratio 6:1^[2].

ABSTRACT

Batches of hydroxyethyl starch were characterized. Determining the average molecular weight, by the technique of Dynamic Light Scattering (DLS), using Microtrac-Nanotracc Wave equipment for molecules in suspension of nano particles. Measurements are made in water (H₂O), with buffer solution (sodium acetate in water and glacial acetic acid) at pH = 4 and room temperature, in a concentration range of 0.0012 to 0.071 mg / mL. A comparison is made based on data set by the European Pharmacopoeia 8.0, where the HES samples A, B and C are within the optimal molecular mass distribution range. In addition it is complemented by chemical analysis, when determining: Particle density, calorimetry (DSC) and IR.

BACKGROUND

It consists of two polymers of glucose: amylose and amylopectin. The molecules are organized into concentric rings to give rise to a granular structure. The distribution of the amylose within the concentric rings differs between the center and the periphery of the granule, since they only occupy the available sites leaving the amylopectin after being synthesized^[4].

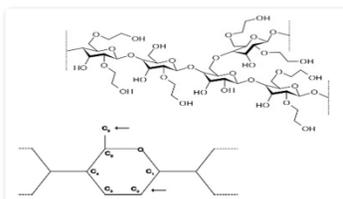


Figure 1. HES structure and active substitution sites

DETERMINATION OF MOLECULAR WEIGHT

Determination of the value of the hydrodynamic molecular weight from the size of molecules suspended by dynamic light scattering:

$$Mw = \text{Molecular weight [g} \cdot \text{mol}^{-1}\text{]}, \quad N = \text{Avogadro's number [mol}^{-1}\text{]}, \quad \rho = \text{molecular density [g/cm}^3\text{]}, \quad D = \text{Hydrodynamic diameter [cm]}$$

$$Mw = N \rho \pi D^3 / 6 \quad \text{Equation (1)}$$

Table 1. Parameters obtained: Mw, 2nd virial coefficient, (by Debye and Debye-Hydro method).

Sample	Particle density (g/cm ³)	Debye			Debye-Hydro		
		Molecular Weight (Da)	A ₂ (mL/g Da)	R	Molecular Weight (Da)	A ₂ (mL/g Da)	R
A	1.059	1.12 x10 ⁵	4.17 x10 ⁴	0.788	1.63 x10 ⁵	1.70 x10 ⁻³	0.981
B	1.072	1.45 x10 ⁵	3.81 x10 ⁴	0.924	1.29 x10 ⁵	7.26 x10 ⁻⁴	0.983
C	1.079	-1.05 x10 ⁵	8.12 x10 ⁴	0.898	-1.13 x10 ⁵	8.44 x10 ⁻⁴	0.996

[1] Mark A. Warner, Hydroxyethyl Starches, Anesthesiology, III, 187 - 202, (2005).
 [2] J.M. Vadillo Gonzalez, G.J. Yanes Vidal, P. Gilbert Navarro, Hidroxietil almidón y su papel en la optimización de la fluidoterapia, Info Coloides, Fresenius Kabi, Barcelona, España, 18, 3-35, (2008).
 [3] European Pharmacopoeia, 8.0 Editions, D1/2014785, 3307-3311.
 [4] I. J. Tellow, M. K. Morell and M. J. Emes, Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants, J. Exp. Bot., 55, 2131 - 2145, (2004).

CALORIMETRY (DSC)

In Figure 2, we observe the decreasing exponential trend, this indicates the capacity of retention of water in the sample as a function of temperature. Furthermore, it does not show behavior of phase transitions, polymorphisms or decomposition.

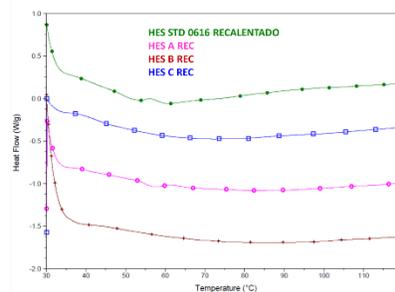


Figure 2. Thermogram of each HES sample and the reference

INFRARED SPECTRUM

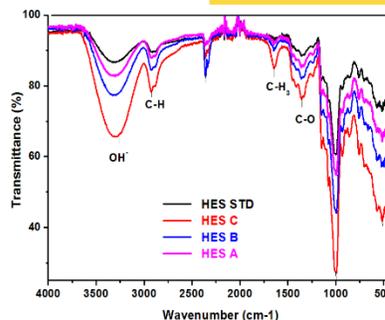


Table 2. Identification of bands and associated attribution.

Band (cm-1)	Assignment
3280 - 3380	Stretching H-O
2850 - 2950	Vibration C-H
1620 - 1700 & 1300	Antisymmetric deformation (C=O)
1200, 1080 & 1010	Antisymmetric/symmetric (CH ₂)
992, 979, 861, 765 & 575	Stretching vibrations, anhydroglucose ring

Figure 3. Infrared spectrum, HES samples A, B, and C, and the associated reference.

CONCLUSION

HES samples A, B, and C are within the range of optimum molecular weight established by the European Pharmacopoeia, 8.0, 2011, can be used for the preparation of perfusion solutions. The chemical behavior of HES polymer; larger molecular weight has a lower particle density, favoring the intermolecular water retention capacity which causes the difficulty of degradation in the human body. Solutions at concentrations higher than 0.035 mg / mL have a negative molecular weight, caused by the slope shape.

Acknowledgements: The authors thanks to C. González, A. López, A. Pompa and J. M. García León of IIM-UNAM, for their technical support.

► Apéndice 2.1



Evaluation and regulations of some medical devices for use in humans

S. López Morales^{1*}, A. Tenorio Hernández¹, R. D. Venegas Lancon², G. Cedillo Valverde¹, L. Huerta Arcos¹ and M. A. Canseco Martínez¹.

*1 Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-360, Coyoacán, 04510, D.F., México. e-mail: slm@iim.unam.mx**

2 Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León (ENES-León), Universidad Nacional Autónoma de México, León, Guanajuato, México.

In the academy and the industry, there is a need to minimize maintenance operation costs and quality control, in medical products and devices for commercial use. The field of medical sterilization has become increasingly demanding because of the necessity to prevent patient exposure to infections caused by microorganisms on instruments and devices used during their treatment. The most widely used industrial Medical Devices (MDs) in sterilization technologies are steam, ethylene oxide (EO), gamma radiation (γ) and electron beam [1]. For example, the incorrect processing of denture prostheses resins increase the concentration of residual monomer and can damage the oral cavity [2]. Also, Hydroxyethyl Starch (HES), a semi-synthetic non-ionic polysaccharide obtained by chemical modification of the hydroxyl groups on the C2 and C6 position of starch, is used as a volume expander and artificial colloidal blood plasma in human and veterinary medicine; it is necessary to have absolute control of the molecular weight [3].

The aim of this work is improving and/or adapting the standard quality control parameters in each of the different MDs, and thus reducing operating costs by using chromatographic and contact angle techniques. When reducing the exposure times of sterilization in MDs, the samples are analyzed by gas chromatography and average residual EO value of 1.631 mg is obtained, which is below the maximum permissible limit suggested by the norm. In addition, when we calculate the amount of residual monomer in dental resins, a maximum value of 0.8% is obtained. On the other hand, the detailed study in the molecular weight distribution of HES, reaches an average value of $1.40 \times 10^{+05}$ g/mol, which is within the average range suggested by the norm. The results show that it is possible to monitor and improve the quality control parameters in each of the medical devices.

References

- [1] Gisela C. C. Mendes, MD, Teresa R. S. Brandao, PhD, and Cristina L. M. Silva, PdD., Universidade Católica Portuguesa, Escola Superior de Biotecnología, Porto Portugal, 574 – 581, (2007). International Organization for Standardization (ISO) 10993-7 (Biological Evaluation of MDs–EO Sterilization Residuals)
- [2] International Organization Standard. ISO 1567 "Dentistry – denture base polymers", 3Ed. 02-15-1999.
- [3] Gianfranco Pasut, Polymers, 6, 2014, 160 – 178. European Pharmacopoeia, 8.0 Editions, 01/2011:1785, 3307 – 3311.

Acknowledgements

The authors thank to C. Gonzales, A. López and A. Pompa of IIM - UNAM, for their technical support.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYMERS AND ADVANCED MATERIALS "POLYMAT-2019"

▶ Apéndice 2.2



Folio:O-RMM-03

Ciudad de México a 23 de marzo de 2018

Nombre **Tenorio Hernández Adriana**
 Procedencia **Facultad de Química**

**PRESENTE**

Nos es grato comunicarle que su trabajo

“Caracterización de Hidroxietil Almidón (HEA) Usado en Tratamiento Médico”

ha sido:

A C E P T A D O

En modalidad **O R A L**, en el **Simposio Anual de Estudiantes 2018**.

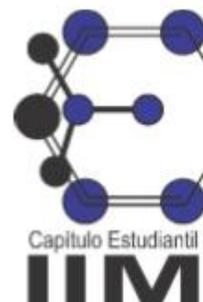
Día: **Jueves**

Hora: **10:45:00 AM**

La presentación será de 12 minutos más 2 minutos de preguntas. El trabajo deberá estar en formato .pptx o .pdf y deberá ser enviada un día antes al correo capituloelimsmm@gmail.com indicando en el asunto del mensaje el FOLIO de su trabajo.

Agradecemos mucho su participación.

ATENTAMENTE
 Comité Organizador



► Apéndice 2.3

Universidad Nacional Autónoma de México
 S. López Morales^{1*}, A. Tenorio Hernández¹
 Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM Departamento de Reología
 y Mecánica de Materiales. Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria,
 Coyoacán, México, D.F., 04510. Noviembre 2016.




PUERTAS ABIERTAS 2016

El PESO de la partícula HES... ...si importa

¿Qué es ? ► El **hidroxietilalmidón (HES)** es un polímero formado por polisacáridos naturales. Se obtienen a partir del almidón de maíz o papa, modificados químicamente.

Se utiliza como expansor de volumen, sustancia que permanece en la circulación sanguínea, restaurando el volumen total de sangre circulante en un individuo

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) nos indica una distribución del peso molecular óptima: **100 000 a 300 000 Daltons**

¿Cómo ? ► El peso molecular (Mw) se obtiene por método analítico más dinámicos de dispersión de luz, equipo Microtrac-Nanotracc Wave, con precisión de medición del peso molecular y tamaño de partícula, en suspensiones

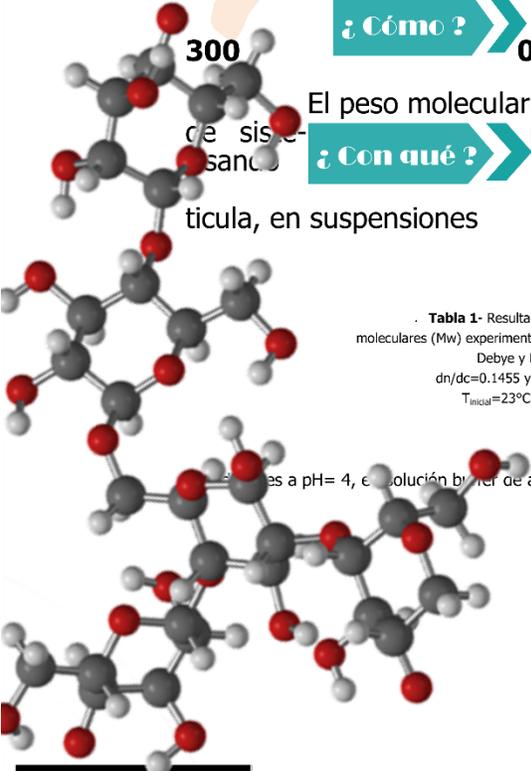
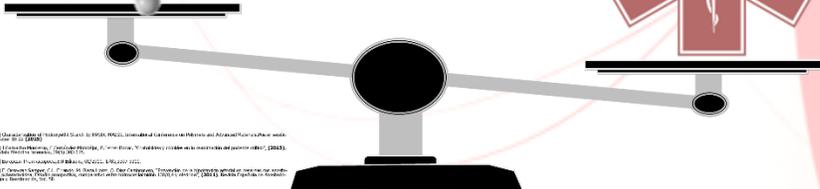
¿Con qué ? ► equipo Microtrac-Nanotracc Wave, con precisión de medición del peso molecular y tamaño de partícula, en suspensiones

Tabla 1- Resultados de pesos moleculares (Mw) experimentales, método Debye y Debye-Hydro; dn/dc=0.1455 y $\rho_{particula}=1.5$, T_{inicial}=23°C y T_{final}=25°C

soluciones a pH= 4, en solución buffer de acetatos.

Intervalo de concentración de disoluciones [g/ml]	(Mw) Peso Molecular [Da]		Intervalo de distribución de Tamaño de partícula [nm]			
	Método					
	Dibye	Dibye-Hydro	Dibye		Dibye-Hydro	
3.0x10 ⁻⁴ - 5.0x10 ⁻³	154,000.00	145,000.00	17.94	16.55	16.97	16.83
	158,000.00	140,000.00	17.20	17.04	16.00	17.47
	144,000.00	171,000.00	17.39	16.84	16.41	16.98
Promedio	152,000.00	152,000.00	17.51	16.81	16.46	17.09
5.0x10 ⁻³ - 3.0x10 ⁻²	150,000.00	142,000.00	16.78	15.48	16.94	15.23
	158,000.00	165,000.00	16.87	15.06	16.82	15.5
	120,000.00	136,000.00	16.61	15.55	16.58	15.59
Promedio	142,666.67	147,666.67	16.75	15.36	16.78	15.44

Las nuevas generaciones de HES, hace que; su acumulación en los tejidos sea menor, provocando menos efectos adversos, como daño renal


¹ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

² Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

³ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

⁴ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

⁵ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

⁶ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

⁷ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

⁸ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

⁹ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

¹⁰ Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM, México, Ciudad Universitaria, México y Ciudad de México, México

► Apéndice 2.4



**Caracterización de Hidroxiethylalmidón
(HES)**



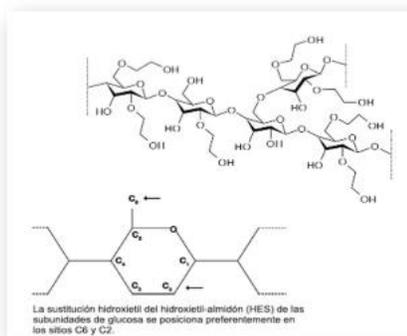
HPSEC-MALLS/NANOWAVE

S. López Morales, A. Hernández Acevedo, Y.G López Urrutia, A. Tenorio Hernández, A.K Vizcaíno Sixto y N. Wilson Bello.

Instituto de Investigaciones en Materiales (UNAM) ,Departamento de Realología y Mecánica de Materiales. Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F., 04510. Noviembre 2015.

HES fue caracterizado por HPSEC-MALLS, cambiando el índice de refracción con respecto a la concentración, calculando el peso molecular y la distribución del peso molecular en solución de hidróxido de sodio y en solución buffer (pH=4 de acetatos)^[1]

	PM (g/mol)
Norma 8.0 Farmacopea ^[3]	100,000-300,000
STD HES NaOH	238,900
STD HES BUFFER	139,300
HES NaOH	254,200
HES BUFFER	132,500



El HES es un polisacárido semi-sintético, no iónico, obtenido por modificaciones químicas de los grupos hidroxilo en el C2 y C6 del almidón.

¿Por qué?

El HES es empleado en suero para reponer el volumen circulante de la sangre en pacientes en estado de shock, hipovolemicos o traumatizados^[2].



Preferentemente se utilizan HES de bajo PM, ya que a mayor PM llegan a ser tóxicos y duran más tiempo en el organismo.

Tabla1. Clasificación de los hidroxiethylalmidón según su peso molecular y su vida media plasmática

Alto <i>Pm</i> (175KD)	Vida ½ plasmática >24hrs
Mediano <i>Pm</i>	Degradación lenta(120KD).Vida ½ plasmática de 18-24hrs
	Degradación rápida (100KD).Vida ½ plasmática de 4-6hrs
Bajo <i>Pm</i> (70KD)	Vida ½ plasmática < de 3hrs

REFERENCIAS

- [1]. Characterization of Hydroxyethyl Starch by HPSEC-MALLS, International Conference on Polymers and Advanced Materials,Poster sesión october 18-22 2015.
- [2]. Gianfranco Pasut, Polymers,6,2014,160-178.
- [3]. European Pharmacopoeia,8.0 Editions, 01/2011: 1785,3307-3311.

► Apéndice 3.1

Facultad de Química, UNAM
Química Computacional

Diciembre 2017



INFLUENCIA QUÍMICA DEL DISOLVENTE SOBRE LA MOLÉCULA DE HIDROXIETIL ALMIDÓN POR ANÁLISIS COMPUTACIONAL

Adriana Tenorio Hernández, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Salón Inteligente, Sica 1, Edif. B, Circuito escolar, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F., 04510. adritenher@comunidad.unam.mx

Resumen:

Las características fisicoquímicas de la macromolécula hidroxietil almidón (HEA), son determinadas por su grado de hidroxietilación y la masa molecular (Mw), siendo este último, el que determina su actividad coloidal. En conjunto definen el impacto de riesgo en la toxicidad. En presente trabajo se analiza el comportamiento de HEA en medio acuoso, importante para que pueda ser utilizada como expansor de volumen y plasma sanguíneo coloidal artificial en medicina humana y veterinaria, permaneciendo en la circulación sanguínea, restaurando el volumen total de sangre circulante en pacientes críticos (hemorrágicos, traumáticos, sépticos) y cuando es necesario mejorar la perfusión tisular, determinando los sitios activos en la molécula por determinación de cálculos computacionales de energías de equilibrio de geometría, utilizando programa de cómputo Spartan, siendo esta una técnica muy útil y aproximada para la determinación de los conformeros más estables y posteriormente determinar sus distancias de enlace, energías moleculares LUMO-HOMO, primero en molécula HEA en fase gas y posteriormente en presencia de 3 y 5 moléculas de agua. Finalmente realizar un análisis comparativo entre cada uno de los conformeros de la macromolécula HEA por medio de sus espectros IR esperando un comportamiento aproximado al de la estructura real

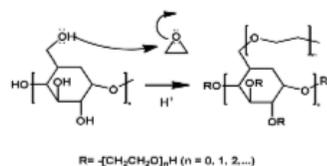
I. INTRODUCCIÓN

Los coloides son partículas de alta masa molecular que atraviesan con dificultad las membranas capilares, de forma que son capaces de aumentar la presión oncótica plasmática y retener agua en el espacio intravascular. Se dividen en sintéticos (gelatinas, almidones y dextranos) y naturales (albúmina)^[1].

El almidón natural se obtiene de extractos de maíz o papa ricos en amilopectina, en disolución son inestables, al ser el almidón rápidamente hidrolizado por las amilasas.

Para conferir estabilidad se ha procedido a una modificación química que da lugar a la formación de macromoléculas: hidroxietil almidón.

El hidroxietil almidón (HEA) se obtiene a partir del almidón de maíz o papa por hidrólisis ácida y reacción con óxido de etileno y purificado por ultrafiltración^[2].



• Figura I - Esquema de reacción de la síntesis orgánica de hidroxietil almidón (HEA)

Está formado por polisacáridos naturales y por modificación se procede a una hidroxietilación, es decir: sustitución de los grupos hidroxilos por grupos hidroxietil éter en las moléculas de glucosa de la amilopectina. Hay dos características fisicoquímicas de interés que nos orientan sobre el comportamiento en el organismo de HEA: la masa molecular y el grado de hidroxietilación, que se cuantifica por el índice de sustitución molar (MS), es decir, por el número de moléculas de glucosa que han sido sustituidas en el carbono en posición 2 y 6 (C₂ y C₆) por formas hidroxietiladas de glucosa que son las que confieren estabilidad a la molécula. Siendo la hidroxietilación en el C₂ la que confiere mayor estabilidad a la molécula.

El índice de sustitución molar está determinado por el número de unidades de glucosa hidroxietiladas dividido por las unidades de glucosa presentes. A mayor número de unidades hidroxietiladas, mayor es el grado de sustitución entonces, mayor la masa molecular y mayor la vida media de la molécula en el plasma. Su larga vida media y acumulación en el tejido, debida a las características fisicoquímicas, explican la elevada tasa de efectos adversos, especialmente falla renal, asociados con su uso.

En la presente investigación se caracterizan diferentes lotes de hidroxietil almidón en disolución, con base en el análisis de la distribución de masa molecular (Mw) determinados por medio de

la técnica de dispersión de luz dinámica, como método de verificación de que las muestras analizadas se encuentren dentro de los intervalos óptimos de distribución de masa molecular, establecidos por la farmacopea 8.0^[6].

II. METODOLOGÍA

A. Parámetro Geométricos

Se construyeron las conformaciones de la parte que se repite para el polímero hidroxietil almidón en estudio, la molécula de H₂O, como parte de la especie química involucrada y el modelaje de la molécula hidroxietil almidón con tres [HES-(H₂O)₃] y cinco moléculas de agua [HES-(H₂O)₅], por medio de la interface gráfica Spartan V8, como preparación de los "input" o datos de entrada de cada estructura al programa Gaussian 09.

Posterior a la construcción de las estructuras, se procedió a la optimización (fase gas o vacío, $\epsilon = 1$), por medio de un Equilibrio de geometría y cálculo semiempírico/PM3/6-31G en Spartan V8, a fin de hallar la estructura más óptima y probable del hidroxietil almidón, producto de los cambios en la estructura de la molécula produciendo un mínimo global correspondiente a un punto de energía mínima donde se encuentra una estructura en equilibrio de baja energía cercana a las probables estructuras reales.

B. Optimización y Frecuencia

Luego del proceso de optimización de las estructuras en fase gas, se procedió al cálculo de optimización y frecuencia de dichas estructuras en fase condensada o medio acuoso (Agua, $\epsilon = 78.3553$ ^[3]), para esto se utilizó el método CPCM a través del comando SCRF (Self consisten reaction field, por sus siglas en inglés)=(cpcm,solvent=wáter), para la modelación del medio de reacción, para lo que se mantuvo los parámetros para la representación del sistema, como fueron la base 6-31++G** y el funcional de densidad B3LYP método que permitió la correlación electrónica.

III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La importancia de realizar una optimización de geometría persigue la obtención de resultados que modelen las estructuras lo más cercano a la realidad. El presente estudio está orientado a utilizar los paquetes computacionales, como Gaussian 09, para la determinación de parámetros termoquímicos (ΔH , ΔG , ΔS) que nos

indiquen el logro de buena optimización estructural para las moléculas interaccionando en el disolvente.

Se determinaron distancias y ángulos de enlaces por medio de la interface gráfica Gaussview 09, valores que fueron comparados con los reportados en la literatura del almidón sin embargo no se encontró alguno reportado para hidroxietil almidón.

Para lograr buenos resultados se estableció una comparación cuantitativa, al reproducir los valores de la molécula de agua, utilizando para ello como método, nivel cuántico y la base empleada para nuestro estudio; el método DFT con el funcional B3LYP y la 6-31++G** (2d, 2p); los resultados para el caso de la molécula de agua (H₂O) fueron comparados como se refleja en la siguiente tabla I.

• Tabla I -Cálculo de energía de optimización de la molécula de agua

Estructura	Método	Energía (Hartree)
H ₂ O	B3LYP 6-31G++	-76.4411325*
	Valor Experimental de literatura	-76.48000

*I. Levine, 2001, *Química Cuántica, Phys.*, p. 542, -Cap. 15

esto permitió establecer la fiabilidad del método al lograr buenas aproximaciones a valores reportados en la literatura, la baja diferencia de energía encontrada (-0.0388675 hartrees) con respecto al valor experimental reportado, lo representa la correlación electrónica establecida por el método utilizado en este trabajo, que permite una mejor representación del sistema en estudio y de la estructura electrónica al proponer geometrías cercanas a las reales; la diferencia de los valores reportados proporcionarían la falta de correlación electrónica y pueden generar valores muy distanciados, y posibles desviaciones que no permitan caracterizar eficientemente al sistema.

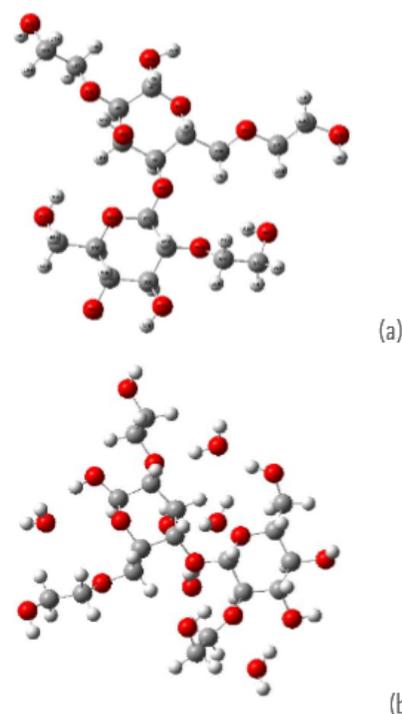
Los valores anteriores permitieron comprobar la factibilidad del método, esto nos permitió proponer valores de distancias de enlaces para la fase gas y fase condensada como medio acuoso presente para el sistema en estudio, muy cercano al sistema real, a pesar de ser una especie poco caracterizada por su compleja estructura y proceso de hidrólisis que depende del pH.

III.A. DISTANCIA DE ENLACE

• Tabla 2- Distancias de algunos enlace de la molécula de HEA en los tres medios de estudio

Etiqueta de enlace	Vacio	HEA-3H2O	HEA-5H2O
R5	1.5435	3.5913	3.5913
R6	1.1247	1.5435	1.5435
R7	1.4233	1.1247	1.1247
R8	1.4063	1.4233	1.4233
R9	1.542	1.4063	1.4063
R10	1.5385	1.542	1.542
R11	1.1257	1.5385	1.5385
R12	1.416	1.1257	1.1257
R13	1.1225	1.416	1.416
R14	1.4234	1.1225	1.1225
R15	1.1243	1.4234	1.4234
R16	1.4254	1.1243	1.1243
R17	1.4278	1.4254	1.4254
R18	1.1219	3.6111	1.8655
R19	1.1227	2.1357	1.1384
R20	1.5268	3.0034	3.6111
R21	1.123	3.2425	2.1357
R22	1.1222	1.4278	3.0034
R23	1.4119	1.6431	3.2425
R24	0.965	1.1219	1.4278
R25	0.9679	1.1227	1.6431
R26	1.1225	1.5268	1.1219
R27	1.1245	1.123	1.1227
R28	1.4249	1.1222	1.5268
R29	1.4251	1.4119	1.123
R58	1.4312	1.5361	1.5454
R59	1.1212	1.1268	1.1245
R60	1.1213	1.4187	1.5366
R61	1.5253	1.5315	1.5361
R63	1.1212	1.1261	1.4187

Se contribuyó con los valores de distancia de enlace (Tabla 2) que muestran cómo varían estas distancias a medida que se pasó de un medio a otro. Para el polímero sin interacción con moléculas de agua se muestra la mayoría de enlaces más pequeños respecto al aumento de distancia de enlace que muestra tendencia proporcional al número de moléculas de agua, (figura 2. (a) y (b)), apreciándose una diferencia con respecto al polímero en presencia de las moléculas de agua, donde la influencia directa de las moléculas de agua ofrecen un efecto más pronunciado.



• Figura 2 - Estructuras de hidroxietil almidón (HEA) en el medio (a) Fase gas y (b) fase condensada

III. B.- ORBITALES MOLECULARES HOMO-LUMO

La disposición espacial de los orbitales moleculares; HOMO-LUMO de las especies en estudio describen los posibles enlaces estables,

• Tabla 3- Parámetros de energía obtenidos

Estructura	Energía de orbital (hartrees)		Energía estructural
	LUMO	HOMO	ΔG (J/mol)
Vacio	-0.31192	0.44549	-4532613.436
HEA - 3H2O	-0.38869	0.23041	-5161788.61
HEA - 5H2O	-0.39127	0.23100	-5923186.47

su energía y la topología de los enlace. Para el caso de la estructura conformacional en fase gas, se obtuvo un valor mayor en energías de los orbitales LUMO y HOMO con respecto a la Molécula HEA en fase acuosa, es decir; de esta manera se hace la aseveración de que el polímero se encuentra más cómodo, energéticamente hablando, en fase acuosa, (Tabla 3)

III. C.- ESPECTRO INFLAROJO

Como complementar el análisis se realizaron los espectros IR de de cada estructura y se compararon con los espectros obtenidos experimentalmente de una muestra de HEA de tres lotes distintos y una muestra estándar del mismo (Anexo 1-Fig. 3)

Los espectros presentan picos muy aproximados, para facilitar el análisis se realizó una tabla en la cual se presenta el intervalo de bandas espectrales más representativas para las estructuras analizadas (Tabla 4)

• Tabla 4- Identificación de bandas y atribución.

Banda (cm ⁻¹)	Asignación (Experimental)	Fase gas Vacío	Fase condensada HEA · nH ₂ O
3280 - 3380	Estiramiento H-O	✓ *	✓ ***
2850 - 2950	Vibración C-H	✗	✗
1620 - 1700	Deformación anti simétrica (C=O)	✓ **	✗ *
1300	Simétrica/Anticimétrica (CH ₃)	✗	✗
1200, 1080 y 1010	Estiramiento C-O	✓ ***	✓ **
992, 929, 861, 765 y 575	Vibración de estiramientos de anillo anhidroglucosa	✓ *	✓ **

Amplitud de banda: (*)bajo, (**)medio y (***)alta.

✗ No hay presencia de banda

✓ Si hay presencia de banda

En ninguno de los tres casos de estudio se presentan bandas en 1300 cm⁻¹ indicativo de que existen grupos metilo (-CH₃), evidentemente porque no fueron dibujados en la molécula, experimentalmente asumimos de una manera teórica que son fragmentos de oxido de etileno que se utiliza como agente en la síntesis orgánica de extracción (Fig. 1).

IV. CONCLUSIÓN

El método utilizado de optimización y frecuencia y la base DFT/b3lyp scrf=cpcm, son óptimos para el análisis del fragmento repetido de la macromolécula de hidroxietil almidón (HEA) con la desventaja de un tiempo de cálculo prolongado (2 a 3 días aprox) por cada cálculo.

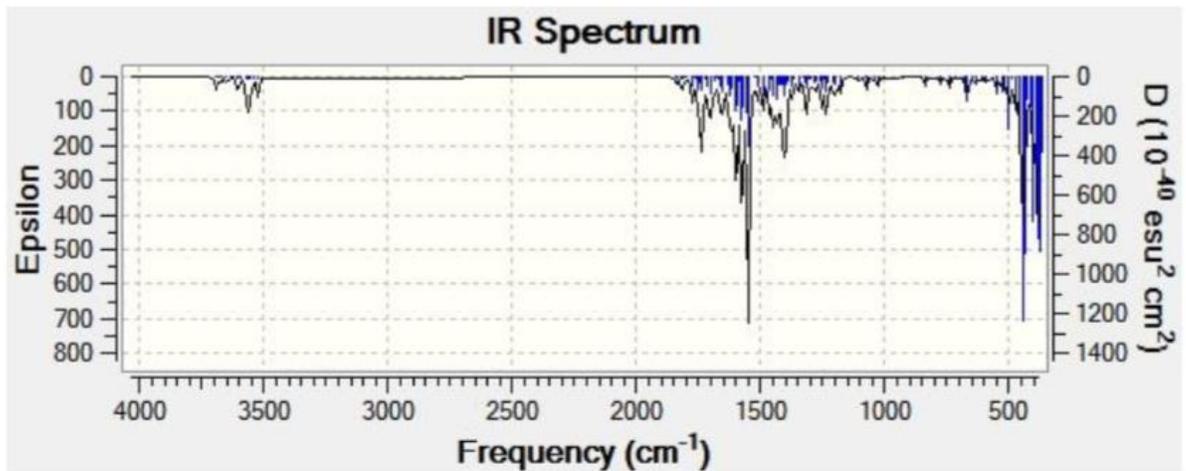
Las energías moleculares de los orbitales HOMO-LUMO las presento la estructura conformacional de HEA · 5H₂O.

En presencia de mayor número de moléculas de agua el comportamiento energético y molecular tiene una mayor aproximación al comportamiento real.

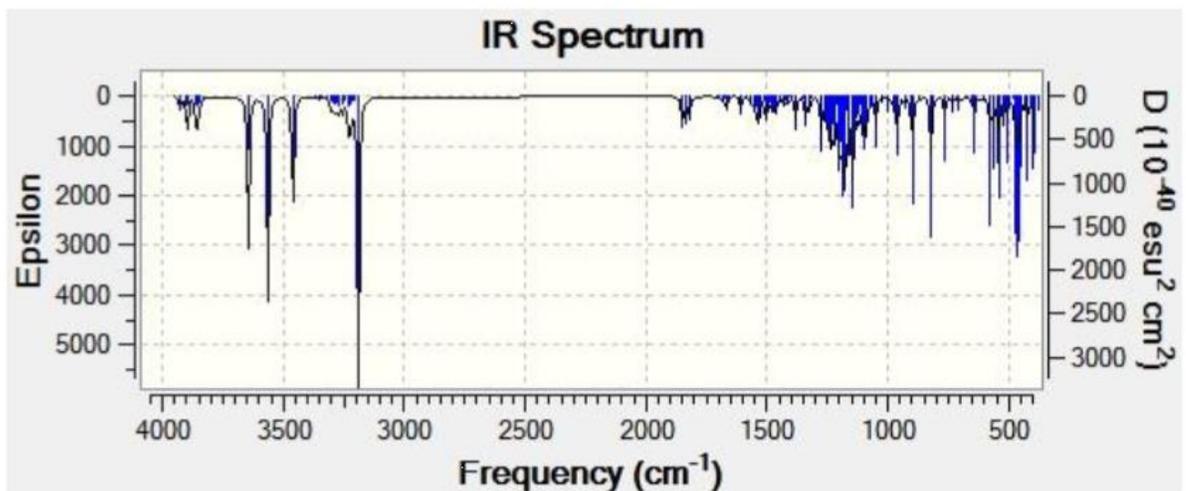
V. REFERENCIAS

- [1] J. Garnacho Montero, E. Fernández Mondejár, R. Ferrer Roca, M.E. Herrera Gutierrez, J.A. Lorente, S. Ruíz Santana, A. Artigas, *Cristaloides y coloides en la reanimación del paciente crítico*. Med. Intensiva; **2015**; 39(5):303-315
- [2] S. López Morales, J.H. Rosas Gabriel, N. Wilson Bello, C. Hernández Caballero, *Characterization of Hydroxyethyl Starch by HPSEC-MALLS*. International conference on polymers and advanced materials, Poster sesión, **2015**; PSI-47
- [3] <http://dev.gaussian.com/scrf>
- [4] Estelrich, J. & Pons, M. *La espectroscopia de correlación fotónica y sus aplicaciones*. Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología **1991**: 81-86. ISSN 0213-5574.
- [5] J. Gotro Leave, *Dielectric Cure Monitoring Part 10: What Does Dielectric Cure Monitoring Measure*. Polymer Innovation, March 23, **2015**
- [6] European Pharmacopoeia, 8.0 Editions, 01/**2011**:1785, 3307-3311.
- [7] Sommermeyer R, Cech F, Schossow R. *Differences in chemical structures between waxy maize- and potato-starch-based hydroxyethyl starch volumen therapeutics*. Transfus Altern Transfus Med **2007**; 9:127-133

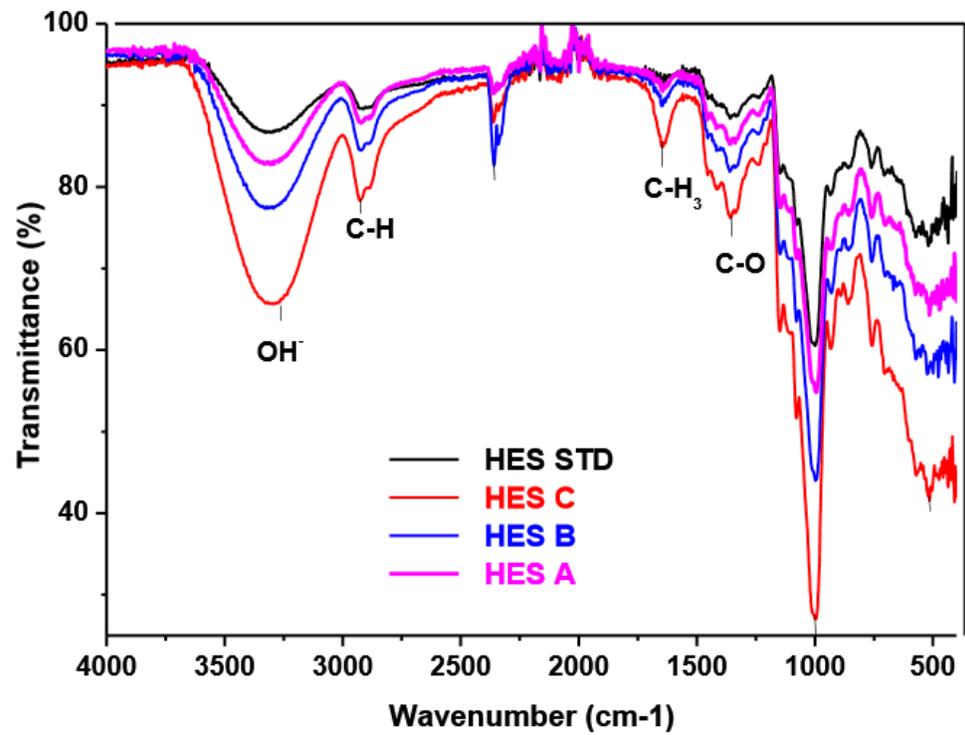
ANEXO I



(a) IR de HEA-Fase gas



(b) IR de HEA-Fase condensada



(c) IR experimental de HEA-γ Estándar

• Figura 3 - Espectros IR de hidroxietil almidón (HEA) en el medio; (a) Fase gas, (b) Fase condensada y (c) Experimental

► Apéndice 3.2

Facultad de Química, UNAM



DETERMINACIÓN DE MASA MOLECULAR (M_w) DE NANOPARTÍCULAS DE HIDROXIETIL ALMIDÓN POR DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA (DLS)

Adriana Tenorio Hernandez, Salvador López Morales. Instituto de Investigaciones en Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Reología y Mecánica de Materiales. Lab. 3. Circuito Exterior s/n, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México D.F., 04510. adritenher@comunidad.unam.mx.

Resumen:

Las características fisicoquímicas de la macromolécula hidroxietil almidón (HEA), son determinadas por su grado de hidroxietilación y la masa molecular (M_w), siendo este último, el que determina su actividad coloide. En conjunto definen el impacto de riesgo en la toxicidad. En presente trabajo se caracterizan las lotes de Hidroxietil Almidón; HES 37 981, 37 880, determinando de masa molecular promedio, por la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), utilizando equipo Microtrac-Nanotracc Wave para moléculas en suspensión de nano partículas, es una técnica analítica muy útil para la determinación de masa de partícula. Las mediciones se realizan en agua (H_2O), con disolución buffer (acetato de sodio en agua y ácido acético glacial) a pH=4 y 22°C, en un intervalo de concentración de 0.0012 a 0.071 mg/mL. Los valores experimentales obtenidos para los lotes HES: 37 981, 37 880 y 37 340 son comparadas con base en datos establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) respecto al intervalo de distribución de masa molecular óptimo de 100 000 a 300 000 Daltons, para que la macromolecula HEA pueda ser utilizada como expansor de volumen y plasma sanguíneo coloidal artificial en medicina humana y veterinaria, permaneciendo en la circulación sanguínea, restaurando el volumen total de sangre circulante en pacientes críticos (hemorrágicos, traumáticos, sépticos) y cuando es necesario mejorar la perfusión tisular.

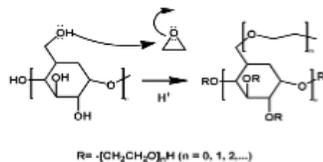
I. INTRODUCCIÓN

Los coloides son partículas de alta masa molecular que atraviesan con dificultad las membranas capilares, de forma que son capaces de aumentar la presión oncótica plasmática y retener agua en el espacio intravascular. Se dividen en sintéticos (gelatinas, almidones y dextrans) y naturales (albúmina)^[1].

El almidón natural se obtiene de extractos de maíz o papa ricos en amilopectina, en disolución son inestables, al ser el almidón rápidamente hidrolizado por las amilasas.

Para conferir estabilidad se ha procedido a una modificación química que da lugar a la formación de macromoléculas; hidroxietil almidón.

El hidroxietil almidón (HEA) se obtiene a partir del almidón de maíz o papa por hidrólisis ácida y reacción con óxido de etileno y purificado por ultrafiltración^[2].



• Figura 1 - Esquema de reacción de la síntesis orgánica de

hidroxietil almidón (HEA)

Está formado por polisacáridos naturales y por modificación se procede a una hidroxietilación, es decir; sustitución de los grupos hidroxilos por grupos hidroxietil éter en las moléculas de glucosa de la amilopectina. Hay dos características fisicoquímicas de interés que nos orientan sobre el comportamiento en el organismo de HEA: la masa molecular y el grado de hidroxietilación, que se cuantifica por el índice de sustitución molar (MS), es decir, por el número de moléculas de glucosa que han sido sustituidas en el carbono en posición 2 y 6 (C_2 y C_6) por formas hidroxietiladas de glucosa que son las que confieren estabilidad a la molécula. Siendo la hidroxietilación en el C_2 la que confiere mayor estabilidad a la molécula.

El índice de susutitución molar está determinado por el número de unidades de glucosa hidroxietiladas dividido por las unidades de glucosa presentes. A mayor número de unidades hidroxietiladas, mayor es el grado de sustitución entonces, mayor la masa molecular y mayor la vida media de la molécula en el plasma. Las primeras generaciones de HEA se caracterizan por una elevada masa molecular (450.000 Da) e índice de sustitución de 0,7.

Posteriormente se sintetizó con una masa molecular de 200.000 Da y un índice de sustitución de 0,5. Su larga vida media y acumulación en el tejido, debida a las características fisicoquímicas, explican la elevada tasa de efectos adversos, especialmente falla renal, asociados con su uso. Posteriormente aparecen las nuevas generaciones de HEA, con ventajas teóricas sobre las predecesoras, con una masa molecular promedio de 130.000 Da y un índice de sustitución molar de 0,42 (HEA 130/0,4), lo que hace que, al menos en teoría, la acumulación en los tejidos sea menor y se asocien menos efectos adversos. Sin embargo, estudios clínicos no apoyan el menor acúmulo de HEA con menor peso molecular e índice de sustitución en comparación con las de peso molecular elevado^[1].

La dispersión de luz dinámica (DLS), es una técnica sensible para evaluar las interacciones macromoleculares y para detectar la formación de agregados en solución^[3].

El movimiento browniano es un efecto que se desarrolla como resultado de moléculas fluidas chocando entre partículas y causando su movimiento. De acuerdo con la fórmula de Stokes-Einstein (ecuación 1), se muestra que, las partículas se tratan como objetos puntuales sin masa ni densidad.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta \cdot R_h} \quad (1)$$

donde:

D = coeficiente de difusión [cm^2/s], K = constante de Boltzmann [$\text{eV}/^\circ\text{K}$],
 T = Temperatura [$^\circ\text{K}$], η = viscosidad dinámica [$\text{g}/\text{cm} \cdot \text{s}$] y R_h = radio hidrodinámico [cm]^[5].

La dispersión de luz dinámica no toma en cuenta la dependencia del ángulo, sino la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo. La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), que se basa en la espectroscopía de correlación de fotones PCS (Photon Correlation Spectroscopy) o dispersión QELS (Quasi Elastic Light scattering) es una técnica físicoquímica empleada para la determinación de la distribución de masa molecular (Mw) de partículas en suspensión (Foord et al, 1970), o macromoléculas en disolución tales como proteínas o polímeros^[3]. La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que hay en una suspensión, se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa en una dirección, el haz de luz dispersado por distintas partículas, interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada. Como

consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí, cosa que también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión. Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), también se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas. Por norma general, en la dispersión de luz dinámica la suspensión de la muestra permanece en reposo. El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen.

El movimiento de las partículas da lugar a la difusión a través de la suspensión, donde la velocidad de difusión es más rápida para las partículas pequeñas, la cual depende del tamaño de las partículas. Éstas se mueven bajo ciertas condiciones que producen cambios en la medición de la frecuencia de luz que interactúa. La determinación del desplazamiento de frecuencia que ocurre cuando la luz interactúa con partículas de diferente tamaño, permite el cálculo del tamaño de partícula, así mismo la masa molecular. Dicha determinación, se denomina; dispersión de luz dinámica (DLS).

En la presente investigación se caracterizan diferentes lotes de hidroxietil almidón en disolución, con base en el análisis de la distribución de masa molecular (Mw) determinados por medio de la técnica de dispersión de luz dinámica, como método de verificación de que las muestras analizadas se encuentren dentro de los intervalos óptimos de distribución de masa molecular, establecidos por la farmacopea 8.0^[6].

II. PATE EXPERIMENTAL

A. Preparación de disoluciones

Disolución buffer a pH=4; se disolven 54.34g de acetato de sodio (99%^{m/m}) en agua desionizada (H_2O)_{desionizada}, se agregaron 100.0mL de ácido acético glacial (99.5% v/v) ambos adquiridos en Sigma Aldrich México. La disolución se lleva hasta marca de aforo a 100.0mL con agua desionizada (H_2O)_{desionizada}.^[6]

Se preparan cinco disoluciones de 25.0mL, para cada muestra sólida de HEA (Tabla 1), otorgadas por Laboratorios RIMSA, con disolución buffer de acetatos, en un intervalo de concentración de 0.0012 a 0.07 mg/mL. Las muestras de HEA previamente secadas en estufa a 90°C y posteriormente colocadas en desecador, se pesaron utilizando balanza analítica calibrada marca Ainswoth, modelo AA-250 y resolución de 0.1 mg

- Tabla 1 - Valores de concentración en mg/mL de las disoluciones de los lotes HEA

Lote	# de Muestra	Concentración (mg/mL)	
A	HEA 37 981	A1	0.001358
		A2	0.002932
		A3	0.004964
		A4	0.012438
		A5	0.020918
B	HEA 37 880	B1	0.001286
		B2	0.002834
		B3	0.004866
		B4	0.001223
		B5	0.002054
C	HEA 37 340	C1	0.035680
		C2	0.053630
		C3	0.071600
		C4	0.077290

A. Distribución de masa molecular y 2do coeficiente del virial

Determinadas por dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Microtrac Nanotracc Wave con un alcance en tamaño de partícula de 0.8 a 6,500 nm y peso molecular de 300 a 20x10⁶ Daltons (Da), ángulo de 180°, intervalo de pH 2 a 12, utilizando el software Microtrac FLEX® II.D.02 con métodos Debye y Debye-Hydro, ver Tabla 2.

Se colocan en la celda del Microtrac, 2.0mL de disolución muestra de HEA, por cada medición, ver Tabla 1.

Se realizaron tres corridas por cada lote de disoluciones de HEA, por método Debye Plot:

- Tabla 2 - Parámetro introducidos en los métodos Debye plot para el análisis de masa molecular y 2do coeficiente del virial

Método Debye Plot	Parámetro requerido	
	dn/dc	$\delta_{particula}$
Debye	✓	---
Debye-Hidro	✓	✓

El valor de dn/dc calculado = 0.1455 mL/g (Cambio del índice de refracción respecto al cambio de concentración), es muy aproximado al encontrado en literatura, dn/dc Teórico = 1.4^[7], la $\delta_{particula} = 1.5$ ^[8] (Densidad de $\delta_{particula}$)

III. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En Tabla 3 y Tabla 4, se muestran los valores determinados de la masa molecular en Daltons, para cada método Debye utilizado en cada corrida de muestras de hidroxietil almidón (A, B y C), así, como los resultados obtenidos por el método; segundo coeficiente virial (A_2) que nos indica la interacción de las partículas del polímero-disolvente, por otro lado el coeficiente de correlación con valor muy aproximado a 1.0 lo que hace referencia a la linealidad de los datos obtenidos en cada corrida.

- Tabla 3 - Parámetros obtenidos por el método Debye de las muestras HEA en cada corrida

Muestra	No. de Corrida	Masa molecular (Da)	A_2 (mL/g Da)	R
A	1	1.03x10 ⁵	4.57x10 ⁻⁴	0.655
	2	1.32x10 ⁵	5.52x10 ⁻⁴	0.944
	3	1.02x10 ⁵	2.42x10 ⁻⁴	0.764
B	1	1.45x10 ⁵	3.60x10 ⁻⁴	0.974
	2	1.38x10 ⁵	3.47x10 ⁻⁴	0.889
	3	1.53x10 ⁵	4.35x10 ⁻⁴	0.910
C	1	-1.08x10 ⁵	8.05x10 ⁻⁴	0.994
	2	-9.92x10 ⁴	9.46x10 ⁻⁴	0.963
	3	-1.08x10 ⁵	6.85x10 ⁻⁴	0.737

En la muestra C de HEA la masa molecular tiene valor negativo, no siendo erróneo, dicho valor se presenta en ambas técnicas Debye plot, debido al algoritmo de cálculo del software MicrotracFLEX®.

Realiza una extrapolación de la regresión lineal obtenida con ordenada al origen como el valor de masa molecular promedio

(Mw). Se estudia la dispersión de luz en solución diluida del polímero, esto es; se elimina la interferencia externa trabajando en el límite de dilución infinita, es decir, para concentraciones que tienden a cero; $C \rightarrow 0$. Si se determina el valor de la masa molecular hidrodinámica a partir del tamaño de las moléculas suspendidas por dispersión dinámica de la luz:

$$Mw = N\rho\pi D^3 / 6 \quad (2)$$

donde N es el número de Avogadro [mol^{-1}], ρ es la densidad molecular [g/cm^3] y D es el diámetro hidrodinámico [cm] y en conjunto con diagrama de Debye, que depende de una medida precisa de la luz que es dispersada por una suspensión molecular de concentración conocida. La proporción de la luz dispersada total a la luz incidente total es la relación de Rayleigh, (R). La expresión de Mw (ecuación 2) de Debye relaciona la masa molecular con la relación de Rayleigh y con la concentración de la muestra, por ello asumimos que a altas concentraciones $> 0.035 \text{ mg/mL}$, como es el caso de las disoluciones de la muestra C del polímero HEA, provoca un aumento en el valor de la pendiente que arroja un valor de masa molecular con signo negativo, ocasionado por el proceso de extrapolación antes mencionado.

- Tabla 4 - Parámetros obtenidos por el método Debye de las muestras de HEA en cada corrida

Muestra	No. de Corrida	Masa molecular (Da)	A (mL/g Da)	R
A	1	2.19×10^5	1.70×10^{-3}	1.000
	2	1.53×10^5	3.22×10^{-3}	0.993
	3	1.16×10^5	1.90×10^{-4}	0.950
B	1	1.08×10^5	1.41×10^{-3}	0.953
	2	1.41×10^5	3.03×10^{-4}	0.998
	3	1.37×10^5	4.64×10^{-4}	0.998
C	1	-1.20×10^5	8.52×10^{-4}	0.988
	2	-9.53×10^4	8.77×10^{-4}	1
	3	-1.24×10^5	8.03×10^{-4}	1

En la Tabla 5, se recopilaron los valores promedio de la masa molecular para cada lote de hidroxietil almidon. se observa que para la mayoría de las muestras HEA (A y B) se presenta una masa molecular mayor en el método Debye-Hidro, con respecto al método Debye, debido a que éste último no considera el valor de la densidad de la partícula en función de la masa y volumen de las partículas.

- Tabla 5 - Parámetros obtenidos por el método Debye-Hydro de las muestras de HEA en cada corrida

Muestra	Debye			Debye-Hydro		
	Masa molecular (Da)	A ₂ (mL/g Da)	R	Masa molecular (Da)	A ₂ (mL/g Da)	R
A	1.12×10^5	4.17×10^4	0.788	1.63×10^5	1.70×10^{-3}	0.981
B	1.45×10^5	3.81×10^4	0.924	1.29×10^5	7.26×10^{-4}	0.983
C	-1.05×10^5	8.12×10^4	0.898	-1.13×10^5	8.44×10^{-4}	0.995

- Tabla 6 - Distribución de masas moleculares (Da) European Pharmacopoeia, 8.0

Distribución masa molecular (Da)		
Bajo	Medio	Alto
2000 - 1000 000	100 000 - 300 000	300 000 - 900 000

Los datos obtenidos están delimitados para hacer una exhaustiva clasificación de las muestras de hidroxietil almidon, ya que; no tenemos dato alguno del proceso de síntesis orgánica y de sustitución estructural de la muestra.

Con base en Tabla 6, los lotes de HEA 37 981, 37 880 y 37 340, se encuentran dentro del intervalo promedio de masa molecular (Mw).

IV. CONCLUSIÓN

Por la técnica de DLS se puede determinar la masa molecular en el polímero hidroxietil almidon (HEA), así, como los factores que intervienen; algoritmo de cálculo del mismo y altas concentraciones.

Las disoluciones a concentraciones mayores a 0.035 mg/mL presentan masa molecular con valor negativo

Las muestras HEA 37 981, 97 880 y 37 340 en método Debye y Debye-Hydro, se encuentran dentro del intervalo de masa molecular optimos establecidos por la European Pharmacopoeia, 8.0. 2011

V. REFERENCIAS

[1] J. Garnacho Montero, E. Fernández Mondejár, R. Ferrer Roca, M.E. Herrera Gutierrez, J.A. Lorente, S. Ruíz Santana, A. Artigas, *Cristaloides y coloides en la reanimación del paciente crítico*. Med. Intensiva; 2015; 39(5):303-315

- [2] S. López Morales, J.H. Rosas Gabriel, N. Wilson Bello, C. Hernández Caballero, *Characterization of Hydroxyethyl Starch by HPSEC-MALLS*, International conference on polymers and advanced materials, Poster sesión, **2015**; PSI-47
- [3] A. Cuadross Moreno, R. Casañas Pimentel, E. San Martín Martínez, J. Yañes Fernández, *Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas*, J. Phys. Educ., **2014**; Vol. 8 No. 4, 4314
- [4] Estelrich, J. & Pons, M. *La espectroscopia de correlación fotónica y sus aplicaciones*, Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología **1991**: 81-86. ISSN 0213-5574.
- [5] J. Gotro Leave, *Dielectric Cure Monitoring Part 10: What Does Dielectric Cure Monitoring Measure*, Polymer Innovation, March 23, **2015**
- [6] European Pharmacopoeia, 8.0 Editions, 01/**2011**:1785, 3307–3311.
- [7] Theisen, A.; Johann, C.; Deacon, M.P.; Harding, S.E. *Refractive Increment Data-Book for Polymer and Biomolecular Scientists*, Nottingham University Press, Nottingham UK, **2000**. ISBN: 1-897676-29-8
- [8] densidad de partícula
- [9] Sommermeyer R, Cech F, Schossow R. *Differences in chemical structures between waxy maize- and potato-starch-based hydroxyethyl starch volumen therapeutics*. Transfus Altern Transfus Med **2007**; 9:127–133

▶ Apéndice 4.1



Characterization of Hydroxyethyl Starch by HPSEC - MALLS

S. López Morales^{1*}, J. H. Rosas Gabriel¹, N. Wilson Bello¹, C. Hernández Caballero²

Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-360, Coyoacán, 04510, D.F., México. ²Centro Medico Nacional 20 de Noviembre ISSSTE, Benito Juárez, 03229, D. F., México. e-mail: slm@iim.unam.mx



ABSTRACT

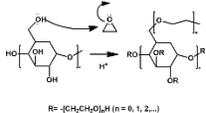
Hydroxyethyl starch (HES) is a semi-synthetic non-ionic polysaccharide, obtained by chemical modification of the hydroxyl groups on the C2 and C6 position of starch. The polymer is used as a volume expander and artificial colloidal blood plasma in human and veterinary medicine [1]. It is used for acute volume resuscitation in critically ill patients (hemorrhagic, traumatic, septic) and when it is necessary to improve tissue perfusion. Researchers have suggested that the pharmacokinetics of HES is complex, which depends on the average molecular weight (Mw) and mainly on the degree of molar substitution (MS) and concentration, which together can have a risky impact on the toxicity [2]. In this work, it is characterized by absolute chromatographic techniques to obtain the average molecular weight. The polymer is characterized using Size Exclusion Chromatography (SEC) coupled with Multi-Angle Laser Light Scattering (MALLS), and differential refractive index (RI). Measurements were performed in Water (H₂O), Saline solution of Sodium Chloride 0.9% in water, Buffer solution (Sodium Acetate in Water and glacial acetic acid, and sodium chloride in water and glacial acetic acid) to pH 4.25 and 30 °C.

OBJECTIVE

In this work, we get the right conditions for characterization by HPSEC-MALLS, MALLS (Zimm Plot) and the change in refractive index with respect to the concentration (dn/dc). To calculate the absolute molecular weight and molecular weight distribution of the HES in solution.

BACKGROUND

According to the European Pharmacopoeia 8.0 hydroxyethyl starch is synthesized from amylopectin, a natural starch derived from either corn or potatoes, via acid hydrolysis and reaction with ethylene oxide, and purified by ultra-filtration (see Scheme 1). It is characterized by HPSEC - MALLS, for molecular weight distribution and average molecular weight (Mw) of lower fractions ($Mw_{10\%}$) and high ($Mw_{90\%}$) [3].



HES is a polymer consisting of amylopectin amyloses 1.3 biosynthesized by enzymes which bind α -glucose chains. This monomer unit has the peculiarity that the OH groups in C4 and C6 positions differ in reactivity in the corresponding C1. Thus, during biosynthesis, the α (1,4) and α (1,6) glycoside bonds are formed, which means that the OH on C1 can form a bond with C4 or C6 positions of other chains, and all other possibilities (eg. the formation of rings etc.) are reduced.

CHARACTERIZATION

This study was performed online with a multi-detector coupled to a SEC chromatographic system using two online detector: a Multi-Angle Laser Light Scattering (MALLS) photometer, which measures the intensity of the scattered light at 16 angular locations ranging from 12.5° to 164.9°, and an interferometer-refractometer detector as a concentration measurement. Also it performed a Zimm Plot with MALLS equipment in batch mode.

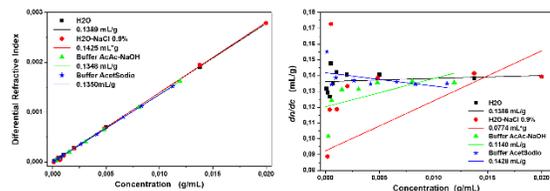


Figure 1. It shows the increase in refractive index with respect to the concentration (dn/dc) of HES in various solvents as well as the linear behavior of dn/dc with respect to the concentration.

REFRACTION INDEX AS A FUNCTION OF CONCENTRATION (dn/dc)

The specific refractive index increment is an important parameter necessary for processing the light scattering data. The dn/dc is a constant for a given polymer in a given solvent and depends on the wavelength and temperature. The Knowing (dn/dc), the calculation of the distribution of molecular mass (M_w) and the mean squared root radius (R_z), can be performed. Results are listed in Tables 1 and 2.

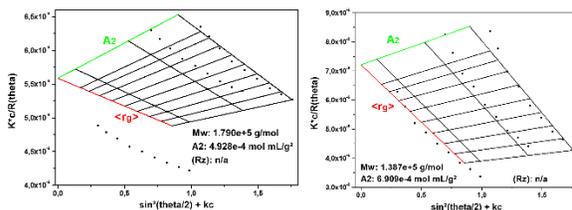


Figure 2. Zimm Plot of HES in buffer solution of Acetic Acid and Sodium Acetate, with pH = 4.3. Range of concentration 1.40 to 9.58 g/mL.

MALLS in Batch mode (Zimm Plot)

Zimm plot for raw material HES, it is shown in Figure 2. Each of three lines consisting of 9 data points represents angular variation acquired for a particular concentration; thick lines are concentration dependence at zero angle and angular dependence at zero concentration [4].

Molecular Weight Distribution (MWD) and RMS Radius (RMSRD)

Standard and raw material of HES with two different solutions: first buffer is acetic acid with sodium hydroxide in water, and the second acetic acid with sodium acetate in water is analyzed. Both solutions with pH = 4.3.

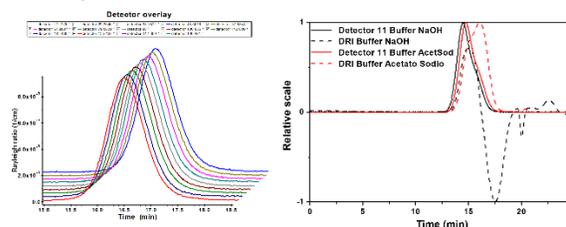


Figure 3. Normalization standard chromatogram HES 9 different detection angles in a range of 49° to 135° (a). As well as their behavior at 90 and DRI (b).

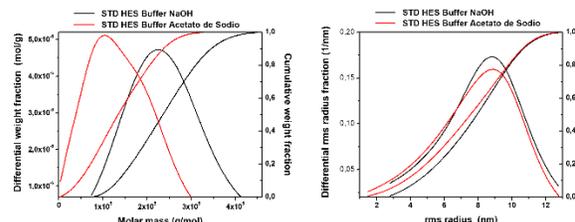


Figure 4. Differential Weight fraction and cumulative distribution curves versus Molar mass of standard HES determined by HPSEC-MALLS.

	Mw (g/mol)	$M_w^{(avg)}$ (g/mol)	$R_z^{(avg)}$ (nm)	MWD (g/mol)	RMSRD (nm)	Conformation
Norm Pharmacopoeia 8.0	100,000 - 300,000			>15,000 - <300,000		
STD HES NaOH	238,900	238,600	9.0	73,000 - 450,000	2.8 - 10.7	0.83
STD HES Acetato de Sodio	139,300	87,900	8.4	3,300 - 336,000	1.5 - 10.6	0.66
M.P. HES NaOH	254,200	241,200	10.2	83,100 - 460,000	2.4 - 15.0	0.90
M.P. HES Acetato de Sodio	132,500	69,200	8.7	2,400 - 310,000	1.8 - 12.9	0.64

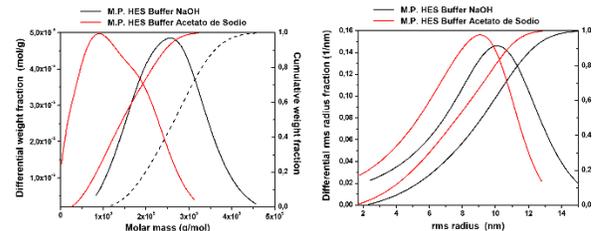


Figure 4. Differential Weight fraction and cumulative distribution curves versus Molar mass of raw material HES determined by HPSEC-MALLS.

CONCLUSIONS

Characterization of HES must be by laser light scattering MALLS in batch mode, and HPSEC-MALLS in continuous mode, both reveals variation in molecular weight distribution and RMS radius distribution, using different mobile phase for analysis. The results with the buffer solution of acetic acid with sodium acetate in water, are closer to the Pharmacopoeia 8.0 standard and the requirements of the manufacturer.

REFERENCES

- Gianfranco Pasut, *Polymers*, 6, 2014, 160 – 178.
- Polly A. Glover, Elke Rudloff and Rebecca Kirby, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24 (6), 2014, 642 – 661.
- European Pharmacopoeia, 8.0 Editions, 01/2011:1785, 3307 – 3311.
- Stjepan Podzimek, *Light Scattering, Size Exclusion – chromatography and Asimetric Flow Field Flow Fraction*, WILEY, USA, 2011.

REFERENCIAS

1. Garnacho Montero, J., Fernández Mondejár, E., Ferrer Roca, R., Herrera Gutierrez, M.E., Lorente J.A., Ruíz Santana, S., Artigas, A., **(2015)**, *Cristaloides y coloides en la reanimación del paciente crítico*, Med. Intensiva; 39(5):303-315.
2. Fernández J., B., **(2008)**, *Coloídes en cirugía cardiac, Anestécia cardiovascular*, Instituto nacional de cardiología; Vol. 31, págs. 127 y 128
3. Hernández Medina, M., Torruco Uco, J. G., Chel Guerrero, L., Betancur Ancona, D., **(2008)**, *Caracterización físico-química de Almidones de tubérculos cultivados en Yucatán*, México, Ciencia y Tecnología Alimenticia, Campinas, págs. 718 y 722.. Hernández Medina, M., Torruco Uco, J. G., Chel Guerrero, L., Betancur Ancona, D., (2008), Caracterización físico-química de Almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México, Ciencia y Tecnología Alimenticia, Campinas, págs. 718 y 722.
4. Chamorro, C., Romera, M. A., Márquez, J., **(2004)**, *Farmacología de los coloides sintéticos*, Rev. Emergencias, Servicio de Medicina Intensiva, Clínica Puerta de Hierro, Madrid, No.16, pág. 31.
5. Reis, R. L., Cunha, A. M., **(2005)**, Encyclopedia of Materials: Science and Technology.
6. **(a)** Raghunathan R., Hoover R., Waduge R., Liu Q. y Warkentin, **(2017)**, Impact of molecular structure on the physicochemical properties of starches isolated from different field pea (*Pisum sativum* L.) cultivars grow in Saskatchewan, Canada, Food Chemistry, No. 221, pág. 1514-1521. **(b)** Shevkani K., Singh N., Bajaj R. y Kaur A., **(2017)**, *Wheat starch production, structure, functionality and applications*, International Journal of Food Science and Technology, no. 52, Vol. 1, pág. 38-58. **(c)** Wang, L. Z., White P. J., **(2016)**, Structure and physicochemical properties of starches from oats with different lipid content, Cereal Chemistry, v. 71, no. 5, pág. 443-450. **(d)** Betancure A., **(2001)**, Physicochemical and functional characterization of baby lima bean *Phaseolus lunatus*) starch, v. 53, n. 5, p. 219-226.
7. Tester, R. F., Karkalas, J., Qi, X., **(2004)**, *Starch structure and digestibility enzyme-substrate relationship*, World's Poultry Science Journal, Vol. 60, pág. 188-193.
8. Meneses, J., Corrales, M. C., ValenCia, M., **(2007)**, *Síntesis y caracterización de un polímero biodegradable a partir del almidón de yuca*, Revista EIA, No. 8; pág. 57-67. Recuperado desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/eia/n8/n8a06.pdf>
9. Wurzburg, O. B., **(1986)**, *Modified starches: properties and uses*, Boca Raton, Florida, pág. 277.

10. Aguilar, J., A. de Andrés, J., de León, O., Gómez-Luque, A., Torres Montero, L. M., **(2001)**, *Tratado de Anestecia y Reanimación*, Edicione Arán, Tomo II, España, Capítulo 53, Págs. 1526 y 1527. Recuperado desde: https://books.google.com.mx/books?id=W3eIk22N_soC&pg=PA1526&dq=hidroxietilacion&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwilgPLwidvZAhUIz2MKHep8DAoQ6AEIKTAA#v=onepage&q=hidroxietilacion&f=false
11. Vasudevan, D.M., Sreekumari, S., Kannan, V., **(2011)**, *Texto de Bioquímica*, 6° Edición, Editorial Cuéllar Ayala, México, págs. 68 y69.
12. Vazquez Contreras, E., **(2003)**, *Características de las principales lipoproteínas en suero humano*, Bioquímica y Biología molecular, en Línea, UNAM.
13. Wan J., Z., Xiaoshun Y., Z., Jisheng Li, J. Y., Xiangliang W., F., H. Rongli, J. L., Zhenhong, H. B., **(2011)**, China, Patente N°. 102276742A, Donghu, Wuhan: China Patent & Trademark Office. Recuperado desde: [https://patents.google.com/patent/CN102276742A/en?q=poly\(o-hydroxyethyl\)starch](https://patents.google.com/patent/CN102276742A/en?q=poly(o-hydroxyethyl)starch)
14. Michael Boll, Andreas Fisch y Donat R. Spahn, **(2005)**, E.E.U.U, Patente N° 7863260B2, Washington, DC: United States Patent and Trademark Office. Recuperado desde: <https://patents.google.com/patent/US7863260B2/en?q=US+7%2c863%2c260+B2>
15. Sandoval Aldana, A., Rodríguez S., E., Fernández Q., F., **(2004)**, *Aplication of analysis by differential scanning calorimetry (dsc) for the characterization of the modifications of the starch*, Medellin, ISSN 0012-7353, págs. 45-53.
16. Pingyi Zhang, L. Whistler, R., N. BeMiller, J., R. Hamaker, B., **(2005)**, *Banana starch: production, physicochemical properties and digestibility*, Carbohydrate Polymers, Págs. 59, 443 – 458.
17. Xu Y. Miladinov V., Hanna M.A., **(2004)**, *Synthesis and characterization of starch acetates with high substitution*, Cereal Chemistry, No. 81, pág. 735-740.
18. Peñaranda Contreras, O. I., Perilla Perilla, J. E. y Algecira Enciso, N. A., **(2008)**, *Revisión de la modificación química del almidón con ácidos orgánicos*, Revista Ingeniería e Investigación, Vol. 28, No. 3, pág. 47-52.
19. R. Sandoval, E., S. Aldama, A., F. Quintero, A., **(2007)**, *Evaluación de retrogradación de almidón en harina de Yuca precocida*, Revista colombiana de Química, Vol. 36(1); 13-30, págs. 15 y 19. Recuperado desde: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcq/v36n1/v36n1a02.pdf>

20. Vicente Llau, J., Basora, M., Colomina, Ma. J., Ferrandis, R., Gómez, A., Jover, J. L., Moral, V., **(2010)**, *Medicina Transfusional perioperatoria*, 2da. Edición, Elsevier, Barcelona, España, pág. 289. Recuperado desde: <https://books.google.com.mx/books?id=GnWCDwAAQBAJ&pg=PA289&dq=funcion+de+coloide+sintetico&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjbrOTS2qbjAhULs54KHwabDGgQ6AEILDAA#v=onepage&q=funcion%20de%20coloide%20sintetico&f=false>
21. Francés González, S, Nadal Clanchet, M, Armengol Carrasco, M, **(2015)**, *Efecto de la hidratación endovenosa con Hidroxietil almidón 6% (Voluven®) versus Ringer Lactato previa a la analgesia epidural en la incidencia de hipotensión durante el trabajo de parto*, Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España, pág. 30. Recupero desde: https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2015/hdl_10803_292373/sfq1de1.pdf
22. Kozek Langenecker, S, **(2005)**, *Effects of hydroxyethyl starch solutions on hemostasis*, Revista Anesthesiology, No. 103, pág. 60 y 654-656.
23. Boldt J., Suttner S., **(2005)**, *Plasma substitutes*, Revista Minerva Anesthesiol; No. 71, págs. 58-60 y 741.
24. Canto Sanchez, A. L., Higgins Guerra, L. F., **(2008)**, *Anestecía Obstétrica*, editorial El manual moderno, 2da. Edición, México. Recuperado desde: https://books.google.com.mx/books?id=yDTHCQAAQBAJ&pg=PA180&lpg=PA180&dq=hidroxietilacion&source=bl&ots=tbLsIE3R01&sig=16HVRGHmupedF2JSdNcAc5eJjDY&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj8jcTd_9rZAhUIwmMKHS-7tAXQQ6AEIPTAD#v=onepage&q&f=false
25. Mena Miranda, V. R., Lobaina Bárzaga, G. A., Vialat Soto, V., Pérez Souto, E., y Torriente Blanco, N., **(2004)**, *Reemplazo de volumen. Coloides (II)*, Revista Cubana de Pediatría, vol.76, No. 2, Habana, Cuba. Recuperado desde: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312004000200007
26. Nilson Oleskovicz, Duque, J. C., Prado Guirro, E. C., Araújo Valadão, C. A., Tabacchi Fanton, D., **(2008)**, *Evaluación hemodinámica y metabólica de ketamina y ketamina S(+) después del reemplazo voluminomio con Hidroxietil amido 130/0.4 y solución salina hipertónica 7,5%*, Vol. 38, No. 4, págs. 1017 y 1018.
27. Patino Restrepo, J. F., **(2006)**, *Metabolismo, nutrición y shock*, 4ta. Edición, editorial médica internacional, Bogotá, Colombia; pág. 251. Recuperado desde: <https://books.google.com.mx/books?id=byrA9axJu4kC&pg=PA251&dq=hipoxia+celular&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjKq4aHnanjAhWMGM0KHeHyBmMQ6AEIKTAA#v=onepage&q=hipoxia%20celular&f=false>

28. Álvarez Calvo, J. L., **(2008)**, *Bioquímica nutricional y metabólica del bovino en el trópico*, Editorial Universidad de Antioquia, Colombia, pág. 26. Recuperado desde: <https://books.google.com.mx/books?id=Noc2neOIRhkC&pg=PA96&dq=acidosis+metab%C3%B3lica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjKsabBm6njAhVIB50JHXBjC1QQ6AEILzAB#v=onepage&q=acidosis%20metab%C3%B3lica&f=false>
29. Lote, C. J., **(2000)**, *Principles of renal physiology*, Springer, 4ta edición, pág. 97-100.
30. Berrazueta Fernández, J. R., **(2005)**, *El endotelio ese órgano desconocido: Estudio de su principal molécula de síntesis*, Instituto de España, Real academia nacional de medicina, Madrid, España, págs. 29 y 30. Recuperado desde: <https://books.google.com.mx/books?id=y1Y2GAaGge0C&pg=PA29&dq=endotelio&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi2z6jv5qrjAhUogK0KHWdqD24Q6AEINDAC#v=onepage&q=endotelio&f=false>
31. Carrillo González, G. M., **(2006)**, *Enfermería en la administración de soluciones cristaloides y coloides*, Revista de actualización en Enfermería, Vol. 9, No. 4, págs. 14-20.
32. Chol Kim, Atsuhiko Sakamoto, **(2006)**, *Differences in the Leukocyte Response to Incision During Upper Abdominal Surgery with Epidural Versus General Anesthesia*, Journal Nippon Medic, Vol. 73, No. 1, págs.4-9.
33. VOLUVEN® Solución Inyectable, **(2018)**, Ficha técnica Laboratorios Fresenius Kabi México, S.A. de C.V.
34. VOLUVEN®, **(2018)**, Ficha Técnica. Recuperada desde: https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/64001/FichaTecnica_64001.html.pdf
35. Ramírez-Gama, R. M., Luna Millán, B., Velásquez Madrazo, O., Vierna García, L., Mejía Chávez, A., Tsuzuki Reyes, G., Hernández Gómez, L., Müggenburg, I., Camacho Cruz, A. y Urzúa Hernández, M del C., **(2011)**, *Manual de Prácticas de Microbiología General*, 5ª edición, Facultad de Química, UNAM, México
36. Cornelius Jungheinrich, M. D., **(2007)**, *The starch family: are they all equal? pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyethyl starches*, Journal Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine (TATM), No. 9, pág. 152-163. Recuperado desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1778-428X.2007.00070.x>

37. J.M. Vadillo Gonzales, G.J. Yanes Vidal, P. Gilbert Navarro, **(2008)**, *Hidroxietyl almidón y su papel en la optimización de la fluidoterapia*, Info Colloids, Fresenius Kabi, Barcelona, España, 18, 3–35.
38. Navío Serrano, A., **(2014)**, *Actualización del manejo del paciente en shock*, editorial Bubok, España. Recuperado desde: https://books.google.com.mx/books?id=4gaMBQAAQBAJ&pg=PT165&dq=vida+media+de+hidroxietil&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEWjo6fqniL3jAhXPB80KHb_tAZwQ6wEILzAB#v=onepage&q=vida%20media%20de%20hidroxietil&f=false
39. Vadillo González, J. M., Yanes Vidal, G. J., Gilabert Navarro, P., **(2008)**, *Hidroxietylalmidón y su papel en la optimización de la fluidoterapia*, Revista Info Colloids, Fresenius Kabi, No. 18, págs. 9.
40. Hernández Rodríguez, M., Sastre Gallego, A., **(1999)**, *Tratado de nutrición*, ediciones Díaz Santos S. A., Madrid, España, pág. 127.
41. Diario oficial de la Unión Europea, **(2019)**, Resumen de decisiones de la Unión Europea sobre autorizaciones de comercialización de medicamentos, No. 62º, C 80/01 y C 80/02, págs. 1-11. Recuperado desde: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=OJ:C:2019:080:FULL&from=EN>
42. Homedes Beguer, N., Ugalde, A., **(2013)**, *Fármacos-Boletín electrónico latinoamericano para fomentar el acceso y el uso adecuado de medicamentos*, Vol. 16, No. 3, pág. 4. Recuperado desde: <http://www.saludyfarmacos.org/wp-content/files//ago2013.pdf>
43. Food and Drugs, **(2008)**, *Destacados de la información de prescripción de suero de hidroxietil almidón*, pág. 6. Recuperado desde: <https://www.fda.gov/media/72764/download>
44. European Medicines Agency (EMA), **(2013)**, *Cese del uso de las soluciones que contienen hidroxietil almidón (HEA) en pacientes con septicemia, quemados o en estado crítico*, EMA/809470/2013, Recuperado desde: <https://www.ema.europa.eu>
45. Alibaba Group, **(2019)**, *Alibaba-Buy directly from manufactures*, Singapur, Alibaba.com, <https://spanish.alibaba.com/g/hydroxyethyl-starch-130.html>
46. Instituto Mexicano del Seguro Social, **(agosto 2018)**, *Guía Grupo No. 21: Soluciones Electrolíticas y Sustitutos del Plasma*, pág. 2.
47. European Pharmacopoeia, **(2013)**, *editores Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM)*, Estrasburgo, Francia, 8a edición, Vol. 1, págs. 1785, 3307 – 3311.

48. Saviour, A., U. y Moses M., S., **(2016)**, *Polymer Characterization: Polymer Molecular Weight Determination*, Polymer science, pág.412-419. Recuperado desde:
https://www.researchgate.net/publication/311438189_Polymer_Characterization_Polymer_Molecular_Weight_Determination
49. Facultad de Química, **(2019)**, *Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII)-Análisis térmico*, Ciudad universitaria, México, Quimica.unam.mx, <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii>
50. Cesteros Iturbe, L. C., **(2004)**, *Aplicaciones de la FTIR al estudio de las interacciones polímero-polímero*, Rev. Iberoamericana de Polímeros, Vol. 5, No. 3, págs. 111-132.
51. Tenorio Hernández, A., López Morales, S., **(2018)**, *Determinación de masa molecular (Mw) de nanopartículas de hidroxietil almidón por dispersión de luz dinámica (DLS)*, Seminario Facultad de Química, Ciudad universitaria, México, pág. 1-5.
52. Cedillo Valverde, G., **(2017)**, *Proceso de RMN*, Protocoló de Laboratorio de espectroscopía de resonancia magnética Nuclear, IIM-UNAM, Ciudad Universitaria.
53. Vickerman, J., Gilmore, J., **(2009)**, *Surface Analysis - The Principal Techniques*, 2da edic., edit. John Wiley & Sons Ltd, Cáp. III, Págs. 47-60
54. Thermo Scientific, **(2019)**, *Conocer XPS - Análisis de superficies y películas delgadas*, xpssimplified.com, <https://xpssimplified.com/whatisxps.php>
55. Roger Smart, McIntyre, S., Bancroft, M., Bello, I., **(2015)**, *X-ray Photoelectron Spectroscopy*, Department of Physics and Materials Science, City University of Hong Kong.
56. Physical Electronics, **(2019)**, *PHI VersaProbe II - Scanning XPS*, Phi.com, <https://www.phis.com/surface-analysis-equipment/versaprobe.html>
57. Microanalítica, **(2019)**, *Micrometrics Densidad-Picnómetro AccuPyc II 1340*, microanalítica.com, <https://www.microanalitica.com.ar/densidad.html>
58. Manual Micrometrics, **(2019)**, *Accupyc II - Gas displacement pycnometry system*. Recuperado desde:
https://www.micromeritics.com/Repository/Files/Accupyc_Brochure_2015.pdf
59. Sánchez Mora, J. J., **(2003)**, *Comportamiento térmico y mecánico del poli(etilén tereftalato) (PET) modificado con resinas poliméricas basadas en bisfenol-A*, Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Catalunya (UPC),

- Barcelona, España, pág.86 y 87. Recuperado desde: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/93351/01Parte_A.pdf
60. Santalla Tarrago, J. M. y Ramis, J. X., **(1999)**, *Curso sobre calorimetría en polímeros*, Universidad Politécnica de Catalunya (UPC), Barcelona, España, Departamento de maquinas y motores térmicos, Tema 7; Métodos de análisis térmico diferencial, pág. 26. Recuperado desde: <https://docplayer.es/user/9298917/>
 61. Fried R., J., **(2014)**, *Polymer science and technology*, 3ra. Ed., Prentide Hall, Cap. II – IV y XI.
 62. Aburto, J., **(1999)**, *Synthesis characterization and biodegradability of fatty acid esters of amilose and starch*, Journal of Applied Polymer Science, No. 74, págs. 1440-1452.
 63. Stepan Podzimek, **(2011)**, *Light Scattering Size exclusion Chromatography and asymmetric flow field flow fractionation*, J. Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, págs. 40-42 y 65.
 64. Mexpolímeros, **(2019)**, *Peso molecular*, mexpolimeros.com, <https://www.mexpolimeros.com/peso%20molecular.html>
 65. Hernández, Espindola, J. M., Cardenas Cisneros, K. V., De Jesus Pablo, A. M., Gómez Ceferino, J. A., **(2017)**, *Pesosmoleculasres y su distribución*, Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, Pág. 7-8 y 14-20
 66. Klaus Sommermeyer, Franz Cech y Richarda Schossow, **(2007)**, *Differences in chemical structures between waxy maize- and potato starch-based hydroxyethyl starch volume therapeutics*, Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine.
 67. López Morales, S., Rosas Gabriel, J.H., Wilson Bello, N., Hernández Caballero, C., **(2015)**, *Characterization of Hydroxyethyl Starch by HPSEC-MALSS*, International conference on polymers and advanced materials, Poster sesión; PS1-47.
 68. B. Seymour, R., E. Carraher, C., **(2002)**, *Introducción a la química de los polímeros*, Editorial Reverté, S.A, Capitulo 3, págs. 74-76.
 69. J. Tetlow, Morell, M. K. and Emes, M. J., **(2004)**, *Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants*, J. Exp. Bot., 55, 2131 – 2145.
 70. Carrillo González, G. M., **(2006)**, *Enfermería en la administración de soluciones cristaloides y coloides*, Revista de actualización en Enfermería, Vol. 9, No. 4, págs. 14-20.

71. Folleto de información médica de VOLULYTE®, **(2009)**, Instituto de salud pública de Chile, pág. 4.
72. Ortiz Aparicio, F. M., Hasbun Velasco, J. P., Granado Rocha, D. L., **(2012)**, *Evidencia actual sobre el uso de soluciones coloides versus cristaloides durante la reanimación del paciente con shock*, Gaceta medica de Bolivia, Vol. 35, No. 2, págs. 96-99.
73. Pineda Gómez, P., Coral, D. F., Arciniegas, M. L., Rorales Rivera, A. y Rodríguez García, M. E., **(2010)**, *Papel del agua en la gelatinización del almidón de maíz: estudio por calorimetría diferencial de barrido*, Vol. 6, No. 11, págs. 129-141.
74. Mark A. Warner, **(2009)**, *Hydroxyethyl Starches*, *Anesthesiology*, 111, 187 – 202.
75. Juliëtte E. M. van Eerd, Erik Vegt, Jack F. M. Wetzels, Frans G. M., Russel, Rosalinde Masereeuw, Frans H. M. Corstens, Wim J. G. Oyen y Otto C. Boerman, **(2006)**, *Gelatin-Based Plasma Expander Effectively Reduces Renal Uptake of In-Octreotide in Mice and Rats*, *The Journal of Nuclear Medicine*, 47: Págs. 528-533. Recuperado desde: <http://jnm.snmjournals.org/content/47/3/528>
76. Bunn F, Trivedi D, Ashraf S., **(2011)**, *Colloid solutions for fluid resuscitation*, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, No. 3. Pág. Recuperado desde: <https://sci-hub.tw/https://doi.org/10.1002/14651858.CD001319.pub3>
77. Fundación para la formación e investigación sanitaria de la región de Murcia. **(2019)**. *Agua, Fluidoterapia y Osmolaridad: Principios básicos de la ósmosis y la presión oncótica. Cálculo de la osmolalidad plasmática (OSMp)*, Murcia, España. Recuperado desde: http://www.ffis.es/volviendoalobasico/2principios_bsicos_de_la_smosis_y_la_presin_onctica_clculo_de_la_osmolalidad_plasmtica_osmp.html