



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Desarrollo de una formulación parenteral a base
de nanopartículas de Quitosán-glutati6n.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

P R E S E N T A:

ALAN ISRAEL TINOCO LAGUNAS

ASESOR: DR. ROBERTO DÍAZ TORRES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Desarrollo de una formulación parenteral a base de nanopartículas de Quitosán-glutatin

Que presenta el pasante: **Alan Israel Tinoco Lagunas**

Con número de cuenta: **415099028** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	D.A.R. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
SECRETARIO	Dr. Roberto Díaz Torres	
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Alvarez Avila	
2do. SUPLENTE	M.I. Claudia Mariano Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: Tesis

Desarrollo de una formulación parenteral a base de nanopartículas de Quitosán-glutión

Que presenta el pasante: Alan Israel Tinoco Lagunas
Con número de cuenta: 415099028 para obtener el Título de: Licenciado en Farmacia.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>D.A.R. Juan José Díaz Esquivel</u>	
VOCAL	<u>Dra. Patricia Ramírez Noguera</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M.C. Guadalupe Alvarez Avila</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M.I. Claudia Mariano Hernández</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Desarrollo de una formulación parenteral a base de nanopartículas de Quitosán-glutatin

Que presenta el pasante: **Alan Israel Tinoco Lagunas**

Con número de cuenta: **415099028** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	D.A.R. Juan José Díaz Esquivel	_____
VOCAL	Dra. Patricia Ramírez Noguera	_____
SECRETARIO	Dr. Roberto Díaz Torres	_____
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Alvarez Avila	_____
2do. SUPLENTE	M.I. Claudia Mariano Hernández	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Desarrollo de una formulación parenteral a base de nanopartículas de Quitosán-glutatin

Que presenta el pasante: **Alan Israel Tinoco Lagunas**

Con número de cuenta: **415099028** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia.**

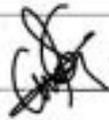
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>D.A.R. Juan José Díaz Esquivel</u>	_____
VOCAL	<u>Dra. Patricia Ramírez Noguera</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M.C. Guadalupe Alvarez Avila</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M.I. Claudia Mariano Hernández</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de: **Tesis**

Desarrollo de una formulación parenteral a base de nanopartículas de Quitosán-glutatión

Que presenta el pasante: **Alan Israel Tinoco Lagunas**

Con número de cuenta: **415099028** para obtener el Título de: **Licenciado en Farmacia.**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Mayo de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	D.A.R. Juan José Díaz Esquivel	_____
VOCAL	Dra. Patricia Ramírez Noguera	_____
SECRETARIO	Dr. Roberto Díaz Torres	_____
1er. SUPLENTE	M.C. Guadalupe Alvarez Avila	_____
2do. SUPLENTE	M.I. Claudia Mariano Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



DEDICATORIA



todos los animales de laboratorio que ayudan a la formación de los profesionales en ciencias de la salud, incluido Wakko.





AGRADECIMIENTOS



la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por brindarme un lugar y toda la experiencia de mi carrera.

- A mi familia, a mis padres por todo el esfuerzo empleado para que yo pudiera concluir mis estudios, a mis hermanos por el apoyo durante los mismos y a Nuffy que, aunque no estuviste en la carrera fuiste parte del camino para llegar a ella, gracias por creer en mi incluso cuando yo no lo hacía.
- Al crew: Pedrovsky, Nans, Tanga, Pablink, Tonas, por todo el apoyo, los consejos y las experiencias en la carrera, de principio a fin fueron una parte fundamental de ésta, y a Pawis que además de la carrera me acompañaste y ayudaste mucho en el desarrollo de la tesis, no habría sido lo mismo sin ustedes.
- A la Unidad de investigación multidisciplinaria, al Dr. Roberto Díaz Torres por todo su apoyo, confianza y conocimientos brindados además de la oportunidad para poder desarrollar este proyecto, a la Dra. Patricia Ramirez Noguera por el apoyo y consejos brindados y a Sofi por ayudar en mis pruebas experimentales.



ÍNDICE

Abreviaturas.....	12
Índice de tablas	13
Índice de figuras.....	14
Índice de gráficas	14
Índice de diagramas.....	15
1. Introducción	16
2. Marco teórico	18
2.1 Desarrollo farmacéutico.....	18
2.1.1 Preformulación.....	18
2.1.2 Formulación	19
2.2 Formas parenterales	20
2.2.1 Vías de administración parenteral	20
2.2.1.1 Sistemas de envasado.....	22
2.2.2.2.1 Material de envase.....	22
2.2.2.2.2 Tipos de envase	22
2.2.2 Ventajas y desventajas de las soluciones parenterales	23
2.2.3 Métodos de elaboración.....	24
2.2.3.1 Soluciones inyectables	25
2.2.3.2 Emulsiones inyectables	25
2.2.3.3 Concentrados y polvos para inyección o perfusión	26
2.2.3.4 Suspensiones inyectables.....	27
2.2.3.4.1 Aspectos críticos en la formulación de las suspensiones.....	28
2.2.3.4.2 Excipientes empleados en la preparación de las suspensiones.....	29
2.2.3.4.3 Métodos de preparación	30
2.2.3.5 Geles inyectables	31
2.2.3.6 Implantes	31
2.2.3.7 Nanopartículas	32
2.2.3.8 Micelas poliméricas.....	32
2.2.3.9 Liposomas.....	32
2.2.4 Características de calidad de soluciones parenterales	33
2.2.4.1 Limpidez	33



2.2.4.1.1 Partículas visibles	34
2.2.4.1.2 Partículas subvisibles	34
2.2.4.2 Neutralidad	35
2.2.4.2.1 Potenciómetro	35
2.2.4.2.2 Papel indicador de pH	36
2.2.4.3 Isotonicidad	36
2.2.4.3.1 Isotonización de formas parenterales	36
2.2.4.3.2 Control de Isotonicidad	37
2.2.4.4 Esterilidad	38
2.2.4.4.1 Métodos físicos	38
2.2.4.4.2 Métodos químicos	44
2.2.4.4.3 Agentes antimicrobianos	45
2.2.4.5 Apirogenicidad	45
2.2.4.5.1 Adsorción	45
2.2.4.5.2 Filtración	46
2.2.4.5.3 Inactivación	46
2.2.4.5.4 Otros métodos	46
2.2.4.6 Estabilidad	46
2.2.4.6.1 Factores que influyen en la estabilidad	46
2.2.4.6.2 Estudios de estabilidad en el ámbito hospitalario	47
2.3 Nanopartículas	47
2.3.1 Definición	47
2.3.2 Historia	48
2.3.3 Aplicaciones de la micro y nanoencapsulación de fármacos	48
2.3.4 Materiales utilizados en micro y nanoencapsulación de fármacos	49
2.3.4.1 Lípidos	49
2.3.4.2 Proteínas	50
2.3.4.3 Polímeros	50
2.3.5 Métodos de elaboración de nanopartículas	50
2.3.5.1 Formación de nanopartículas y nanocápsulas por polimerización	50
2.3.5.2 Emulsificación y evaporación del disolvente	51
2.3.5.3 Desplazamiento de disolvente y de deposición interfacial	51
2.3.5.4 Salting-out	52
2.3.5.5 Formación de nanopartículas por gelificación iónica y complejación electrostática	53
2.3.5.6 Producción de nanopartículas por coacervación de macromoléculas	53
2.3.5.7 Nanopartículas lipídicas preparadas por fusión-emulsificación	54



2.3.6 Nanopartículas vía parenteral	54
5.3.7 Nanopartículas y antioxidantes	54
2.4 Glutación	55
2.4.1 Definición y funciones.....	55
2.4.2 Estrés oxidativo (EO).....	56
2.4.3 Enfermedades hepáticas	56
2.4.3.1 Terapias farmacológicas.....	57
2.4.4 Quitosán-Glutación	58
3. Planteamiento del problema.....	60
4. Hipótesis	61
5. Objetivos	62
5.1 Objetivo General.....	62
5.2 Objetivos específicos.....	62
6. Materiales y métodos.....	63
6.1 Reactivos.....	63
6.2 Aparatos y equipos.....	64
6.3 Métodos	64
7. Resultados y análisis.....	69
7.1 pH	71
7.2 Porcentaje de encapsulamiento.....	73
7.3 Porcentaje de hemólisis.....	77
7.4 Tamaño de partícula.....	81
7.5 Optimización de sistemas inyectables.....	84
8. Conclusiones	89
9. Perspectivas.....	91
10. Referencias.....	92



ABREVIATURAS

- Ⓟ (GPx): Glutación-peroxidasa
- Ⓟ (GSH): Glutación en forma reducida
- Ⓟ (GSSSG): Glutación en forma oxidada
- Ⓟ [H₃O⁺]: Ion hidronio
- Ⓟ μm: Micrómetros
- Ⓟ BAc: Buffer de acetatos
- Ⓟ C₂H₄O₂: Ácido acético glacial
- Ⓟ Cl: Cloro
- Ⓟ DMSO: Dimetil sulfóxido
- Ⓟ DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
- Ⓟ EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
- Ⓟ EO: Estrés oxidativo
- Ⓟ ERN: Especies reactivas de nitrógeno
- Ⓟ ERO: Especies reactivas de oxígeno
- Ⓟ ETO: Óxido de etileno
- Ⓟ GSH: Glutación
- Ⓟ GSHm: Glutación mitocondrial
- Ⓟ h: Horas
- Ⓟ H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- Ⓟ KCl: Cloruro de potasio
- Ⓟ KH₂PO₄: Fosfato de potasio
- Ⓟ LTSF: Esterilización con vapor de agua a bajas temperatura y formaldehído
- Ⓟ mM: Milimolar
- Ⓟ Na: Sodio
- Ⓟ Na₂HPO₄: Fosfato de disodio
- Ⓟ NAC: N-acetilcisteína
- Ⓟ NaC₂H₃O₂: Acetato de sodio
- Ⓟ NaCl: Cloruro de sodio
- Ⓟ NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- Ⓟ NaOH: Hidróxido de sodio
- Ⓟ nm: nanómetros
- Ⓟ NP: Nanopartículas
- Ⓟ O: Oxígeno
- Ⓟ O/A: Aceite en agua
- Ⓟ p/v: Peso-volumen
- Ⓟ PBS: Buffer salino de fosfatos
- Ⓟ PF-68: Pluronic F-68
- Ⓟ pH: Potencial de hidrógeno
- Ⓟ ppi: Agua estéril apirógena (Preparada para inyección)
- Ⓟ SSF: Solución salina fisiológica
- Ⓟ TNB: Ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico
- Ⓟ TPP: Tripolfosfato
- Ⓟ UV: Ultravioleta



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características a evaluar en los estudios de preformulación (Wells,J.2014)	19
Tabla 2 Características y usos de diferentes vías de administración parenteral (Peris,J.2013)	20
Tabla 3 Clasificación de las formas parentelas en funciones del método de elaboración (Garreta, J.2016)	24
Tabla 4 Evaluación de la limpidez en soluciones de uso parenteral. Límites de partículas subvisibles (Garreta,J.2016)	34
Tabla 5 Tiempos de esterilización estándar en autoclave a 121°C en función del volumen de los envases (Suárez,A.2016)	39
Tabla 6 Tipos de filtración atendiendo a distintos criterios de clasificación (Sans,M.2016)	41
Tabla 7 Cantidad de excipientes en base al diseño realizado	66
Tabla 8 Medios de dilución para los sistemas inyectables	71
Tabla 9 pH de las soluciones inyectables en relación al porcentaje de acetato de sodio en dilución 1:50	72
Tabla 10 pH del inyectable en dilución 1:50 en buffer de acetatos con solución salina	73
Tabla 11 Absorbancias de porcentaje de encapsulamiento en sistemas inyectables	74
Tabla 12 Porcentajes de encapsulamiento de sistemas inyectables	75
Tabla 13 Absorbancias obtenidas por triplicado de las 12 formulaciones en estudio para calcular el porcentaje de hemólisis en los sistemas inyectables.	78
Tabla 14 Absorbancias de control de porcentaje de hemólisis en sistemas inyectables	79
Tabla 15 Porcentaje de hemólisis en sistemas inyectables	80
Tabla 16 Tamaños de partícula en sistemas inyectables	82
Tabla 17 pH en sistemas inyectables optimizados	85
Tabla 18 Absorbancias de porcentaje de encapsulamiento en sistemas inyectables optimizados	85
Tabla 19 Porcentaje de encapsulamiento en sistemas inyectables optimizados	86
Tabla 20 Absorbancias de porcentaje de hemólisis en sistemas inyectables optimizados	86
Tabla 21 Absorbancias de control de porcentaje de hemólisis <i>optimizados</i> en sistemas inyectables ..	87
Tabla 22 Porcentaje de hemolisis en sistemas inyectables optimizados	87
Tabla 23 Tamaño de partícula de sistemas optimizados	88



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Vías de administración parenteral (Tinoco, A.2020).....	21
Figura 2 Nanosistemas de liberación de fármacos (Tinoco, A.2020).....	33
Figura 3 Esquema de proceso de filtración (Tinoco, A.2020).....	40
Figura 4 Tipos de filtro (Tinoco, A.2020).....	43
Figura 5 Modalidades de filtración según el tipo de retención (Tinoco, A.2020).....	43
Figura 6 Estructuras resultantes de un proceso de micro o nanoencapsulación (Tinoco, A.2020).....	47
Figura 7 Método emulsificación y evaporación del disolvente (Tinoco, A.2020).....	51
Figura 8 Método de desplazamiento del disolvente y de deposición interfacial (Tinoco, A.2020).....	52
Figura 9 Método de salting-out (Tinoco, A.2020).....	52
Figura 10 Método de gelificación iónica (Tinoco, A.2020).....	53
Figura 11 Proceso de microencapsulación por coacervación (Tinoco, A.2020).....	54
Figura 12 Estructura del glutatión (Fernández ,J.2008).....	55
Figura 13 Estructura del quitosano (Zetina,L.2019).....	58
Figura 14 Sistemas inyectables óptimos.....	70
Figura 15 Prueba de gelación iónica.....	70
Figura 16 Reacción de Ellman.....	74
Figura 17 Control positivo y negativo de prueba de hemólisis.....	79
Figura 18 Prueba de hemólisis (Sistemas 1-6).....	79
Figura 19 Prueba de hemólisis (Sistemas 7-12).....	80

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Efectos principales para porcentaje de encapsulamiento.....	77
Gráfica 2 Efectos principales para porcentaje de hemólisis.....	81
Gráfica 3 Efectos principales para tamaño de partícula.....	83
Gráfica 4 Superficie de respuesta estimada.....	84
Gráfica 5 Dispersión de optimización(porcentaje de encapsulamiento).....	86



Gráfica 6	Dispersión de optimización (porcentaje de hemólisis).....	87
Gráfica 7	Dispersión de optimización (tamaño de partícula)	88

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1	Nanopartículas de GSH en relación a la cantidad de TPP, PF-68 y tiempo de agitación.....	65
Diagrama 2	Elaboración de sistemas inyectables.....	66
Diagrama 3	Procedimiento de porcentaje de encapsulamiento	67
Diagrama 4	Procedimiento de porcentaje de hemólisis	68
Diagrama 5	Diagrama de Pareto estandarizado para porcentaje de encapsulamiento	76
Diagrama 6	Diagrama de Pareto estandarizado para porcentaje de hemólisis.....	81
Diagrama 7	Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de partícula	83



INTRODUCCIÓN



Para tratar una patología, el estado de salud del paciente y la vía de administración escogida condicionan la elección del medicamento y su forma galénica. No es nueva la idea de utilizar la vía parenteral para administrar un medicamento en el cuerpo, la cual surgió en el siglo XVII, poco después de que se descubriera la circulación sanguínea.

Así, el primero en utilizar ésta vía con fines terapéuticos fue Christopher Wren que, consiguió la curación de un perro inyectándole una solución de opio en vino de Jerez, dicha práctica se fue extendiendo con la inyección de sustancias muy diversas como leche, cerveza, azúcar o amoníaco. Martínez, R. (2017).

Hoy en día, la industria farmacéutica fabrica casi la totalidad de los medicamentos inyectables. La investigación científica llevada a cabo en los laboratorios desarrolla productos cada vez más innovadores y eficaces. Las nuevas formas galénicas se administran en su mayoría por vía intravenosa, siendo las soluciones el vehículo terapéutico. Siendo éste el caso de los nanomedicamentos. (Hernández, G. 2011).

La importancia de la nanotecnología farmacéutica para la terapia con fármacos reside en la posibilidad de suministrar tanto fármacos de bajo peso molecular, así como macromoléculas como los péptidos, proteínas y genes, de manera localizada o dirigida, hacia un cierto tejido de interés. La nanotecnología farmacéutica se enfoca al desarrollo de formulaciones de agentes terapéuticos en nano-complejos biocompatibles entre los que se cuentan las nanopartículas. (Soutter, W. 2013).



Las funciones biológicas del glutatión involucran su participación como: antioxidante, neuromodulador, detoxificante, por lo que su deficiencia es importante en la fisiopatogenia de las enfermedades anteriormente mencionadas, ya que en diferentes etapas de su desarrollo se encuentra una disminución importante en los niveles cerebrales de este metabolito.

El glutatión se encuentra en concentraciones promedio de 12 mM en células de mamíferos y es el principal antioxidante de origen celular. El único sitio en el que el glutatión se sintetiza en la célula es en el citoplasma celular. Por lo que mantener las cantidades de glutatión suficientes para la homeostasis óxido-reducción en los organismos es muy importante.

El glutatión parenteral tiene potencial terapéutico para el suministro dirigido de equivalentes de cisteína en diferentes casos de intoxicación. Al introducir un principio activo a las nanopartículas se facilita su absorción y biodisponibilidad, con el empleo de las nanoformulaciones, los fármacos mejoran su función terapéutica, reduciendo las dosis necesarias, así como las reacciones adversas. (Martínez, J.2011).

La expansión de las soluciones inyectables va estrechamente unida a la evolución de los medios de administración y los envases. Efectivamente, la llegada de nuevas materias primas transforma las técnicas de administración y conservación de los productos intravenosos. A pesar de su desarrollo tardío, hoy en día los medicamentos inyectables ocupan, en la terapéutica moderna, un lugar predominante. (Martínez, R. 2017).



MARCO TEÓRICO

2.1 Desarrollo farmacéutico



Cuando se pretende introducir un nuevo fármaco, es necesario proceder a su caracterización con el fin de seleccionar la vía de administración más adecuada y la forma farmacéutica idónea para que pueda desarrollar un efecto terapéutico óptimo, la cual pueden indicar la conveniencia de sustituir el fármaco por algún derivado del mismo, de propiedades más favorables para alcanzar la optimización terapéutica indicada.

Aunque las propiedades del fármaco son de naturaleza muy diversa, la mayor parte de ellas se inscriben en las áreas fisicoquímica y biofarmacéutica. Es de especial importancia llevar a cabo una interpretación conjunta de los resultados obtenidos, ya que, existen interdependencias entre ellos, que exigen su integración para su estudio. (Ochoa, D.2016)

2.1.1 Preformulación

El trabajo que abarca el conocimiento de las características básicas tanto biofarmacéuticas como fisicoquímicas que van a influir en la elección y desarrollo de la forma farmacéutica final del medicamento se conoce como estudio de preformulación. (Ando, H 2000)

Las actividades de preformulación van desde la identificación de nuevos agentes activos descubiertos hasta la caracterización de las propiedades físicoquímicas necesarias para el diseño de las formas farmacéuticas. La selección temprana de compuestos con propiedades favorables puede facilitar un progreso rápido de estos compuestos. Aunque sólo unos pocos medicamentos se comercializan en forma inyectable (25%) casi siempre hay que recurrir a la vía intravenosa durante los estudios preliminares de toxicidad, metabolismo, biodisponibilidad y uso clínico para poder valorar con exactitud el fármaco y reparto de la dosis. (Vila, J.2001), (Wells, J.2014).

Cualquier estudio de preformulación debe partir de la recopilación de la información, ya generada, que habitualmente incluye datos relativos a su estructura química, perfil farmacológico y toxicológico, dosis terapéuticas y métodos analíticos. (Ochoa, D.2016). En la tabla 1 se encuentran las características que se evalúan en los estudios de preformulación

Consideraciones previas	Propiedades farmacodinámicas	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Finalidad terapéutica Ⓣ Efectos tóxicos Ⓣ Reacciones adversas Ⓣ Dosis
	Características de la patología	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Aceptación del paciente Ⓣ Comodidad de aplicación Ⓣ Duración y costo de tratamiento
Características biofarmacéuticas	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Biodisponibilidad Ⓣ Vía de administración Ⓣ Propiedades farmacocinéticas Ⓣ Efecto de los excipientes Ⓣ Pautas posológicas 	
Características fisicoquímicas	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Polimorfismo Ⓣ Solubilidad Ⓣ Propiedades reológicas Ⓣ Estabilidad Ⓣ Compatibilidad fármaco-excipiente 	



2.1.2 Formulación

Tras el estudio preliminar de las características fisicoquímicas del principio activo empieza la fase de formulación, es decir los estudios exigidos para que de la combinación entre principio activo y excipientes resulte un producto con las características requeridas, estos estudios involucran el diseño de una forma farmacéutica, empleando todas las herramientas disponibles para llegar al desarrollo de la misma. (Ayala, A.2014)

En lo que se refiere específicamente a la selección de la forma farmacéutica y presentación definitiva del producto que se desea, se basa en los resultados de preformulación.

En general la formulación consiste en:

- Ⓣ Selección de excipientes
- Ⓣ Formulación tentativa
- Ⓣ Evaluación del control de proceso



- Ⓣ Obtención de la fórmula con características deseadas
- Ⓣ Definición de especificaciones
- Ⓣ Repetibilidad del proceso

Como resultado de estudio de formulación se debe obtener:

- Ⓣ Fórmula cuantitativa y cualitativa
- Ⓣ Procedimiento de manufactura
- Ⓣ Especificaciones preliminares del producto terminado
- Ⓣ Controles en proceso terminado (Fernández, K.2011)

2.2 Formas parenterales

2.2.1 Vías de administración parenteral

Las vías de administración parenteral incluyen la intravenosa, la subcutánea, la intramuscular y la intraarterial. De entre ellas, la intravenosa ofrece la ventaja de que el fármaco está disponible de forma global al 100 % se puede utilizar en casos de urgencia y en pacientes inconscientes. La administración de inyectables y otras formas de uso parenteral puede llevarse a efecto a través de sistemas de inyección que permitan atravesar una o más capas de la piel o de las mucosas depositando, posteriormente, el contenido en el lugar de inyección. Ello implica el uso de agujas y, en general, de dispositivos de distintas longitudes y calibres, en función a la zona de administración. (Hernández, G. 2011)

Tabla 2 Características y usos de diferentes vías de administración parenteral (Peris, J.2013)

Vía	Lugar de administración	Características
Intravenosa (iv)	Venas cefálica y basílica (antebrazo), safena (muslo) y yugular (cuello) Administración mediante catéter en aurícula derecha del corazón	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Medicación urgenteⓉ Preparados para perfusiónⓉ Nutrición parenteral
Intramuscular (iv)	Recto anterior del muslo, zona deltoides, dorsoglútea, zona vastolateral y ventroglútea	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Vacunas, fármacos (analgésicos, antiinflamatorios, antibióticos, corticoides)Ⓣ Formas de administración prolongada

Subcutánea (sc)	Tejido subcutáneo de parte superior del brazo, superficie anterior del muslo y porción inferior del abdomen	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Insulinas, heparinas, vacunas
Intradérmica(id)	Dermis de la piel	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Volumen máximo 0,5 mL
Intraarticular	Saco sinovial de una articulación	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Patologías en articulaciones (artritis, séptica, sinovitis)
Intrapleural	Pleura, entre la pleura parietal y la pleura visceral	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Anestésicos locales
Epidural	Espacio peridural de la médula espinal	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Opioides (morfina, hidromorfona, fentanilo)
Intratecal	Líquido cerebroespinal mediante inyección en espacio subaracnoideo de la médula espinal	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Tratamiento meningitis Ⓣ Anestésicos, opiáceos
Intraarterial	Luz de una arteria que irriga un órgano en particular	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Contraste radioopaco Ⓣ Anticancerosos
Intracardiaca	Músculo cardíaco	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Adrenalina
Intraperitoneal	Cavidad peritoneal	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Diálisis peritoneal Ⓣ Detoxificación
Intraósea	Médula ósea por punción del esternón en adultos o de la tibia de los niños	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Acceso vascular de urgencia para administrar fármacos y líquidos
Intravítrea	Cavidad vítrea del ojo	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Antivirales
Intravesical	Vejiga urinaria	<ul style="list-style-type: none"> Ⓣ Anticancerosos

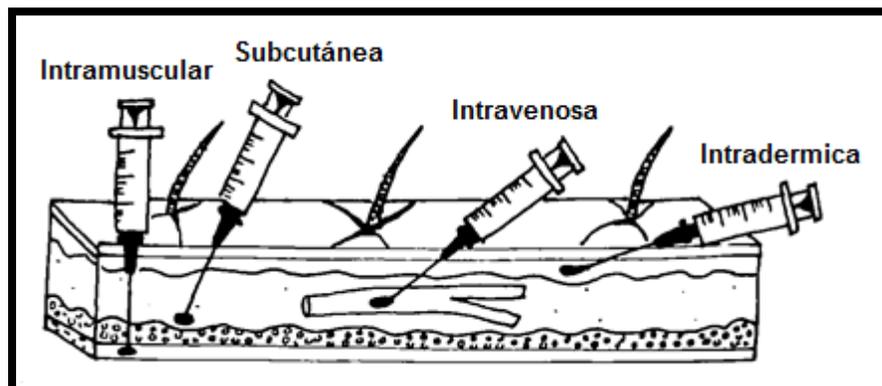
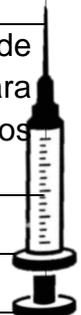


Figura 1 Vías de administración parenteral (Tinoco, A.2020).



2.2.1.1 Sistemas de envasado

Los recipientes para líquidos intravenosos deben ser diseñados para mantener la esterilidad, la transparencia (ausencia de partículas) y la apirogenicidad de la solución desde el momento de la preparación en el almacenamiento durante la administración clínica.

Los líquidos intravenosos en frascos de vidrio se envasan al vacío, el cual debe eliminarse antes de su uso. Para que el líquido salga del frasco de vidrio y fluya a través del equipo de administración es necesario algún mecanismo que permita el ingreso de aire en el recipiente, a excepción de los recipientes de plástico, los cuales no requieren la introducción de aire para funcionar.

Todos los recipientes de vidrio y de plástico son de dosis única y deben ser descartados una vez abiertos, incluso si no se los ha utilizado. Los líquidos intravenosos se envasan con aproximadamente un 3 % de exceso de líquido para permitir la extracción de aire del equipo de administración y el aporte del volumen rotulado en el recipiente. Los recipientes de vidrio tienen bandas de aluminio y plástico para ser colgado, mientras que los recipientes de plástico tienen un ojalillo o tiras de plástico para ser insertados en el equipo de administración. (Turco, S.2003)

2.2.2.2.1 Material de envase

- Ⓣ **Vidrio:** Resistente a la esterilización y de calidad de acuerdo a monografía oficial los cuales no deben tener excesiva alcalinidad

Borosilicato: el más resistente para ampollas o frascos

Sódico cálcico tratado: para inyectables acuosos

Sódico cálcico siliconado (duros): para ampollas o frascos que contendrán líquidos oleosos, alcalinos o polvos

- Ⓣ **Plástico:** Deben ser inertes para no ser atacado por el contenido ni ceder sustancias extrañas, transparente para permitir la inspección visual del contenido, colapsable, de porosidad selectiva, resistente a la temperatura, no alterarse con el tiempo.

En el caso de polietileno debe ser virgen, químicamente puro, sin plastificantes ni estabilizantes. En los últimos tiempos creció el uso del PVC.

2.2.2.2.2 Tipos de envase

- Ⓣ **Ampollas de vidrio:** es el envase más seguro, de los cuales se fabrican hasta con capacidad de 25 ml.
- Ⓣ **Frascos de vidrio de pequeño volumen:** para contener más de una dosis o polvos, con capacidad de volumen de 5- 250 ml. El cierre se logra mediante un tapón que debe asegurar hermeticidad después de cada extracción, no aportar sustancias extrañas, ni adsorber componentes de la formulación.



- Ⓣ **Frascos de vidrio de gran volumen:** frascos Baxter de hasta 1000 ml.
- Ⓣ **Bolsas plásticas:** transparencia según el material, permeable a gases y vapores, contienen sustancias extrañas, son livianos, fáciles de manejar, flexibles.
- Ⓣ **Cartuchos:** se emplean en odontología dentro de un portacartucho para anestesia local.
- Ⓣ **Jeringas pre-llenas:** se combinan más de un material en contacto con el medicamento. (López, C. 2016) (Turco, S.2003)

2.2.2 Ventajas y desventajas de las soluciones parenterales

Las ventajas que aporta la vía parenteral la hacen especialmente indicada para la administración de fármacos en las siguientes situaciones:

- Ⓣ Cuando el fármaco no se absorbe por vía oral, se absorbe muy lentamente o de forma irregular
- Ⓣ Cuando el fármaco sufre importantes pérdidas sistémicas que reducen considerablemente su biodisponibilidad por vía oral
- Ⓣ Cuando se quiere evitar la destrucción o la inactivación de los principios activos por las enzimas o por las condiciones de pH del contenido gastrointestinal o de otras mucosas del organismo.
- Ⓣ Cuando el estado del paciente dificulta su administración por vía oral
- Ⓣ Cuando es necesario un efecto inmediato o, incluso, instantáneo en situaciones de emergencia.
- Ⓣ Cuando es necesaria una administración localizada del fármaco
- Ⓣ Cuando se quiere asegurar una absorción íntegra de la dosis administrada.
- Ⓣ Cuando es necesario obtener rápidamente niveles plasmáticos predeterminados y constantes del fármaco durante periodos de tiempo más o menos prolongados.

Aparte de las ventajas que aporta la vía parenteral sobre otras vías de administración, su empleo no está exento de ciertos inconvenientes, como son:

- Ⓣ La administración es, con frecuencia, dolorosa a pesar de la utilización de anestésicos locales,
- Ⓣ Riesgo potencial de infección como consecuencia del franqueo de la barrera defensiva que constituye la piel íntacta
- Ⓣ Riesgo de provocar lesiones como consecuencia de la administración deficiente, así como aparición de irritaciones o sensibilización en el lugar de inyección.
- Ⓣ Los preparados farmacéuticos destinados a su administración por vía parenteral deben cumplir con numerosas exigencias tecnológicas: isotonicidad, pH, apirogenicidad, esterilidad, contenido en partículas sólidas.
- Ⓣ Se precisa de material adicional para efectuar la administración para efectuar la administración (jeringas, agujas, bombas de infusión, desinfectantes...) y la participación de personal especializado, lo que encarece el tratamiento.



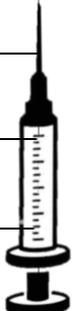
- Ⓣ Precio, en general, más elevado que el de las formas farmacéuticas destinadas a otras vías de administración. (Doménech, J. 2013) (Martínez, R. 2017)

2.2.3 Métodos de elaboración

Para cada una de las formas parenterales, y de acuerdo con la nomenclatura de la farmacopea, se definen las preparaciones en las cuales quedan englobadas las distintas formas farmacéuticas.

Las formas de administración parenteral pueden clasificarse en función de su estado físico, del método de elaboración o del tipo de perfil de liberación del fármaco los cuales se muestran en la tabla 3. De acuerdo al tipo de preparación, tal como se establece en la farmacopea, se pueden diferenciar entre preparaciones inyectables y para perfusión, concentrados, polvos, geles inyectables, implantes. (Garreta, J.2016)

Forma parenteral	Elaboración parenteral (según farmacopea)
Soluciones	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Preparaciones inyectablesⓉ Preparaciones para perfusiónⓉ Concentrados para preparaciones inyectables o para perfusión
Emulsiones	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Preparaciones inyectablesⓉ Preparaciones para perfusión
Polvos	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Polvos para preparaciones inyectables o para perfusión
Suspensiones	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Preparaciones inyectables
Geles	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Geles inyectables
Implantes	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Implantes
Micropartículas	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Polvos para preparaciones inyectables o para perfusión
Conjugados poliméricos	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Preparaciones inyectablesⓉ Polvos para preparaciones inyectables o para perfusión
Liposomas	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Polvos para preparaciones inyectables o para perfusión
Nanopartículas	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Preparaciones inyectablesⓉ Polvos para preparaciones inyectables o para perfusión
Micelas poliméricas	<ul style="list-style-type: none">Ⓣ Polvos para preparaciones inyectables o para perfusión





2.2.3.1 Soluciones inyectables

Las soluciones inyectables son preparaciones estériles en las que el principio activo se encuentra disuelto en agua, en un líquido no acuoso adecuado o en una mezcla de ambos tipos de vehículos; y, en general, son de pequeño volumen. También se incluyen en este grupo las preparaciones líquidas acuosas de gran volumen para administración parenteral como los fluidos intravenosos, las soluciones para irrigación, las soluciones para diálisis y las soluciones cardioplégicas.

Las formas parenterales en solución son las formulaciones más sencillas de preparar, puesto que no encierran partículas. Por ello se usan los métodos de disolución clásicos. Los principios activos y las sustancias auxiliares necesarias se disuelven en agua ppi, en alguno de los vehículos alternativos, o en la mezcla de disolventes elegida. Una vez preparada, la solución se filtra a través de filtros membrana o utilizando sistemas de filtración constituidos por un primer filtro en profundidad y un segundo de membrana (tamaño de poro de 5-8 μm).

Tras la filtración, la solución se transfiere rápidamente a sus envases definitivos. El producto se esteriliza entonces preferentemente en autoclave y se seleccionan determinadas muestras para realizar los controles pertinentes. Cuando la formulación no se puede esterilizar por calor (debido, a que el principio activo es termolábil) la solución, se filtrará por filtros esterilizantes (tamaño de poro 0,22 μm) (Garreta, J. 2016).

2.2.3.2 Emulsiones inyectables

Las preparaciones de tipo emulsión de administración parenteral son poco frecuentes; y son, mayoritariamente, emulsiones de fase continua (emulsión O/A) utilizadas como preparaciones para perfusión en nutrición parenteral. Para su administración, las emulsiones deben presentar una estabilidad adecuada. En casos muy concretos se utilizan emulsiones de fase externa oleosa, destinadas principalmente al diagnóstico de alergias e inmunoterapia.

Deben cumplir los requerimientos de toda preparación parenteral, así como presentar un tamaño de glóbulo inferior a 5 μm con el fin de evitar los riesgos de embolia pulmonar. No obstante, lo habitual es que las emulsiones parenterales utilizadas en clínica presenten tamaños de glóbulo entre 100 y 500 nm.

El procedimiento más común para este tipo de emulsiones parenterales consiste en varias etapas de calentamiento y mezclado seguidas de una etapa de homogeneización para reducir el tamaño de glóbulo de la emulsión y, finalmente, una etapa de filtración y esterilización.

Para ello, se prepara en caliente (70 °C), y por separado, la fase oleosa y la fase acuosa en agua ppi que puede contener también un tensoactivo y, eventualmente, un conservante antimicrobiano. Se mezclan las dos fases en caliente mediante agitador mecánico de alta velocidad. Posteriormente, a la mezcla en caliente (denominada preemulsión) se añade bajo agitación el agente isotonzante y el resto de los excipientes si los hubiera. La preemulsión



resultante, se enfría a 20 °C y, se somete a la acción de homogeneizadores de lata presión o de microfluidizadores con el fin de obtener una emulsión fina y monodispersa. Tras ajustar el pH, la emulsión se filtra a través de membranas para retirar las partículas de tamaño excesivo. Finalmente, la emulsión parenteral se acondiciona y, si es posible en autoclave. (Garreta, J.2016) (Álvarez,A.2016)

2.2.3.3 Concentrados y polvos para inyección o perfusión

En este grupo se incluyen las preparaciones que se presentan como disoluciones concentradas de fármacos (disoluciones estériles que deben ser diluidas previamente a su administración hasta alcanzar un determinado volumen). La dilución se lleva a cabo con agua o, más frecuentemente, con disoluciones isotónicas estériles que se administran por perfusión.

De este grupo forman parte los polvos estériles que deben ser reconstituidos por adición de un vehículo acuoso estéril, para originar una disolución inyectable. En casos muy concretos, estos productos se formulan para generar suspensiones parenterales.

Para su fabricación, se prepara la disolución de principio activo en un medio acuoso que contenga los excipientes adecuados. Una vez preparada la solución medicamentosa, es recomendable proceder a una filtración esterilizante previa a su distribución en los recipientes definitivos y posterior a su método de obtención de polvos.

Los polvos de administración parenteral también pueden obtenerse por liofilización, cristalización estéril y mediante secado por atomización.

T Liofilización

La liofilización permite obtener materiales con estructura de “panal de miel” o “enrejada”, que es muy porosa y fácilmente embebida por el disolvente, permitiendo la rápida reconstitución de la disolución, tras la adición de un vehículo estéril adecuado. Por el contrario, los mayores inconvenientes de la técnica derivan del pequeño número de disolventes que pueden utilizarse, su elevado costo y la larga duración del proceso.

T Cristalización estéril

El principio activo se disuelve en el disolvente adecuado, verificando la solubilidad del principio activo y posteriormente se esteriliza por filtración, se añade una solución estéril de un no solvente provocando la cristalización del principio activo. (Garreta, J.2016)

Existen disolventes que son de uso más frecuente para cristalización como: agua, metanol, etanol, acetato de etilo, tolueno y hexano. El disolvente ideal para cristalizar es aquel que cumple diversos requisitos como:

- T** Disolver el principio activo en caliente (a la temperatura de ebullición del disolvente)
- T** No debe reaccionar con el compuesto a cristalizar



- Ⓣ Debe ser relativamente volátil con el fin de que los cristales obtenidos puedan secarse con facilidad
- Ⓣ No debe ser tóxico

El disolvente disolverá mejor aquellos compuestos que presenten una estructura similar a la del principio activo. Para la elección de un disolvente de cristalización se pueden consultar las indicaciones del fabricante o consultar la bibliografía especializada. (Guaymas, O.2020)

Los cristales se recogen sobre un filtro de tipo Büchner y se secan antes de dosificarlos en su envase definitivo. A menudo, es necesario pulverizar los cristales obtenidos para disminuir su granulometría. Los inconvenientes más importantes de esta técnica están en la tendencia a la heterogeneidad entre lotes y las numerosas oportunidades de contaminación del material, aunque cabe destacar la flexibilidad de la técnica y el bajo coste. Los polvos obtenidos se acondicionan en viales mediante pesada. (Garreta, J.2016)

Ⓣ Secado por atomización

Consiste en atomizar la solución una corriente de aire o gas estéril a alta temperatura. El disolvente se evapora rápidamente en contacto con el gas, permitiendo así la recuperación del principio activo en forma de polvo constituido por partículas esféricas, uniformes y porosas, obteniendo así lotes muy homogéneos. Como inconveniente se puede destacar el número reducido de disolventes que es posible utilizar. Al igual que en cristalización estéril los polvos se acondicionan en viales mediante pesada.

El acondicionamiento secundario de los polvos para preparaciones inyectables incluye, en general, un segundo envase o dispositivo con el volumen del líquido estéril y apirógeno en el cual el producto sólido debe mezclarse para dar lugar a la disolución o suspensión uniforme para ser administrada. Este líquido puede contener únicamente el vehículo o bien el disolvente con la totalidad o una parte de los excipientes. (Garreta, J.2016)

2.2.3.4 Suspensiones inyectables

Las suspensiones parenterales son sistemas heterogéneos en los que las partículas sólidas del principio activo están dispersas en un vehículo acuoso o de naturaleza oleosa. Son preparaciones inyectables de pequeño volumen y están destinadas, principalmente, a ser administradas por vía intramuscular o vía subcutánea. El principio activo suele incorporarse en proporciones comprendidas entre 0.5% y 5% p/v y, en ningún caso, ha de ser soluble en el vehículo, evitando así crecimiento cristalino.

El tamaño de partícula debe ser inferior a los 5 μm , con el fin de facilitar la administración, evitando la obturación de la aguja. El objetivo principal de las soluciones parenterales es la obtención de preparados con un efecto prolongado del fármaco.

A la hora de formular suspensiones uno de los problemas más frecuentes es dispersar adecuadamente las partículas sólidas individualizadas de fármaco. Para ello se utilizan



agentes humectantes que reducen el ángulo de contacto entre la superficie de la partícula y el líquido para obtener una máxima eficiencia de humectabilidad y evitar, cuando las partículas son poco densas, que floten. (Garreta, J.2016), (Álvarez, A.2016).

2.2.3.4.1 Aspectos críticos en la formulación de las suspensiones

Las suspensiones farmacéuticas son sistemas dispersos heterogéneos y, por lo tanto, termodinámicamente inestables. Para garantizar que las suspensiones mantienen sus propiedades, en su formulación se debe conseguir que tenga lugar una sedimentación lenta de las partículas de la fase interna o bien la formación de un sedimento que se redisperse fácilmente mediante agitación suave, aspectos que garantizan la obtención de un sistema lo suficientemente homogéneo para su correcta dosificación. Además, se debe evitar un crecimiento cristalino durante el almacenamiento. Para ello, en el proceso de preparación de cualquier suspensión deben tenerse muy presentes los efectos de algunos factores como:

T Tamaño de partícula

Este parámetro condiciona propiedades como la textura de las suspensiones o su estabilidad física, pero también incide sobre su posterior aplicación. En formulaciones parenterales, las partículas deben tener un tamaño que evite el bloqueo de las agujas hipodérmicas, así como una forma próxima a la esférica. El tamaño de partícula también condiciona la velocidad de sedimentación. Así, se debe seleccionar un intervalo de tamaños de partícula determinado con el fin de controlar la velocidad de disolución del fármaco y cuando este proceso sea la etapa limitante de la absorción, su biodisponibilidad. Asimismo, el tamaño de partícula condiciona el crecimiento cristalino.

Aunque el tamaño de las partículas pueda ser suficientemente reducido en el momento de la preparación de la suspensión, este puede sufrir cierto crecimiento durante el almacenamiento.

T Humectación

Para obtener una suspensión es indispensable que el líquido desplace el aire en contacto con el sólido. Si esto no ocurre, no podría producirse la dispersión de la fase interna de la suspensión. Algunos sólidos insolubles en agua son fácilmente humectables, lo que indica la existencia de cierta afinidad entre ambos. En estos casos, es relativamente fácil formar un film acuoso a lo largo de la superficie del sólido y dispersar las partículas con una mínima agitación. Sin embargo, a medida que el sólido es más hidrófobo, su afinidad por el agua disminuye y se dificulta progresivamente el desplazamiento del aire por el líquido. En estos casos, las partículas de sólido tienden a flotar en superficie, a adherirse a la porción superior del recipiente o a aglomerarse entre ellas y al agitar se formará espuma (burbujas de aire estabilizadas por el sólido en suspensión). Para ello pueden utilizarse agentes humectantes como tensoactivos, coloides hidrófilos o disolventes.

T Sistemas floculados o defloculados



Se debe determinar el sistema más adecuado para la suspensión:

Defloculado

La fase interna inicialmente se mantiene en forma de pequeñas partículas separadas de forma individual que sedimentan muy lentamente, a velocidad dependiente de su tamaño. Los sistemas se caracterizan por una sedimentación lenta, pero esta lentitud evita que quede líquido atrapado en el sedimento, de forma que las partículas se van deslizando unas sobre otras. Con el tiempo, las fuerzas eléctricas hacen que las partículas se agreguen en forma de sedimentos aglomerados muy compactos (fenómeno conocido como caking) muy difíciles de redispersar.

Floculado

La sedimentación es más rápida y se forma un sedimento muy voluminoso con líquido interpuesto, muy poroso y fácilmente redispersable. Las partículas dan lugar a la formación de sedimentos floculados y porosos, permaneciendo en este estado metaestable durante largos periodos de tiempo.

Desde el punto de vista farmacéutico, los sistemas defloculados tienen la ventaja de presentar una velocidad de sedimentación lenta, lo que facilita una correcta dosificación, pero, cuando se forma el sedimento, es compacto y difícilmente redispersable. Por el contrario, los sistemas floculados forman sedimentos ligeros y fácilmente redispersables, pero como la sedimentación es rápida, existe riesgo de una dosificación incorrecta. Para mitigar este problema pueden incorporarse a la suspensión agentes viscosizantes, capaces de prevenir la sedimentación el tiempo necesario para garantizar su dosificación. (Álvarez, A.2016) ,(Billany, M.2016).

2.2.3.4.2 Excipientes empleados en la preparación de las suspensiones

Ⓣ Conservadores

Son compuestos químicos que evitan el crecimiento de microorganismos, evita procesos de oxidación y cambios físicos durante la fabricación, almacenaje hasta su consumo, pueden ser utilizados en mezcla para tener mayor efectividad.

El conservante debe permanecer estable en condiciones extremas de pH y temperatura, que no produzca ninguna reacción, una estructura química conocida, debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana, ser compatible con los excipientes de la formulación y se pueden clasificar en:

- Ⓣ Fenoles y derivados
- Ⓣ Alcoholes alifáticos y aromáticos
- Ⓣ Compuestos orgánicos de mercurio
- Ⓣ Compuestos de amonio cuaternario
- Ⓣ Ácidos carboxílicos(Herrera, J.2017)



T Agentes Tensoactivos

Que actúan reduciendo la tensión interfacial sólido-líquido al difundir y concentrarse en la interfase. El tipo de agente tensoactivo utilizado depende de la vía de administración a la que se destina la suspensión (Álvarez, A.2016), ya que actúan en la superficie de contacto entre dos fases, pueden humedecer, dispersar y solubilizar e incluso emulsificar manteniendo estabilidad en la suspensión. Se clasifican en:

Aniónicos: Poseen carga negativa en una solución acuosa

Catiónicos: Poseen carga positiva en una solución acuosa

No iónicos: No poseen carga en una solución acuosa

Anfóteros: Se pueden comportar como aniónicos o catiónicos dependiendo del pH. (Herrera, J.2017)

T Coloides protectores

Son sustancias hidrófilas, de naturaleza polimérica, que actúan formando una película de polímero hidratado sobre la partícula, mejorando la afinidad por la fase externa y evitando el crecimiento cristalino. Forman capas multimoleculares en torno a la superficie hidrofóbica del sólido y aumentan ligeramente la viscosidad éstos pueden ser:

Polímeros

Sólidos insolubles hidrófilos (Herrera, J.2017)

T Agentes floculantes

Son electrolitos que, incorporados al medio, reducen el potencial electrocinético al provocar una contracción de la doble capa eléctrica, cuyo espesor depende de su concentración en el medio. Si el valor absoluto de la potencial zeta es muy alto, el sistema deflocua debido al incremento de la repulsión y la dispersión sedimenta. (Álvarez, A.2016)

T Agentes viscosizantes

Aumentan la viscosidad del medio y reducen la velocidad de sedimentación durante el almacenamiento de la dispersión, retrasando la formación de sedimentos. Como agentes viscosizantes se pueden utilizar polímeros hidrófilos de origen natural o sintético, destacando aquellos agentes viscosizantes que son pseudoplásticos y tienen propiedades tixotrópicas, que permiten aumentar la viscosidad en reposo y facilitan la manipulación de la suspensión. (Álvarez, A.2016)

2.2.3.4.3 Métodos de preparación

En función de los excipientes utilizados se pueden distinguir los siguientes métodos de preparación:



T Método de reología combinada

El objetivo es lograr suspensiones defloculadas en un vehículo estructurado y reducir la velocidad de sedimentación de las partículas dispersas utilizando viscosantes.

T Método de floculación

Se basa en la utilización de agentes floculantes que inducen la formación de agregados porosos que sedimentan rápidamente sin formar precipitados compactos, difíciles de redispersar una vez formados. Los agentes floculantes más utilizados son electrolitos, tensoactivos y coloides hidrofílicos. Los electrolitos actúan por reducción de las fuerzas eléctricas de repulsión de las partículas facilitando la formación de agregados porosos; mientras que los coloides, generalmente cargados negativamente, no solo afectan a la fuerza repulsiva de las partículas, sino que dan lugar a una barrera mecánica que impide la agregación irreversible de las partículas del fármaco.

T Método mixto

Es el resultado de la combinación de los dos procedimientos de preparación anteriores, utilizando agentes viscosantes y agentes floculantes, lo que permite obtener suspensiones floculadas en un vehículo estructurado. En las suspensiones preparadas por este método se alcanza un equilibrio entre la velocidad de formación de sedimento y la velocidad de redispersabilidad de este. (Garreta, J.2016)

2.2.3.5 Geles inyectables

Son geles estériles que tienen una viscosidad previamente medida que garantiza una liberación prolongada del principio activo en el lugar de inyección. Se presentan como una forma líquida (normalmente, una solución de fármaco) administrable mediante inyección con jeringa y aguja tradicionales. Tras la administración y el contacto con el agua del fluido intersticial acuoso de la zona de inyección, el líquido administrado gelifica dando lugar a la liberación prolongada.

La formulación y preparación es similar a los procedimientos descritos en las formas parenterales en solución, la única diferencia consiste en la adición y disolución en la mezcla medicamentosa del agente gelificante a la concentración.

En el control de calidad de estas formas farmacéuticas será necesario determinar el hinchamiento, difusividad y viscosidad del hidrogel resultante en las condiciones fisiológicas de pH y temperatura. (Garreta, J.2016) (Álvarez, C.2016)

2.2.3.6 Implantes

Los implantes son formas sólidas, macroscópicas y estériles, destinadas a su colocación en el tejido subcutáneo o en alguna cavidad del cuerpo mediante cirugía menor o utilizando algún sistema de inyección particular.



En general, actúan como sistemas matriciales que liberan de forma continua el principio activo durante periodos prolongados de tiempo, normalmente varios meses. En su preparación se deben utilizar excipientes atóxicos y completamente biodegradables, que permita la disolución

Los procedimientos para la fabricación de implantes se basan en técnicas de moldeo o extrusión, las cuales implican la mezcla del fármaco con el polímero, previamente disuelto en un disolvente orgánico o calentado para dotarlo de cierta fluidez. Posteriormente, el conjunto se añade a un molde de teflón o se le fuerza a pasar a través de orificios en un extrusor. En el caso de utilizar moldes, y tras la evaporación de los disolventes utilizados, los implantes suelen adoptar una forma laminar. Los implantes obtenidos por extrusión, suelen tener forma cilíndrica. (Garreta, J.2016)

2.2.3.7 Nanopartículas

Las nanopartículas poliméricas son sistemas submicrométricos que se preparan a partir de polímeros naturales o sintéticos. De acuerdo a su estructura, las nanopartículas se subdividen en nanoesféras y nanocápsulas.

Nanoesféras: Son de tipo matricial y, en este caso, los fármacos pueden ser absorbidos en la superficie de la esfera o encapsulados dentro de la partícula.

Nanocápsulas: Son sistemas vesiculares en los que el principio activo es vehiculizado en la cavidad interior; el sistema consiste en un núcleo líquido rodeado por una membrana polimérica.

2.2.3.8 Micelas poliméricas

Son nanoestructuras, de tamaño comprendido entre 10 y 100 nm originadas a partir del autoensamblaje de moléculas anfifílicas. En medio acuoso, las micelas presentan una estructura de tipo reservorio, con núcleo hidrofóbico (en el que se deposita el fármaco) y una superficie hidrofílica.

2.2.3.9 Liposomas

Son estructuras vesiculares altamente organizadas constituidas por lamelas o bicapas lipídicas concéntricas que encierran un interior acuoso. En función de su tamaño y del número de bicapas o lamelas que conforman la pared del liposoma se distinguen los siguientes tipos:

- **Liposomas unilaminares pequeños:** Única bicapa y tamaño comprendido entre 40 y 100 nm.
- **Liposomas unilaminares grandes:** Única bicapa y tamaño de hasta 500 nm.
- **Liposomas multilaminares:** varias bicapas y su tamaño es superior a 500 nm.

La fabricación de las nanoestructuras depende de las propiedades físicas y químicas de principio activo/polímero, así como de las características finales de las nanoestructuras que

se desea obtener. Estas se preparan principalmente por alguna de las siguientes técnicas: evaporación del disolvente, coacervación, fusión en caliente, gelificación iónica y secado por atomización. En todos los casos, deben prepararse en condiciones asépticas a partir de materias primas estériles. (Garreta, J.2016) ,(López, C.2016).

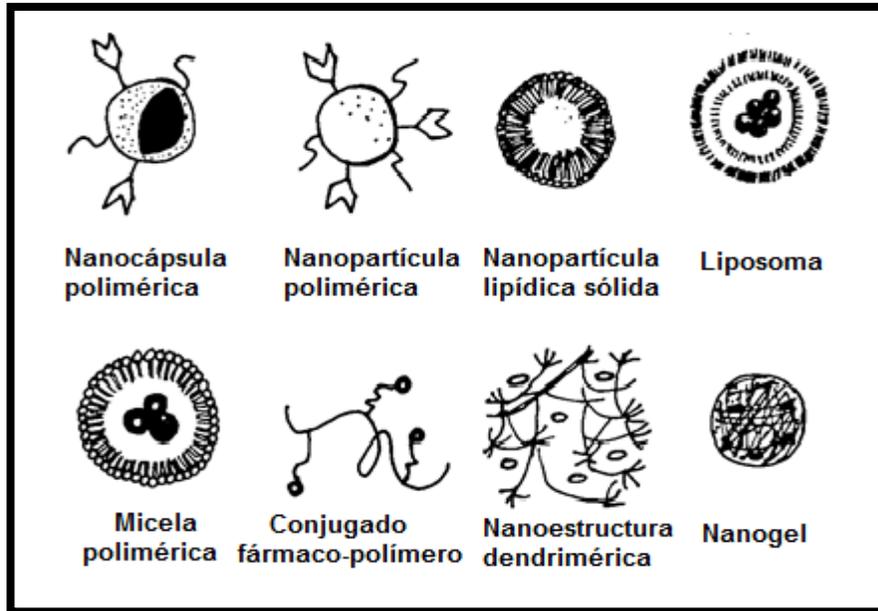


Figura 2 Nanosistemas de liberación de fármacos (Tinoco, A.2020).

2.2.4 Características de calidad de soluciones parenterales

Puesto que son preparados que se administran a través de la piel y las mucosas, deben poseer unos requerimientos que los haga tolerables por el organismo.

2.2.4.1 Limpidez

Se refiere a la ausencia de partículas en suspensión detectables ópticamente, sólo aplicable a disoluciones. (Hernández, G. 2011). Para evitar presencia de partículas, todas las disoluciones parenterales deben someterse a filtración. Las disoluciones inyectables o para perfusión, examinadas en condiciones apropiadas de visibilidad, deben ser límpidas y estar prácticamente exentas de partículas. Este tipo de contaminación se atribuye a la presencia de partículas extrañas, móviles y no disueltas (distintas de las burbujas de gas) e introducidas involuntariamente en las disoluciones durante su preparación y dosificación. Es importante tener en cuenta que las partículas pueden producir trombos, granulomas en pulmón, incluso, lesión en las paredes de los vasos sanguíneos.

Es necesario reconocer que determinar la limpidez es un problema complejo, ya que la cuantificación de la "ausencia de partículas" depende del sistema utilizado para la detección de las mismas. Dado que el número de partículas detectadas en una solución aumenta con el perfeccionamiento del método de examen, teóricamente ningún control puede ser

definitivo. En la actualidad la Real Farmacopea Española (RFE) distingue entre contaminación por partículas visibles y por partículas subvisibles. (Martínez, R. 2017)

2.2.4.1.1 Partículas visibles

Se lleva a cabo un examen visual de los envases fabricados, el cual comprende el aspecto de la preparación (coloración) y la limpidez. De forma manual se suelen utilizar aparatos con una fuente de luz sobre un vidrio opaco que ilumina lateralmente el recipiente que se va a controlar (polaroscopio). El límite de tamaño de partículas que pueden ser detectadas por ese método óptico es del orden de 100 μm .

2.2.4.1.2 Partículas subvisibles

La farmacopea especifica dos procedimientos para la determinación de partículas en inyectables, uno de dispersión de luz y otro microscópico.

El primero se basa en el recuento de partículas por dispersión de la luz, utilizándose aparatos basados en el principio de intercepción de la luz, que permiten una determinación automática del tamaño de partículas, así como la distribución de tamaños. Si el producto no es una solución, con transparencia y viscosidad similar a la del agua, pueden obtenerse datos erróneos al ser analizado por el método de recuento por bloqueo de luz.

El segundo procedimiento, que tiene carácter destructivo, consiste en filtrar el contenido seleccionado y observar el filtro al microscopio para determinar el tamaño, el número y la procedencia de las eventuales partículas. En ambos casos, la farmacopea establece el número máximo de partículas entre 10 y 25 μm que se considera aceptable. La tabla 2 muestra el número límite de partículas aceptables en diferentes tipos de preparaciones. (Garreta, J.2016)

Recuento de partículas subvisibles	Tamaño (μm)	Partículas
Preparaciones contenido nominal > 100 mL	≥ 10	25 por mL
	≥ 25	3 por mL
Preparaciones contenido nominal \leq 100 mL	≥ 10	6000 por envase
	≥ 25	6000 por envase
Recuento de partículas al microscopio		
Preparaciones contenido nominal > 100 mL	≥ 10	12 por mL
	≥ 25	2 por mL
Preparaciones contenido nominal < 100 mL	≥ 10	3000 por envase
	≥ 25	3000 por envase

La farmacopea considera que, en el caso de preparaciones para uso humano, las disoluciones para perfusión o las disoluciones inyectables han de cumplir el ensayo; aunque pueden aceptarse límites superiores a los indicados en preparaciones para inyección



subcutánea o intramuscular. En algunos casos, la viscosidad de un material puede ser tan elevada que imposibilite su análisis por los métodos descritos. En dicho caso, puede realizarse una dilución cuantitativa con un diluyente apropiado para disminuir la viscosidad tanto como sea necesario, permitiendo de esta manera la realización del análisis.

2.2.4.2 Neutralidad

El pH es un factor importante para tener en cuenta en la formulación de formas acuosas de administración parenteral, puesto que puede acondicionar no solo la tolerancia de la preparación por el organismo, sino también su estabilidad y la actividad el principio activo.

Puesto que los pH de los líquidos del organismo como la sangre, la linfa y el líquido cefalorraquídeo se encuentran entre 7.3 y 7.4, es deseable respetar esta neutralidad. (Hernández, G. 2011). Aunque la sangre y otros fluidos fisiológicos disponen de un poder regulador importante que les permite tolerar la inyección de preparados con pH comprendidos entre 4 y 10, la administración de soluciones con valores de pH alejados del fisiológico puede producir dolor, así como inflamaciones y lesiones en tejidos y endotelios.

Por otra parte, el pH puede afectar decisivamente a la estabilidad de la forma de dosificación y a la actividad del principio activo, condicionando su conservación y periodo de validez. En la actualidad, hay un número importante de moléculas activas que no son estables o presentan una menor actividad en condición de pH próximas a la neutralidad. En esta situación se hace necesario llegar a un compromiso, eligiendo un pH no mal tolerado por el organismo, que asegure una estabilidad o actividad aceptables del principio activo. (Martínez, R. 2017).

El ajuste de pH de una solución para uso parenteral puede llevarse a cabo mediante la adición de un ácido o una base, de aminoácidos o mediante el empleo de soluciones reguladoras. Cuando por razones de estabilidad del fármaco se requiere ajustar el pH de la solución fuera del intervalo de fisiológico de pH, se prefiere utilizar ácidos o bases diluidos, especialmente si el volumen que se va a administra es grande o si el inyectable está destinado a una vía parenteral indirecta para formar un depósito o un reservorio en el lugar de administración.

Para controlar el pH de las soluciones inyectables se suelen utilizar métodos clásicos como el potenciómetro o la utilización de indicadores coloreados.

2.2.4.2.1 Potenciómetro

El cual consiste en dos electrodos, uno de los cuales tiene una membrana sensible a $[H_3O^+]$. Estos electrodos miden $[H_3O^+]$ como una diferencia de potencial eléctrico entre ellos. Esta diferencia es indicada como valores de pH en una pantalla o a escala que posee el potenciómetro. El aparato debe calibrarse antes de usarlo, con soluciones de pH conocido, este instrumento proporciona valores muy precisos.



2.2.4.2.2 Papel indicador de pH

El papel indicador de pH está impregnado con una mezcla de sustancias llamadas indicadores, cuyo valor varía con los cambios de pH, comparando el color adquirido por el papel con los colores que se muestran en su respectiva tabla. (Mendoza, L. 2006).

2.2.4.3 Isotonicidad

Las preparaciones parenterales, siempre que sea posible, deben poseer una presión osmótica similar a la de los líquidos con los que entran en contacto, para evitar fenómenos como la hemólisis o la plasmólisis. Cuando se pone en contacto una disolución de cloruro sódico (NaCl) al 0.9 % p/v con eritrocitos, no se producen modificaciones aparentes en las células sanguíneas. Esto se debe a que la presión osmótica de la solución de cloruro sódico y la del fluido interior de las células es similar. Este tipo de disolución, que presenta igual presión osmótica que la fisiológica, se conoce como solución isoosmótica o, de forma más general, isotónica.

Al entrar en contacto los eritrocitos con una solución acuosa de NaCl inferior al 0.9 % p/v da lugar a un fenómeno de turgencia o de hinchamiento de las células, debido a un proceso de difusión de agua desde el exterior hacia el interior, con riesgo de producir hemólisis. Si, por el contrario, se ponen en contacto los hematíes con la disolución de cloruro sódico a concentración superior al 0.9 % p/v, se produce un fenómeno de crenación debido a la salida de líquido celular del interior al medio exterior, dando lugar a la plasmólisis.

Un preparado parenteral que contiene la cantidad de solutos calculada para que sea isoosmótica con la sangre solo será isotónica cuando las células sanguíneas sean impermeables a los solutos y permeables al disolvente. La administración de disoluciones no isotónicas suele ser dolorosa y puede afectar a la concentración de fármaco y, por tanto, condicionar su eficacia y seguridad. (Garreta, J.2016)

2.2.4.3.1 Isotonización de formas parenterales

En general, para determinar la tonicidad de las disoluciones inyectables se acude a la aplicación de alguno de los cuatro métodos siguientes: determinación de la concentración molar, descenso crioscópico, equivalente isotónico en cloruro de sodio y dilución, que se explican a continuación.

Ⓢ Determinación de la concentración molar

El descenso crioscópico del plasma es de 0.52°C y una disolución acuosa, que contenga un osmol por kilo, presentará un descenso crioscópico de 1.86°C. en consecuencia, la osmolalidad el plasma será:

$$m = (0.52/1.86) = 0.281 \text{ osmol/kg disolvente}$$

Por lo tanto, la concentración osmolar de la sangre será de 0,28 osmoles/L o de 0,028 osmoles/100 mL. En el caso de que la osmolaridad de la preparación sea inferior a ese valor



deberán añadirse los osmoles necesarios de un agente isotonzante, generalmente cloruro sódico o glucosa, para obtener una formulación isoosmótica con la sangre o el plasma. (Martínez, R. 2017).

T Descenso crioscópico

El descenso crioscópico o depresión del punto de fusión es una propiedad coligativa. El efecto se produce cuando una solución experimenta una disminución del punto de congelación respecto a la del disolvente puro; es decir, dicho efecto es el resultado de la adición de un soluto a un solvente de interés, es necesario aclarar que el fenómeno depende de la cantidad del soluto y la naturaleza del solvente. (Xiomara, E. 2014). Esta propiedad se utiliza a menudo para verificar la pureza de un producto sólido que se ha sintetizado en el laboratorio. El descenso crioscópico de una solución diluida depende de la concentración del soluto y del tipo de solvente utilizado. (Osorio, R.2009)

T Equivalente isotónico en cloruro de sodio

Se basa en considerar una disolución de cloruro sódico al 0.9% p/v en agua como solución isotónica patrón. Se define el equivalente en cloruro sódico como el peso de esta sal que equivale a un gramo de la sustancia considerada en cuanto a su comportamiento crioscópico.

T Dilución

Consiste en calcular la cantidad de agua en la que hay que disolver la sustancia en cuestión para obtener una solución isoosmótica. Esta disolución se completa con solución isotónica, del producto isotonzante que se desee, hasta el volumen final correspondiente. (Garreta, J.2016)

2.2.4.3.2 Control de Isotonicidad

Los ensayos para controlar la Isotonía de los preparados inyectables se llevan a cabo poniendo en contacto las disoluciones con eritrocitos humanos, estos pueden ser: método hemolítico y método del hematocrito.

T Método hemolítico

Se evalúa si el preparado parenteral es o no compatible con la sangre. Para ello se mezcla el preparado con sangre humana defibrinada. Tras un periodo de contacto suficiente la mezcla se centrifuga y se mide en un colorímetro el color del sobrenadante. La coloración es proporcional al grado de hemólisis producido. Como patrones se utiliza una serie obtenida a partir de la misma sangre mezclada con soluciones acuosas de cloruro sódico de concentraciones comprendidas entre 0.32% p/v y 0.52% p/v.



T Método del hematocrito

Consiste en determinar el volumen globular de los eritrocitos en condiciones prefijadas. En este caso, tras la incubación de los glóbulos rojos con la solución inyectable, se mide el volumen ocupado por los hematíes. Si este volumen aumenta respecto del de un control, la solución preparada es hipotónica. Si el volumen disminuye, la solución es hipertónica. (Garreta, J.2016)

2.2.4.4 Esterilidad

Todos los preparados parenterales deben elaborarse con productos y mediante procedimientos que permiten asegurar su esterilidad e impidan el crecimiento de microorganismos. Siempre que sea posible, los preparados parenterales se esterilizaran en su envase definitivo. Cuando no sea posible, el preparado deberá elaborarse en condiciones que eviten toda contaminación, empleando productos y materias primas previamente esterilizadas y trabajando en un ambiente controlado. Esto se denomina manipulación aséptica o preparación en zona estéril. (Hernández, G. 2011). En cualquier caso, se recomienda observar una serie de precauciones a la hora de elaborar preparaciones estériles; entre ellas:

- T** Control riguroso de las condiciones de trabajo, tratando de evitar la introducción y desarrollo de microorganismos.
- T** Nivel de contaminación microbiana mínimo de las materias primas, del equipo y de todo el material antes del proceso de esterilización.
- T** Control de presencia de microorganismos en las materias primas (Garreta, J.2016) (Suárez, A.2016)

Los procedimientos, habitualmente, se clasifican en dos grandes grupos: procedimientos físicos y procedimientos químicos. Entre los más utilizados destacan los siguientes:

2.2.4.4.1 Métodos físicos

T Calor

La esterilización por calor es el procedimiento más frecuente para la esterilización terminal de los productos farmacéuticos, en donde se requiere distintas condiciones de temperatura y que actúan por diferentes mecanismos de destrucción microbiana.

Calor húmedo

Utiliza vapor de agua, permitiendo una esterilización eficaz a temperaturas notablemente menores que el calor seco porque el vapor de agua, al condensarse sobre el producto, cede el calor asociado al cambio de fase gas-líquido el cual es calor latente de condensación. La acción germicida del calor húmedo se debe a procesos de tipo hidrolítico.

Entre los procedimientos para calor húmedo cabe señalar como más representativos los siguientes:

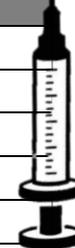
Autoclave: Constan de un recipiente con agua, que incorpora un sistema de calefacción, que genera vapor de agua, un manómetro para medir la presión del vapor de agua y una válvula para medir la salida de vapor de agua. El ciclo de esterilización requiere tiempos más prolongados a medida que aumenta el volumen del líquido de los envases que esterilizar como se muestra en la tabla 5

Vapor fluente: El producto se expone a la acción del vapor de agua sobre un recipiente en el que hierve el agua.

Ebullición de agua a temperatura superior a 100 °C: Es una modificación de la esterilización por vapor fluente, en la que se añaden sales al agua para incrementar (a 110-115°) la temperatura de ebullición del agua

Tindalización: Consiste en someter el producto a temperaturas relativamente bajas (< 100°C) y dejar pasar 24 horas antes de aplicar un nuevo ciclo de calefacción vegetativas y, en 24 horas de reposo, las formas esporuladas se transformarán e vegetativas, que se destruirían en la siguiente calefacción. (Suarez, A.2016)

Tabla 5 Tiempos de esterilización estándar en autoclave a 121°C en función del volumen de los envases (Suárez,A.2016)	
Volumen (mL)	Tiempo de esterilización
10-100	15
100-200	20
200-500	25
500-1000	30
1000-1500	35



Calor seco

Esté método se utiliza para productos sensibles a la humedad, pero estables frente al calor, el cual utiliza aire caliente, actuando por mecanismos de tipo oxidativo. En el campo de la tecnología farmacéutica, normalmente se acude al empleo de estufas y túneles de desecación.

Estufas de calor seco: La transferencia de calor a la cámara de esterilización se produce mediante procesos de convección natural o de circulación forzada de aire donde el aire se calienta al hacerlo pasar a través de resistencias eléctricas o de fuentes de radiación

infrarroja situadas en la cámara. Para la aplicación de ese procedimiento, las condiciones de referencia mínimas son 160°C durante 2 h.

Túneles de esterilización: Se trata de equipos de esterilización industriales que trabajen en continuo a temperaturas superiores a 250 °C. En determinadas zonas, la temperatura asciende por encima de 300°C durante cortos intervalos de tiempo. La calefacción de aire se puede producir mediante radiación infrarroja o mediante procesos de convección por medio de un flujo de aire en régimen laminar. Hoy se dispone de sistemas modulares que permiten combinar distintas temperaturas y tiempos de exposición en función del material que se desea esterilizar. (Suárez, A.2016)

T Filtración

La filtración es una operación unitaria, tradicionalmente tiene por objetivo la separación de las partículas sólidas insolubles contenidas en un fluido. Para que se pueda producir la separación física indicada, el fluido debe pasar a través de un medio filtrante que puede retener desde partículas sólidas visibles hasta moléculas disueltas y dejar pasar el líquido o el gas en el que se encuentran.

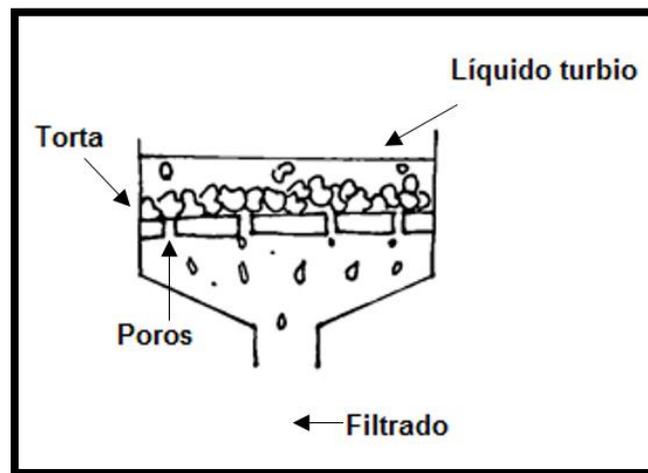


Figura 3 Esquema de proceso de filtración (Tinoco, A.2020).

El producto inicial, que va a ser filtrado, se llama líquido turbio o efluente; el medio filtrante se conoce como tal o se puede denominar lecho filtrante o simplemente filtro. Los medios filtrantes pueden estar constituidos por materiales de distinta índole; desde algunos muy sencillos como telas o algodón hasta polímeros sintéticos muy complejos, dependiendo del nivel de exigencia del proceso. El líquido libre de partículas que se obtiene después de pasar por el filtro recibe el nombre del filtrado y los sólidos que se van acumulando en el filtro, en caso de que así sea, se denomina torta o residuo. (Sanz.M.2016)

Los principales objetivos para utilizar la filtración son:

Ⓣ **Obtener un líquido libre de partículas o de determinadas moléculas:** Esta filtración clarificante debe ser muy precisa, dependiendo de los requerimientos de la formulación final. Una variante consiste en obtener disoluciones o ambientes libres de microorganismos. Es lo que se conoce como filtración esterilizante, en el cual se debe seleccionar un medio filtrante que retenga microorganismos y garantice, a un nivel adecuado, su ausencia en el líquido o aire filtrado.

Ⓣ **Recuperar el producto sólido:** En este caso, después del proceso de filtración se debe proceder al lavado de la torta con un disolvente adecuado para eliminar los restos de componentes solubles. Se utiliza en el proceso de obtención de micro o nanopartículas.

Ⓣ **Obtener sólido y filtrado por separado:** En la industria farmacéutica, la filtración es una operación obligada en la preparación de la mayor parte de las formas farmacéuticas, la cual se puede llevar a cabo en condiciones muy diversas y con distintos niveles de exigencia, lo cual da lugar a distintos tipos de filtración como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6 Tipos de filtración atendiendo a distintos criterios de clasificación (Sans,M.2016)

Criterio		Modalidades
Tamaño	Filtración clarificante	Implica la retención de partícula de tamaño comprendido entre 10 y 450 μm .
	Microfiltración	Utiliza medios filtrantes con un tamaño de poro entre 0.1 y 10 μm , los cuales son capaces de retener bacterias e incluso de reducir la población viral en una muestra.
	Ultrafiltración	Se fuerza el paso de líquido a través de una membrana semipermeable, donde se retienen elementos de entre 0.01 y 0.2 μm y se permite el paso del disolvente y de partículas de menor diámetro. Para conseguir que los fluidos atraviesen, es necesario ejercer una sobrepresión.
	Nanofiltración	Consigue retener partículas a escala nanomolecular utilizando membranas de entre 0.1 y 0.001 μm de diámetro de poro. Se utiliza principalmente para la eliminación de sustancias orgánicas, metales, nitratos y otros iones de aguas residuales, la cual requiere un gran aporte de energía para forzar el paso del disolvente.



	Ósmosis inversa	Es un tipo de filtración que permite la retención de partículas de hasta 0.0001 μm , que consiste en aplicar una presión superior a la presión osmótica para provocar que el disolvente pase en sentido contrario, forzando el paso se obtiene un compartimiento con disolvente purificado y otro donde se encuentran las impurezas concentradas.
Fuerza impulsora	Gravedad	El paso del efluente a través del filtro está impulsado por la fuerza hidrostática de la columna del líquido turbio, se realiza a temperatura y a presión atmosférica y es adecuado cuando el volumen es demasiado grande.
	Succión	Se favorece el paso del efluente a través del lecho filtrante haciendo vacío en el compartimiento en el que se recoge el filtrado.
	Bajo presión	Se aplica una sobrepresión sobre el líquido que se va a filtrar. La presión necesaria se puede alcanzar ya sea antes del filtro por la altura de la columna o bien por presión adicional.
	Centrifugación	La separación de los constituyentes sólidos y líquidos de una suspensión tiene lugar por efecto de la fuerza centrífuga gracias a las diferentes densidades de cada uno de los componentes, puesto que esta fuerza puede llegar a ser un múltiplo de la fuerza de gravedad, se consigue una más rápida separación del sólido.(Hopp,V.2014)
Presión y flujo	Flujo constante	Se incrementa progresivamente el gradiente de presión para vencer la resistencia, cada vez mayor, de los materiales que se van acumulando sobre el filtro
	Presión constante	Se mantiene fija la diferencia de presión, con lo cual el flujo es máximo al principio y va disminuyendo al incrementarse la resistencia por acumulación de sólidos sobre el medio filtrante.
Dirección del flujo respecto al filtro	Filtración transversal	Filtración convencional en la que se hace pasar el fluido de manera perpendicular al filtro.
	Filtración tangencial	El efluente circula de manera paralela al filtro, permite trabajar en continuo y la velocidad de filtración es elevada.
Tipo de retención	Cribado	Mecanismo mecánico de retención en el que los sólidos de mayor tamaño que los poros del lecho filtrante son retenidos en la superficie del mismo.
	Adsorción	Se produce la retención de partículas de sólidos por atracción, las partículas retenidas pueden ser de menor tamaño que los poros del filtro.

	Por formación de torta	Los sólidos acumulados forman una capa que actúa a su vez como lecho filtrante. La torta es capaz de retener partículas de tamaño mucho menor al que inicialmente es capaz de retener el filtro.
Tipo de filtro	Profundidad	La retención de las partículas sólidas tiene lugar tanto en la superficie del filtro (cribado) como en el interior del filtro (adsorción).
	Superficie	Los sólidos quedan retenidos en la superficie del filtro

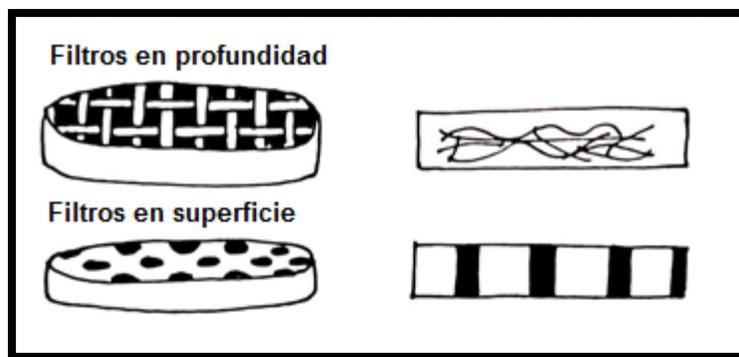


Figura 4 Tipos de filtro (Tinoco, A.2020).

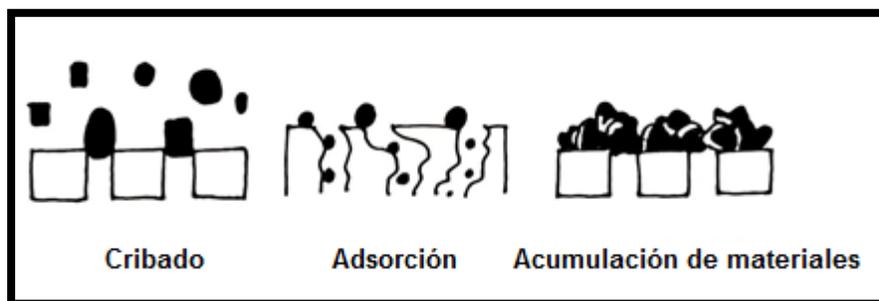


Figura 5 Modalidades de filtración según el tipo de retención (Tinoco, A.2020).

T Radiaciones

Las radiaciones ionizantes son, actualmente, el método de elección para la esterilización de medicamentos sólidos y productos sanitarios fabricados con materiales plásticos que se alteran a las temperaturas habitualmente empleadas en ciclos de esterilización por calor.



Radiación UV

Presenta un efecto germicida, al producir una excitación de los átomos de los ácidos nucleicos de los microorganismos, lo que provoca su muerte o su incapacidad para multiplicarse. La radiación UV se emplea principalmente para reducir la contaminación del aire, del agua y de las superficies de zonas de procesado de productos farmacéuticos, ya que, su bajo poder de penetración limita su uso, por lo que no es posible su utilización para la esterilización de medicamentos. La eficacia germicida de la radiación UV varía con la susceptibilidad de los organismos y es en función de la intensidad de la radiación y del tiempo de exposición.

Para ello, se instalan lámparas de vapor de mercurio en habitaciones, conductos de aire o grandes equipos. Cuando se usa para esterilizar agua, se ha de determinar el límite de penetración de esta radiación en la masa de agua, para garantizar su total irradiación.

Radiación ionizante

Las principales radiaciones ionizantes usadas en esterilización son los rayos beta (electrones acelerados) y los rayos gama. Cuando estas radiaciones inciden directamente sobre las moléculas de ADN del microorganismo producen su ionización, lo que conduce a rupturas de cadenas y a la formación de enlaces transversales, como consecuencia se impide la multiplicación celular. La cinética de destrucción de microorganismos por las radiaciones esterilizantes se puede establecer, para una población homogénea de microorganismos en forma vegetativa. (Suárez, A.2016)

2.2.4.4.2 Métodos químicos

Ⓢ Agentes gaseosos

ETO

El óxido de etileno ejerce su acción letal sobre los microorganismos al producir la alquilación de moléculas nucleofílicas, esenciales para la multiplicación celular. Depende de la concentración del gas, la temperatura, el contenido en agua de los microorganismos, su estado vegetativo o esporulado, la naturaleza y la permeabilidad al gas del material que va a ser tratado y el tiempo de exposición.

Los esterilizadores por ETO son cámaras de acero que permiten el calentamiento de la cámara con vapor de agua o agua caliente, con una bomba que elimina el aire interior de la cámara y recipientes que se conectan a la cámara de esterilización a través de una válvula, de manera que la mezcla esterilizante pasa a forma gaseosa al expandirse.

LTSF

El formaldehído es, igual que el ETO, un agente alquilante, se utiliza para eliminar la contaminación microbiana de superficie de salas y cabinas de flujo laminar, las variables de



un ciclo de LTSF son similares a las de un ciclo de esterilización con ETO, de manera que temperatura, concentración de formaldehído y capacidad de penetración y distribución afectan a la eficacia del proceso.

Gas-plasma de peróxido de hidrógeno

Es un proceso a baja temperatura basado en el efecto biocida que se consigue mediante la difusión, a través del material por esterilizar, de peróxido de hidrógeno en fase plasma (entre estados líquido y gas). Por la acción de la radiofrecuencia sobre vapor de peróxido de hidrógeno se generan iones hidroxilo e hidroperoxilo que reacciona con los componentes de las membranas celulares y con los ácidos nucleicos de los microorganismos, produciendo su inactivación. (Suárez, A. 2016)

2.2.4.4.3 Agentes antimicrobianos

Ⓣ Conservantes o bacteriostáticos

Las bacterias, hongos y levaduras son capaces de crecer en algunos medicamentos si se encuentran en presencia de nutrientes y agua. Los principales mecanismos de acción antimicrobiana de estos agentes se centran en la pared celular (lisis celular), en la membrana citoplasmática (cambios de permeabilidad) y en el citoplasma (alteración de ribosomas) microbianos. (Suárez, A.2016)

2.2.4.5 Apirogenicidad

Todas las preparaciones parenterales deben estar exentas de pirógenos. El término pirógeno engloba una serie de sustancias, tanto endógenas como exógenas, de diversa naturaleza, que pueden dar lugar a reacciones febriles, acompañadas de escalofríos y aceleración del pulso. Estos cuadros pueden ser más o menos intensos, pudiendo producir incluso la muerte, y su gravedad es directamente proporcional al volumen inyectado.

Durante la fabricación de las preparaciones parenterales, los pirógenos pueden ser incorporados a la formulación con el disolvente (generalmente agua), las materias primas (principio activo y excipientes), los envases y otros productos de acondicionamiento y aparatos que se utilizan durante el proceso de elaboración. La esterilización de estos componentes y materiales eliminará las bacterias, pero no necesariamente los pirógenos. Aunque los métodos de eliminación de pirógenos son muchos y variados, un lote declarado pirogénico no es recuperable. Por ello, es necesario detectar su presencia en los preparados parenterales mediante controles precisos. (Hernández, G. 2011).

Los métodos más utilizados para eliminar la presencia de pirógenos en las preparaciones de administración parenteral son adsorción, filtración e inactivación.

2.2.4.5.1 Adsorción

Se basa en la utilización de sustancias, como el carbón activado, capaces de adsorber físicamente los pirógenos. Estos productos se añaden a la disolución, se agita y, finalmente,



se eliminan por filtración o por sedimentación. Uno de los mayores inconvenientes de esta técnica es la gran afinidad del carbón activo por moléculas no ionizadas de compuestos de elevado peso molecular.

2.2.4.5.2 Filtración

Los pirógenos pueden ser retenidos en filtros de profundidad, aunque es preferible utilizar membranas de ultrafiltración, que separan las moléculas orgánicas. Para ello se utilizan membranas que se clasifican por el límite de peso molecular nominal excluido (LPMNE) y de porosidad comprendida entre 0.2 y 0.002 μm .

2.2.4.5.3 Inactivación

Algunos procedimientos que permiten la inactivación de pirógenos; entre ellos, el calor seco, el tratamiento con agentes oxidantes o el calentamiento en medio ácido o alcalino. Son técnicas agresivas que se utilizan principalmente para el tratamiento de ampollas y envases de vidrio, piezas y equipos metálicos y, en algún caso, productos químicos termoestables.

2.2.4.5.4 Otros métodos

Entre estos, cabe citar la destilación y la ósmosis inversa, así como algunas técnicas cromatográficas. Los procedimientos de destrucción descritos tienen un interés limitado, y que no son aplicables a preparaciones ya dosificadas en sus recipientes definitivos. (Garreta, J.2016)

2.2.4.6 Estabilidad

Se conoce como estabilidad a la capacidad de un medicamento para mantener sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas originales. En los preparados parenterales su vida útil varía de 1 a 3 años a una temperatura de entre 2° C hasta 30 °C dependiendo si es una solución líquida o un polvo liofilizado. (López, C. 2016) (Turco, S.2003)

2.2.4.6.1 Factores que influyen en la estabilidad

- Ⓧ **Cambios en el pH:** los medicamentos en solución deben tener un rango de pH de máxima estabilidad
- Ⓧ **Efecto de la temperatura:** La velocidad de una reacción aumenta exponencialmente con cada incremento de 10°C en la temperatura
- Ⓧ **Luz:** la luz acelera la degradación por lo cual los fármacos fotosensibles deben protegerse adecuadamente.
- Ⓧ **Efecto del diluyente y el envase:** fisiológico (pH 5.5-7), Glucosa 5 % (pH 3.5-5.5) o Glucosalino (pH 4-5), por otro lado, los envases deben ser inertes, ningún componente debe ser absorbido por el envase y no debe ceder componentes de la mezcla

2.2.4.6.2 Estudios de estabilidad en el ámbito hospitalario

Ⓣ Estabilidad física

Cambio de color y precipitación: la cual puede ser cualitativa (observación directa) o cuantitativa (contador de partículas subvisibles)

Turbidez: la cual puede ser cualitativa (observación directa) o cuantitativa (Turbidímetro)

Ⓣ Estabilidad química

Concentración de los principios activos y productos de degradación

Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Métodos indicadores de estabilidad

Ⓣ Estabilidad microbiológica

Garantizar la esterilidad durante el periodo de validez

Validación de la técnica aséptica

Control microbiológico ambiental

Control de esterilidad de producto final (López, C. 2016).

2.3 Nanopartículas

2.3.1 Definición

Las nanopartículas son partículas sólidas de naturaleza polimérica y de tamaño inferior a 1 μm , en las que el fármaco se encuentra disuelto, atrapado y/o adsorbido. (Álvarez, C.2016)

De forma genérica, la micro y la nanoencapsulación de fármacos pueden considerarse procesos de recubrimiento de fármacos, bajo la forma de moléculas, partículas sólidas o glóbulos líquidos, con materiales dotados de propiedades específicas, para dar lugar a partículas de tamaño micro o nanométrico, respectivamente. En el ámbito farmacéutico, comúnmente se consideran estructuras nanométricas a aquellas que tienen un tamaño inferior a una micra y que forman dispersiones coloidales, y estructuras micrométricas aquellas de tamaño superior a una micra e inferior a un milímetro. (López, C.2016)

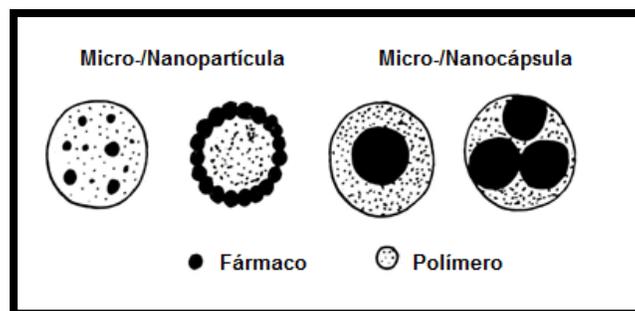


Figura 6 Estructuras resultantes de un proceso de micro o nanoencapsulación (Tinoco, A.2020).

2.3.2 Historia

Las técnicas que conducen a la obtención de micro o nanopartículas y micro o nanocápsulas, son las que tienen una presencia más relevante en el sector farmacéutico. Sin embargo, la aplicación de las tecnologías de microencapsulación se extiende más allá del ámbito farmacéutico, a campos tan diversos como la agricultura, la cosmética y la alimentación.

El origen de la microencapsulación data de 1931, año en el que se publicó un trabajo que describía la formación de microcápsulas de gelatina según un procedimiento denominado coacervación. Las aplicaciones se han extendido en las últimas décadas al campo de la cosmética, de la industria textil (los cosmetotextiles o tejidos inteligentes, como los que contienen microcápsulas refrescantes que, en contacto con la piel, liberan la sustancia encapsulada), de la encapsulación de células, de fármacos y de otros materiales biológicos como las vacunas y los extractos.

En concreto, la idea de microencapsular fármacos, coincidente en el tiempo con la nueva visión sobre la liberación controlada, fue propuesta en la década de los cincuenta por la compañía farmacéutica Smith Kline & French. Precisamente en el caso de la aspirina, que aparece como uno de los primeros fármacos microencapsulados, el objetivo fue controlar la liberación y prevenir la irritación gástrica.

Por otro lado, el origen de la nanotecnología se asocia al premio nobel de física, Richard P. Feynman, quien en la década de los sesenta utilizó por primera vez este término y supo anticipar el notable impacto que tendría en nuestras vidas y en particular en nuestra salud. La primera estructura de tamaño nanométrico presentada como vehículo para transportar fármacos fue el liposoma, descubierto casualmente por el científico hematólogo Alex Bamgham en los comienzos de los sesenta. Años más tarde, en los setenta, el tecnólogo y químico farmacéutico Peter Speiser publicó por primera vez la obtención de nanopartículas elaboradas a partir de proteínas tales como la albúmina y la gelatina, así como también a partir de polímeros acrílicos. Hubieron de pasar 30 años hasta que los liposomas y las nanopartículas vieron la luz en el mercado farmacéutico, más concretamente, los liposomas cargados de doxorubicina fueron comercializados en los noventa y las nanopartículas de albúmina con placlitaxel en 2006. (López,C.2016) (Reinie,O.2011)

Este tiempo ha sido considerado por algunos como excesivo. Sin embargo, se comprende si tenemos en cuenta la necesidad de adquisición de conocimiento, tanto en el ámbito biológico como tecnológico, para entender el comportamiento y satisfacer los requisitos regulatorios de los nanomedicamentos. Como resultantes de la nanotecnología y con la extraordinaria literatura acumulada al respecto cabe esperar que el beneficio de los nanomedicamentos sea claramente evidenciado en las próximas décadas. (López,C.2016)

2.3.3 Aplicaciones de la micro y nanoencapsulación de fármacos

T Desde una perspectiva meramente tecnológica, los avances logrados mediante la microencapsulación de fármacos podrían resumirse en los siguientes:



- Ⓣ Estabilización de moléculas activas inestables, es el caso de diversas vitaminas para las que la microencapsulación ha reducido notablemente su sensibilidad a la humedad y al oxígeno.
- Ⓣ Conversión de ingredientes activos líquidos en formas sólidas más fácilmente manipulables y almacenables
- Ⓣ Inclusión de principios activos incompatibles en la misma forma farmacéutica, se sabe que la aspirina se hidroliza cuando se comprime conjuntamente con el maleato de clorfeniramina, y sin embargo ambos productos son perfectamente estables cuando se microencapsulan de modo independiente previamente a la compresión.
- Ⓣ Enmascaramiento del olor y de sabor donde el recubrimiento de un fármaco de características organolépticas indeseables con un material que hace imperceptibles dichas características aporta importantes ventajas desde el punto de vista de la aceptabilidad por parte del paciente.
- Ⓣ Desde una óptica biofarmacéutica y terapéutica, los beneficios de la micro y nanoencapsulación de fármacos podrían resumirse en los siguientes:
 - Ⓣ Reducción del efecto directo irritante causado por algunos fármacos en la mucosa gástrica. El ejemplo más ilustrativo lo representan, de modo general, los fármacos de carácter ácido. El recubrimiento de estos compuestos con un material no soluble a pH gástrico ha permitido reducir sensiblemente la irritación gástrica causada por los mismos.
 - Ⓣ La presentación de fármacos hidrófobos bajo la forma de microemulsiones, o de micro y nanopartículas ha permitido incrementar la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos.
 - Ⓣ La consecución de una liberación sostenida o controlada del principio activo es, en la actualidad, la aplicación más frecuente de la microencapsulación. Gracias al recubrimiento eficaz del fármaco con un material adecuado es posible conseguir no únicamente una cesión gradual y sostenida del mismo, sino también que la liberación se produzca a modo de pulsos o a un determinado pH.
 - Ⓣ La modificación del perfil de distribución de los fármacos, que en algunos casos se ha traducido a una reducción de sus efectos adversos y en un incremento de su eficacia. Esto ha sido posible particularmente gracias al uso de nanoestructuras capaces de conducir el fármaco de forma más eficiente hacia los órganos diana.

2.3.4 Materiales utilizados en micro y nanoencapsulación de fármacos

La variedad de materiales utilizables en la micro y nanoencapsulación de fármacos se va ampliando gradualmente en la medida en que se introducen nuevos biomateriales en el campo de la liberación de fármacos perfilan nuevas aplicaciones de estas técnicas. De los materiales de encapsulación van a depender las propiedades físicas y químicas de las partículas resultantes, sean de tamaño micrométrico o nanométrico.

2.3.4.1 Lípidos

Las moléculas lipídicas presentan características anfipáticas, que las dotan de capacidad tensoactiva y de propiedades de autoasociación, por lo que resultan muy útiles en nanoencapsulación.



2.3.4.2 Proteínas

Las proteínas purificadas de origen natural pueden emplearse para formar micro y nanopartículas. La gelatina fue el primer material utilizado en microencapsulación y sigue presentando en la actualidad un importante potencial, al igual que la albumina, otro de los primeros materiales a los que se recurrió para la nanoencapsulación de fármacos.

2.3.4.3 Polímeros

Debido a su gran versatilidad, son los materiales más utilizados tanto en micro como en nanoencapsulación. Dentro de esta gran familia podemos distinguir entre polímeros naturales, semisintéticos y sintéticos

T Los polímeros naturales

Son principalmente de naturaleza polisacárida (de origen animal y vegetal). Los polisacáridos presentan en muchos casos una marcada capacidad mucoadhesiva, de gelificación y una cierta funcionalidad biológica

T Los polímeros semisintéticos

Utilizados en microencapsulación engloban los derivados celulósicos de los cuales existe una amplia variedad en el mercado con diferentes características de solubilidad

T Los polímeros sintéticos

Más utilizados en las técnicas de microencapsulación son los poliésteres y los derivados acrílicos. Una gran variedad de polímeros sintéticos se ha empleado también en la nanoencapsulación, estos son hidrófobos, mientras que sus productos de degradación, el ácido láctico y el ácido glicólico son hidrófilos y fácilmente eliminables del organismo por filtración glomerular. (López, C.2016)

2.3.5 Métodos de elaboración de nanopartículas

La selección del método de nanoencapsulación viene determinada fundamentalmente por cuatro factores: el material utilizado y la arquitectura que se pretende conseguir para el nanosistema, el fármaco que se va a encapsular y la vía por la que se desea administrar.

2.3.5.1 Formación de nanopartículas y nanocápsulas por polimerización

Estos métodos, que tienen como factor común el desencadenamiento de una reacción de polimerización, pueden dividirse fundamentalmente en polimerización local y emulsión-polimerización.

T Local

Se basa en la formación de una emulsión de monómero y fármaco en una fase externa en la que el monómero debe ser insoluble. El monómero se polimeriza en este sistema disperso y

se forman las nanopartículas sólidas. La fase continua en estos métodos puede ser un disolvente orgánico o acuoso.

T Emulsión-polimerización

En este método, una mezcla de aceite, monómero y etanol se inyecta sobre una fase acuosa. La dispersión de la fase orgánica producida por la difusión instantánea del etanol es seguida por una rápida polimerización de los cianoacrilatos en la interfase, catalizada por los iones presentes en el agua. El resultado es la formación de nanocápsulas constituidas por un núcleo de aceite y una capa polimérica de policianoacrilatos. (López, C.2016)

2.3.5.2 Emulsificación y evaporación del disolvente

El método consta de dos etapas. En la primera, se realiza la emulsificación de una disolución del polímero, mediante la aplicación de energía, en el seno de una fase continua en la que el disolvente debe ser inmiscible. En un segundo paso, se procede a la evaporación del disolvente que forma la fase interna, bien bajo vacío o bajo agitación continua en condiciones ambientales, forzando la precipitación del polímero en forma de nanopartículas.

Es frecuente que en este método la fase externa sea acuosa y la fase interna sea un solvente orgánico. El tamaño de partícula puede modularse mediante la selección de los tensoactivos de las fases acuosa y orgánica, y variando la temperatura, la viscosidad de las fases, el tipo de energía del proceso de emulsificación y las condiciones de agitación. (López, C.2016)

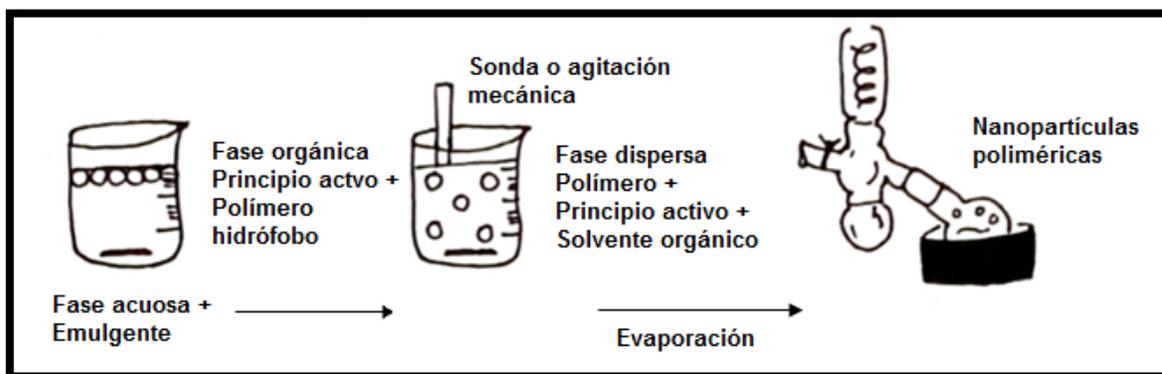


Figura 7 Método emulsificación y evaporación del disolvente (Tinoco, A.2020).

2.3.5.3 Desplazamiento de disolvente y de deposición interfacial

El método de desplazamiento del disolvente requiere la disolución de un polímero hidrófobo en un solvente orgánico totalmente miscible en agua. Cuando esta fase orgánica se inyecta sobre una fase acuosa en agitación, la rápida difusión del disolvente orgánico deja el polímero suspendido en un no-solvente, produciéndose una precipitación instantánea de este en forma de nanopartículas. El disolvente orgánico se elimina, en un segundo paso, por evaporación.

El método descrito puede modificarse mediante la adición de aceites y tensoactivos a la fase orgánica en cuyo caso se denomina método de deposición interfacial y el resultado es un sistema matricial con un núcleo oleoso y una cubierta polimérica. Una variante de la deposición interfacial de polímeros hidrófilos, consiste en añadir aceite y un tensoactivo que dota de carga a l núcleo lipídico En este caso, el polímero se incorpora a la fase continua acuosa y la deposición está gobernada por fuerzas electrostáticas. (López, C.2016)

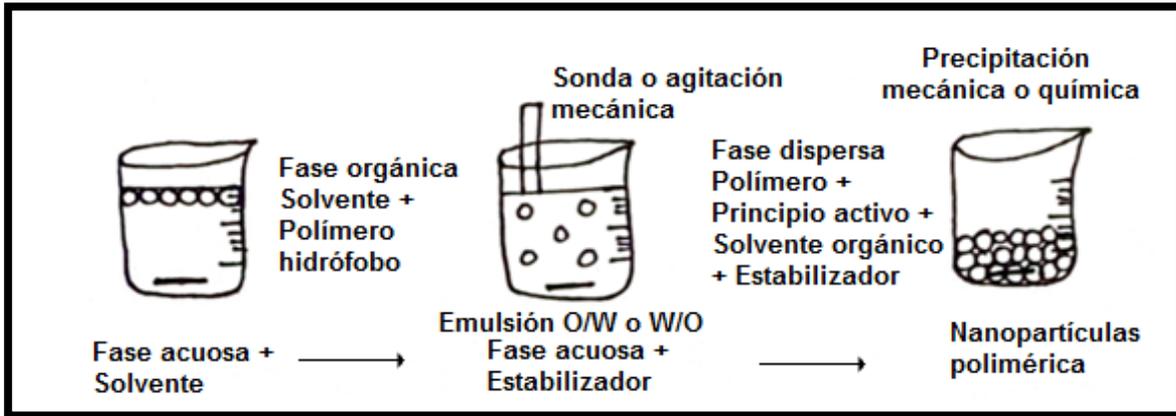


Figura 8 Método de desplazamiento del disolvente y de deposición interfacial (Tinoco, A.2020).

2.3.5.4 Salting-out

Este método se basa en la disolución de un polímero hidrófobo en un disolvente totalmente miscible en agua. Esta disolución se emulsifica en el seno de una fase acuosa saturada de sal que no permite la difusión del disolvente por un efecto “salting-out”. La precipitación del polímero se produce al diluir esta emulsión con agua, lo que dispara la difusión instantánea del disolvente hacia la fase continua. Para utilizar este todo, en general, es necesario añadir tensoactivos a la fase acuosa para estabilizar la emulsión. (López, C.2016)

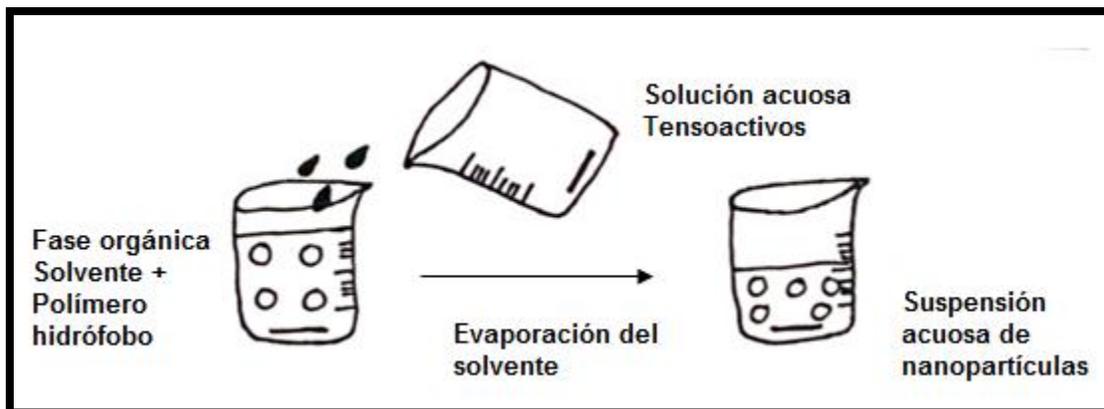


Figura 9 Método de salting-out (Tinoco, A.2020).

2.3.5.5 Formación de nanopartículas por gelificación iónica y complejación electrostática

El método de reticulación iónica se basa en la utilización de macromoléculas capaces de gelificar tras la adición de iones multivalentes que tienen carga opuesta a las macromoléculas. Bajo condiciones determinadas de dilución de las macromoléculas y los iones, se producen núcleos de gelificación nanométricos en el seno de la fase continua. Este método se ha empleado fundamentalmente con el quitosano y el ion tripolifosfato. Es uno de los pocos métodos eficaces para la encapsulación de macromoléculas hidrófilas. Entre sus desventajas están la reducida variedad de polímeros a los que puede ser aplicado, la tendencia a formar partículas de tamaño elevado, generalmente superior a 200 nm, y su escasa utilidad con fármacos hidrófobos.

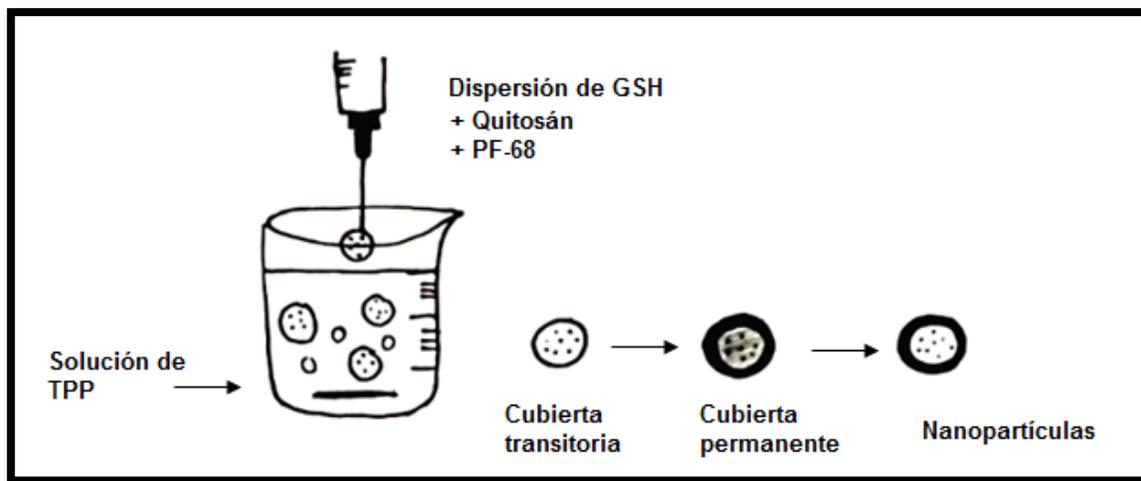


Figura 10 Método de gelificación iónica (Tinoco, A.2020).

Un método similar es la complejación electrostática, donde se induce la precipitación en forma de nanopartículas de un polímero cargado hidrosoluble tras su interacción con una macromolécula de carga contraria. Este método permite la utilización de diversos polímeros cargados tales como el quitosano. (López, C.2016)

2.3.5.6 Producción de nanopartículas por coacervación de macromoléculas

Este método es aplicable a un número elevado de polímeros y se basa en la desolvatación de estos inducida por cambios en su carga o en su conformación. Requiere habitualmente la adición de un agente de desolvatación o un cambio de temperatura. Suele requerir fuentes de dispersión más energética (sonicación) y emplear disoluciones más diluidas de los polímeros. Su ventaja principal es que permite trabajar en ausencia de disolventes orgánicos, pero en algunos casos puede requerir la adición de agentes tóxicos como glutaraldehído. (López, C.2016)

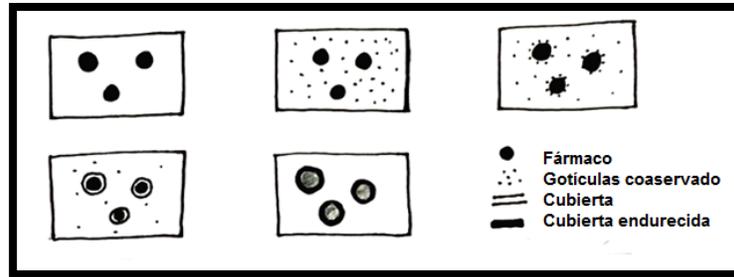


Figura 11 Proceso de microencapsulación por coacervación (Tinoco, A.2020).

2.3.5.7 Nanopartículas lipídicas preparadas por fusión-emulsificación

Este método se emplea fundamentalmente para la formación de nanopartículas compuestas de lípidos sólidos a temperatura ambiente. El lípido se calienta por encima de su temperatura de fusión y el fármaco y los tensoactivos se disuelven en el lípido fundido. Posteriormente, la mezcla lipídica fundida se emulsifica en una fase continua acuosa con tensoactivos. La nanoemulsión formada se enfría por debajo del punto de fusión del lípido y da lugar a las nanopartículas cargadas de fármaco. Las ventajas fundamentales de este procedimiento residen en que no es necesario utilizar disolventes orgánicos y en su fácil escalabilidad. (López, C.2016)

2.3.6 Nanopartículas vía parenteral

Las aplicaciones de nanoencapsulación han ido igualmente dirigidas al desarrollo de formulaciones, si bien es notable el número de formulaciones destinadas a la vía parenteral. La naturaleza de estas formulaciones es diversa, pues si bien las formulaciones orales están constituidas por nanopartículas de fármacos convenientemente estabilizadas mediante agentes tensoactivo, las formulaciones de uso parenteral se centran en el uso de vehículos tales como liposomas, micelas y conjugados poliméricos. (López, C.2016)

El tamaño de las nanopartículas es más adecuado para la administración parenteral ya que son demasiado pequeñas para causar fenómenos embólicos y pueden circular a través de la vasculatura, a diferencia de las micropartículas. Las micropartículas tienen un mayor diámetro, por lo que pueden provocar fenómenos embólicos en vasos del mismo diámetro.

Las nanopartículas administradas por vía parenteral tienen que cumplir una serie de requisitos, aparte de ser sistemas estériles, deben ser biocompatibles, presentar compatibilidad entre la sustancia activa y el resto de los componentes, una cinética de biodegradación y unas propiedades mecánicas adecuadas y ser toxicológicamente seguras. (Lamas,A.2013)

5.3.7 Nanopartículas y antioxidantes

La combinación de las características de los polímeros orgánicos e innovaciones en la nanotecnología ha llevado a la creación de nuevos materiales con propiedades extraordinarias. Los que han despertado mayor interés son los biopolímeros combinados con propiedades antioxidantes y antimicrobianas. (López, H.2016)

Los medicamentos de última generación poseen sustancias que actúan con alta especificidad a nivel intracelular, por lo que la micro y nanotecnología ayuda a miniaturizar los excipientes con el fin de que las sustancias bioactivas o fármacos lleguen lo más íntegros posibles a las partes celulares de un tejido en específico, resistiendo enzimas salivales, jugos gástricos, su circulación en el torrente sanguíneo, y demás barreras y condiciones naturales que pueden degradar a la sustancia en su estado eficaz. Entre las sustancias bioactivas con histórica funcionalidad reconocida se encuentran los antioxidantes, que son aquellas sustancias que protegen del estrés oxidativo (formación de radicales libres), el cual es responsable de enfermedades crónicas degenerativas. (Sánchez, V.2018) (Fernández, K.2011)

2.4 Glutación

2.4.1 Definición y funciones

El GSH(Glutación reducido) es un tripéptido que se encuentra en altas concentraciones en todas las células. Se sintetiza a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Se trata del principal antioxidante de las células, ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno, como los RL y los peróxidos. Es importante como una molécula hidrofílica que se añade a las toxinas lipofílicas y residuos en el hígado durante la biotransformación antes de que puedan formar parte de la bilis. (Pompella, A.2003) (Fernández, J.2008)

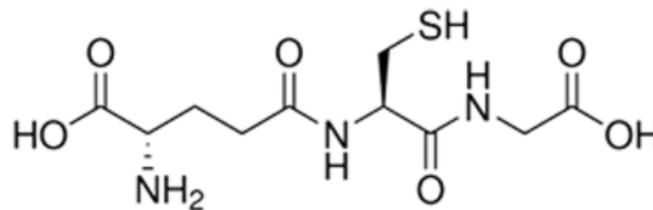


Figura 12 Estructura del glutación (Fernández ,J.2008)

A pesar de que el GSH se sintetiza de manera exclusiva en el citosol, esta molécula se distribuye en los organelos intracelulares, incluyendo el retículo endoplasmático y la mitocondria. El GSH se encuentra de manera predominante en su forma reducida (GSH), excepto en el retículo endoplasmático, en donde existe principalmente como glutación oxidado (GSSG), quizá debido a la necesidad de que exista un ambiente adecuado para el manejo de las proteínas. (Fernández, J.2008)

El glutación se encuentra en concentraciones promedio de 12 mM(milimolar) en células de mamíferos. Tiene importantes funciones como:

- Ⓣ Antioxidante
- Ⓣ Es parte importante de la detoxificación de medicamentos y otras sustancias
- Ⓣ Es cofactor para las reacciones de isomerización
- Ⓣ Es esencial para la proliferación celular y tiene un papel importante en la apoptosis
- Ⓣ Controla la permeabilidad de membrana y el transporte de aminoácidos.



- Ⓣ Interviene en el proceso de síntesis de proteínas, ADN y ARN.
- Ⓣ Regula la formación y el mantenimiento de la forma activa de las enzimas
- Ⓣ Mantiene el potencial de óxido-reducción de la célula y la protege del estrés oxidativo
- Ⓣ Almacenamiento de cisteína (Martínez, M.2006)

2.4.2 Estrés oxidativo (EO)

Como consecuencia del metabolismo aeróbico, los organismos están sujetos a un cierto nivel de estrés oxidativo fisiológico. El H_2O_2 producido de manera endógena se reduce por el GSH en presencia de la GSH-peroxidasa (GPx). Como resultado, el GSH se oxida a GSSG, por lo que, para volver a tener actividad antioxidante, éste debe volver a reducirse otra vez a GSH, lo que se lleva a cabo por la enzima GSSG reductasa a expensas de NADPH, en lo que se conoce como un ciclo redox. (Fernández, J.2008). En ninguno de los casos ya sea en su estado reducido u oxidado, el glutatión no es capaz de ingresar a la célula nuevamente, por lo que su síntesis citoplásmica dependiente de las enzimas que se encuentran presentes, es un factor importante en la modulación óxido-reducción de los organismos.

Los antioxidantes son moléculas que cuando están presentes en concentraciones más bajas respecto a las de un sustrato oxidable, retrasan o inhiben la oxidación de este sustrato. Los antioxidantes se clasifican en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua (hidrofílicos) o en lípidos (hidrofóbicos). En general, los hidrofílicos reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los hidrofóbicos protegen las membranas celulares contra la peroxidación de lípidos. Los diferentes antioxidantes están presentes en una amplia gama de concentraciones en fluidos corporales y tejidos, algunos como el glutatión están mayormente intracelulares. (Martínez, J.2011)

Los radicales libres RL son definidos como moléculas o fragmentos moleculares con uno o dos electrones desapareados. Un electrón desapareado incrementa la reactividad química de un átomo o molécula y busca complementar su último orbital; es por ello que los radicales libres tienen una vida media muy corta (millonésimas de segundos) y son altamente reactivos con otras moléculas. El EO se origina por un desequilibrio entre la producción de ERO y ERN y la capacidad antioxidante de la célula. Las ERO incluyen, entre otras, el anión superóxido (O_2^-), los radicales hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2); y las ERN incluyen el óxido nítrico (NO-), dióxido de nitrógeno (NO_2^-) y el peroxinitrito ($OONO^-$), entre otras moléculas. El daño a los tejidos causado por estrés oxidativo se ha relacionado con diversos fenómenos biológicos. El estrés oxidativo puede dañar a lípidos, proteínas y los ácidos nucleicos, alterando las funciones de estas moléculas. (Martínez, J.2011) (Elejalde, J.2011)

2.4.3 Enfermedades hepáticas

Se ha observado la participación del EO en los mecanismos de inflamación, cirrosis biliar o alcohólica, pancreatitis aguda, entre otras alteraciones del tracto digestivo. En la hepatitis fulminante, las ERO activan receptores de muerte celular, como factor de necrosis tumoral (TNF), el cual se ha propuesto como mediador de muerte celular programada (apoptosis) en células hepáticas. Por otra parte, la enfermedad de hígado graso no alcohólico presenta



diferentes estadios en su progresión todas ellas caracterizadas por la presencia común de ERO y EO en su progresión. (Elejalde, J.2011)

Puesto que el GSH es un antioxidante crítico y las especies reactivas de oxígeno se han asociado a la fisiopatología de las enfermedades hepáticas, la disminución o supresión del GSH se ha planteado como un evento determinante en la progresión de las alteraciones hepáticas inducidas por ácidos biliares durante la isquemia-reperfusión, así como en el daño por hepatitis B y C.

Quizá una de las enfermedades mejor caracterizadas desde este punto de vista es el daño hepático inducido por etanol. Se ha estudiado ampliamente y se ha demostrado que la ingesta crónica de etanol reduce de manera selectiva las concentraciones de GSHm. Dicha supresión del GSHm precede todos los signos de daño hepático. El alcohol también estimula el incremento en el colesterol y su deposición en las membranas mitocondriales, por lo que esto afecta el transporte del GSH hacia la mitocondria, y se ha sugerido como una causa en la disminución del GSHm. La cirrosis, que también se ha relacionado con la disfunción mitocondrial, presenta eventos semejantes en la desregulación de los niveles de GSHm. (Martínez, M.2006)

2.4.3.1 Terapias farmacológicas

La sobredosis por acetaminofén es la principal causa de insuficiencia hepática aguda, puede ocurrir por una ingesta aguda o por intoxicación con dosis escalonadas. El mecanismo de lesión más estudiado es la acumulación de N-acetil-p-benzoquinoneimina, que disminuye las reservas del antioxidante glutatión; ocasionando estrés oxidativo a nivel mitocondrial. (Rojas, C.2019)

El N-Acetilcisteína - NAC es un tíol, precursor de L-cisteína y glutatión reducido; y un agente mucolítico. El NAC es un eliminador de radicales libres por su interacción con las especies de oxígeno reactivo, además, es una fuente de grupos sulfhidrilos en las células. El NAC provee un efecto protector a varios grupos de sistemas celulares, Luego que el NAC libre entra en una célula es hidrolizado para así liberar cisteína: un precursor de glutatión (GSH). La síntesis de GSH está limitada por la disponibilidad de sus sustratos, usualmente la cisteína es un precursor limitante, el GSH participa en la protección contra el daño oxidativo causado por las especies reactivas de oxígeno. La enzima glutatión reductasa reduce el tripéptido a partir de su forma oxidada, la cual se activa en situaciones de estrés oxidativo. (Ramos, Y.2017).

NAC es un fármaco bien conocido y seguro como antídoto para insuficiencia hepática por sobredosis de acetaminofén si se administra en etapas tempranas. NAC presenta un periodo pequeño de administración, que limita su uso. Esto hace que se estén estudiando otros fármacos que tiene su efecto en los nuevos mecanismos de acción que se han descubierto de la hepatotoxicidad de acetaminofén, más allá del ya conocido estrés oxidativo mitocondrial. Estos mecanismos incluyen metabolismo hepático de fase 1 y 2, autofagia, disfunción micro

circulatoria, regeneración hepática y estrés del retículo endoplasmático. A pesar de esto actualmente ninguno otro fármaco diferente de NAC está aprobado para manejo y prevención del daño hepático. (Rojas, C.2019)

2.4.4 Quitosán-Glutatión

El nombre sistemático de la quitina es $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa. Se encuentra principalmente en las conchas de crustáceos y formando parte del exoesqueleto de los insectos, así como también en las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas. Por su parte el quitosano es un polisacárido que se encuentra en estado natural en las paredes celulares de algunos hongos; sin embargo, su principal fuente de producción es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente hidróxido de sodio o de potasio, a altas temperaturas. (Lares, C.2008)

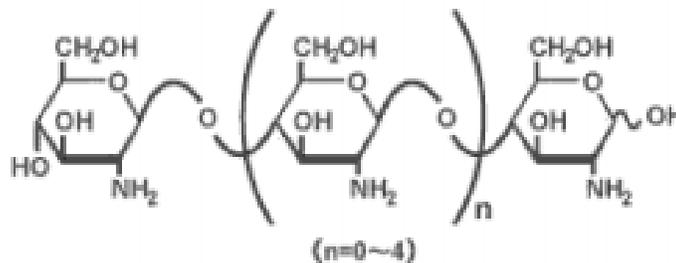


Figura 13 Estructura del quitosano (Zetina,L.2019)

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del quitosano uno de los materiales más versátiles que se estudian como se muestra en su estructura desde hace ya algún tiempo, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como la reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, de las cuales se obtienen materiales con propiedades adecuadas para aplicaciones inmediatas y futuras en biotecnología o biomedicina. (Lares,C.2008)

El uso de nanopartículas como sistema de transporte de fármacos y, biomoléculas ha sido de gran ayuda para poder llevar estas moléculas a lugares específicos, protegiéndolos de degradaciones enzimáticas inactivando la función de estas. En el caso del glutatión se pueden usar las nanopartículas para llevar este antioxidante a lugares que por otro medio de administración no puede llegar ya que su disponibilidad es baja debido a la degradación que sufre y a que es muy hidrofílico.

Varios prototipos de nanopartículas de polímeros biodegradables han estado propuestos para el suministro de medicamentos. Entre ellos, las NP basadas en el polisacárido quitosano, el cual ha demostrado resultados prometedores debido a sus propiedades e incluso su biocompatibilidad. (Rotar, O.2014), (Téllez, V.2017).

Pocas son las investigaciones que se han realizado sobre el sistema o vehículos para liberación y/o transporte de glutatión (GH) dentro de sistemas biológicos en el tracto



gastrointestinal la nanoencapsulación podría proteger al glutatión de la degradación química o enzimática. El glutatión ha sido administrado como un ingrediente alimentario funcional, pero se ha visto que su biodisponibilidad es baja, debido a su pobre absorción intestinal e inestabilidad, bajo condiciones de estrés el grupo Tiol del GSH es fácilmente oxidado a disulfuro de glutatión por lo que pierde su actividad enzimática. (Rotar, O.2014)



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



Diversas enfermedades son tratadas con acetaminofén, sin embargo, el uso prolongado de este puede causar insuficiencia hepática aguda, generando la disminución de GSH causando estrés oxidativo a nivel mitocondrial. Este padecimiento es tratado principalmente con NAC, el cual es un precursor de GSH, que al ser una molécula hidrofílica no ingresa en las células, es por ello que al estar encapsulada en un sistema de nanopartículas de quitosán, este se podrá introducir a la célula, teniendo un tratamiento más directo.



HIPÓTESIS



i se realizan los estudios de preformulación pertinentes para un medicamento parenteral a base de nanopartículas de quitosán-glutati6n se podr6 obtener una formulaci6n que cumpla con los criterios de calidad establecidos (tama6o de part6cula, pH, Isotonicidad y porcentaje de carga).



OBJETIVOS

5.1 Objetivo General



Desarrollar una formulación parenteral a base de nanopartículas de quitosán-glutatin con el método de gelación iónica para mejorar su biodisponibilidad

5.2 Objetivos específicos

- Buscar información referente a los procedimientos de fabricación de soluciones parenterales para establecer las condiciones de elaboración de la misma.
- Realizar los estudios de preformulación necesarios para tener un sistema parenteral a base de nanopartículas de quitosán-glutatin.
- Optimizar la formulación parenteral a base de nanopartículas de glutatin y su proceso de elaboración, utilizando como variables de respuesta el tamaño de partícula, pH, porcentaje de hemólisis y porcentaje de encapsulamiento.



MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos

Buffer de acetatos

- Acetato de sodio $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$
- Ácido acético glacial $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (Cedrosa)
- Agua Mili-Q

Buffer de acetatos con solución salina

- Acetato de sodio $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$
- Solución salina fisiológica SSF

Buffer salino de fosfatos 1x (PBS)

- Cloruro de sodio NaCl
- Cloruro de potasio KCl
- Fosfato de disodio Na_2HPO_4
- Fosfato de potasio KH_2PO_4

Agua ajustada con hidróxido de sodio

- Agua Mili-Q
- Hidróxido de sodio NaOH

Nanopartículas de quitosán-GSH

- Ácido acético glacial $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (Cedrosa)
- PF-68(Sigma)
- TPP (Sigma)



- Ⓣ Quitosán- bajo peso molecular (Sigma)
- Ⓣ GSH(Sigma)
- Ⓣ Agua Mili-Q

Porcentaje de Hemolisis

- Ⓣ SSF
- Ⓣ Tritón

Porcentaje de encapsulamiento

- Ⓣ Glicerol
- Ⓣ DTNB
- Ⓣ DMSO
- Ⓣ EDTA
- Ⓣ PBS 1x

Reactivos biológicos

- Ⓣ Sangre humana

6.2 Aparatos y equipos

- Ⓣ Balanza analítica
- Ⓣ Agitador magnético
- Ⓣ Agitador con propela
- Ⓣ Potenciómetro
- Ⓣ Ultracentrífuga
- Ⓣ Centrífuga
- Ⓣ Zetazaizer (MALVERN)
- Ⓣ Lector de placa (Thermo Fisher)

6.3 Métodos

Se determinaron diversos sistemas de NP en los cuales se variaron las concentraciones de los excipientes para poder visualizar su comportamiento

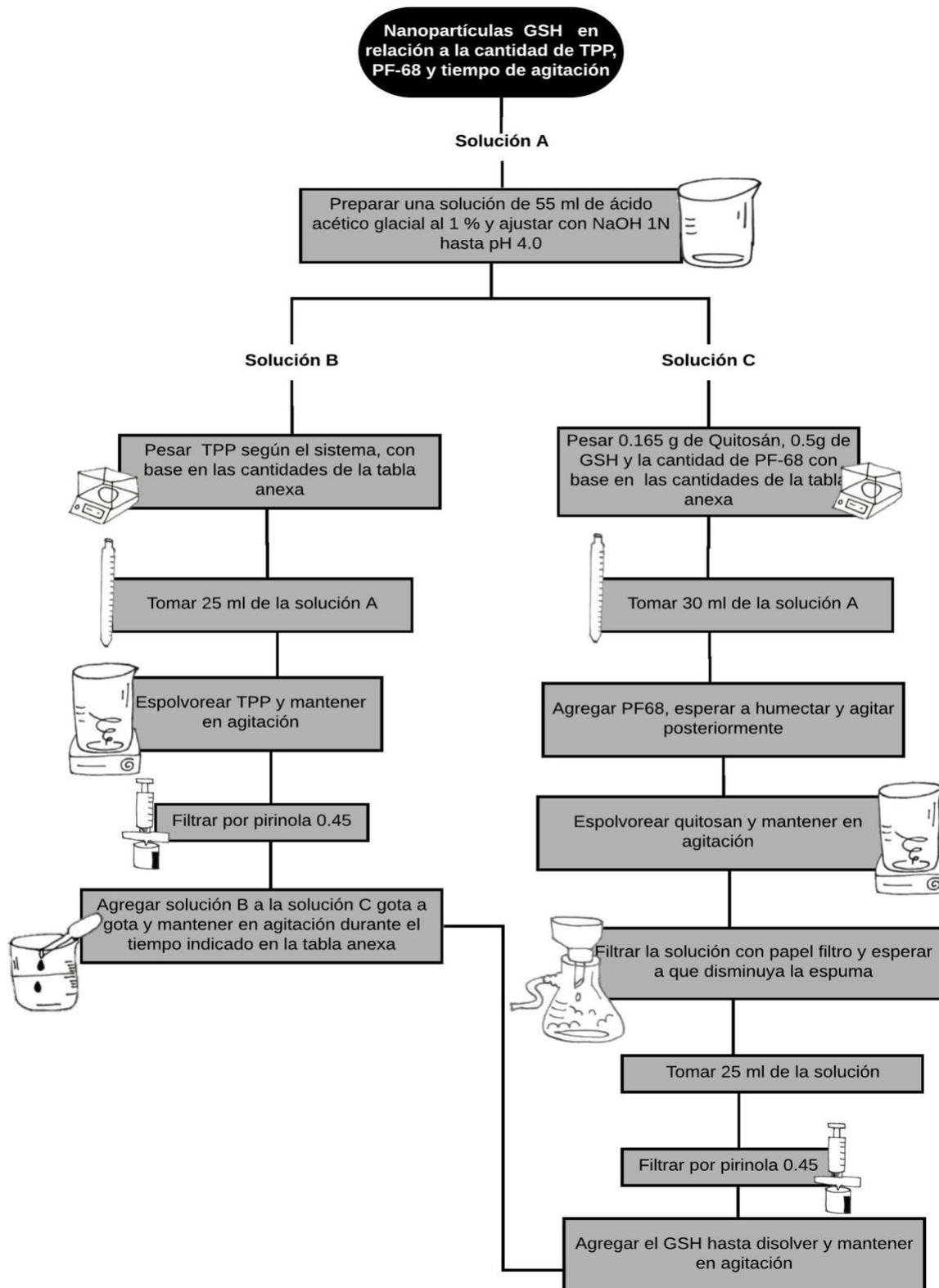
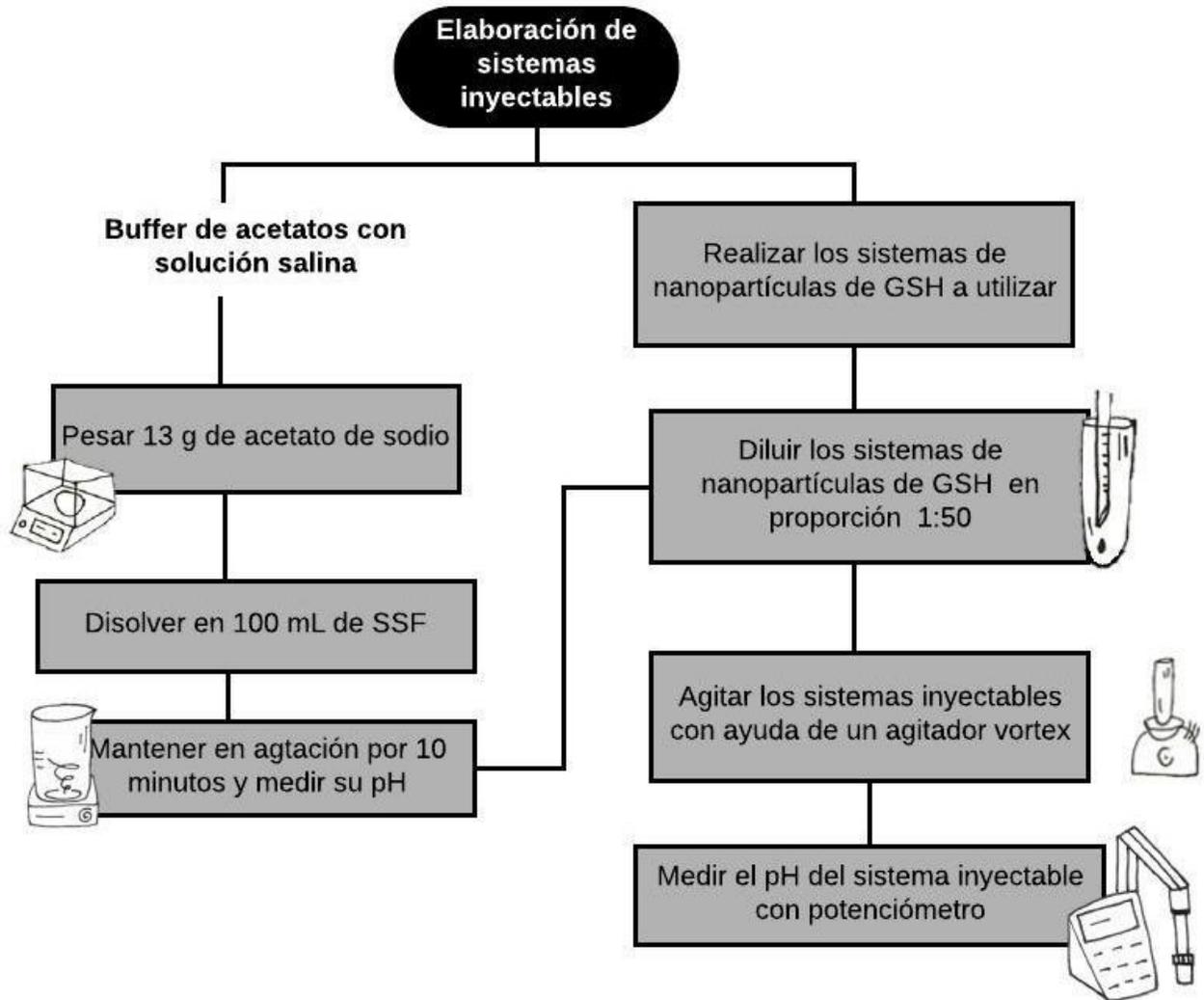


Diagrama 1 Nanopartículas de GSH en relación a la cantidad de TPP, PF-68 y tiempo de agitación

Tabla 7 Cantidad de excipientes en base al diseño realizado

Experi- mento	1er diseño						Optimización					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	-	-
Sistema TPP	0.0 5	0.05	0.0375	0.0375	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05	-	-
PF-68	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.775	0.775	0.775	0.775	-	-
Tiempo(min)	30	60	30	60	30	60	30	45	60	60	-	-
Experi- mento	2° diseño											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sistema TPP	0.0 5	0.05	0.0375	0.0375	0.025	0.025	0.05	0.05	0.0375	0.0375	0.025	0.025
PF-68	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1	1	1
Tiempo(min)	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60

En base a los sistemas de nanopartículas se elaboraron los sistemas de inyectables, eligiendo el medio adecuado y las concentraciones y excipientes del mismo


Diagrama 2 Elaboración de sistemas inyectables

Para determinar la cantidad de GSH en las nanopartículas se llevó a cabo el procedimiento de porcentaje de encapsulamiento que se muestra a continuación:

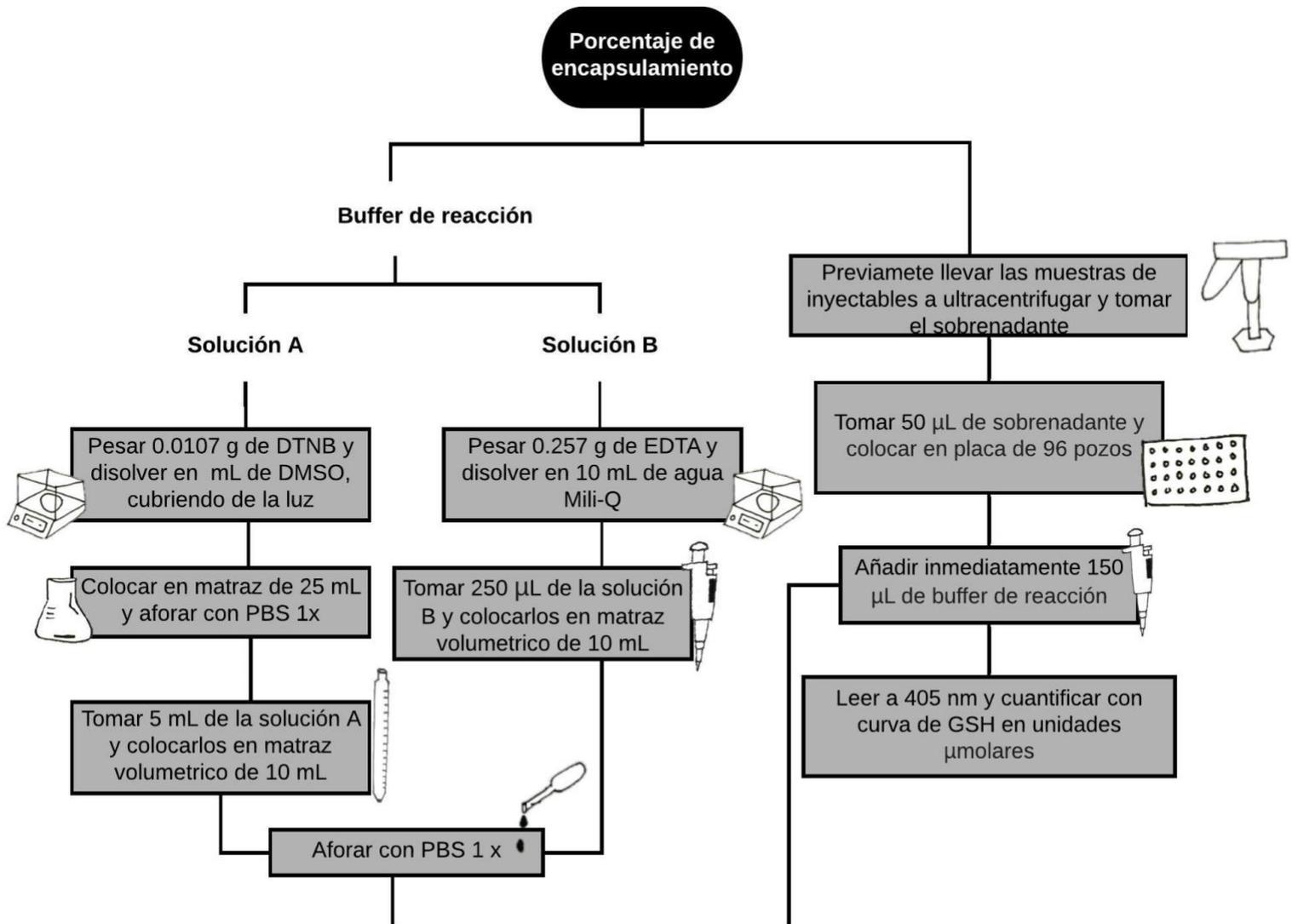


Diagrama 3 Procedimiento de porcentaje de encapsulamiento

Se determinó el porcentaje de hemólisis en los sistemas inyectables para determinar la isotonía de los mismos

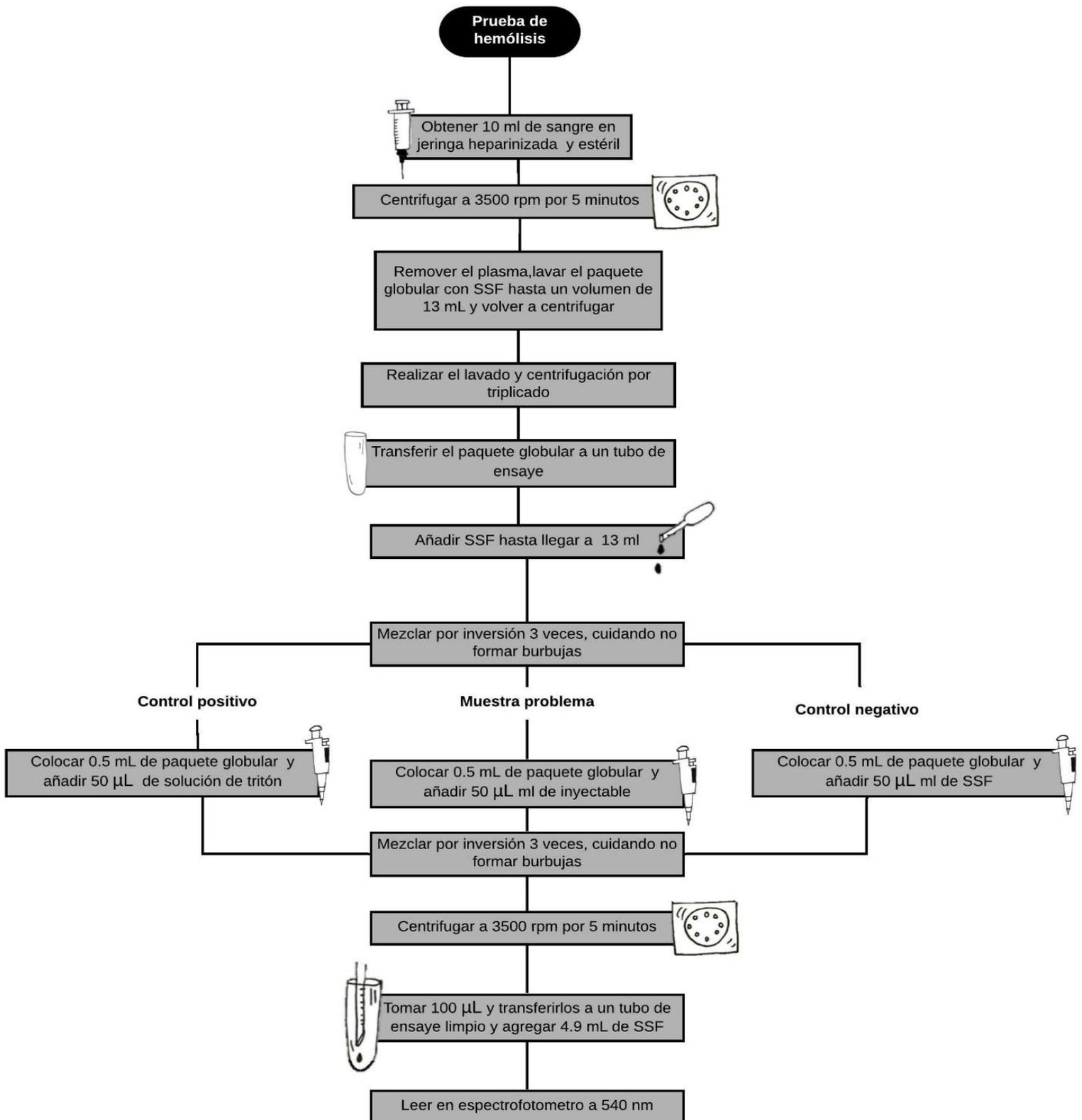


Diagrama 4 Procedimiento de porcentaje de hemólisis

RESULTADOS Y ANÁLISIS



En la parte de preformulación se investigaron las propiedades de los excipientes, así como el procedimiento y controles para realizar una formulación parenteral.

Se realizaron diversos diseños de experimentos, para la formulación de NP, dichos diseños se refieren a los procesos para planear el experimento de forma que se recaben datos adecuados y analizarse con métodos estadísticos para llegar a conclusiones significativas válidas y objetivas de los datos. (Montgomery, D.2004). En este caso se utilizaron para determinar la mejor formulación ya que se variaron las concentraciones de los excipientes y los tiempos de agitación como se muestra en la Tabla 7. En el primer diseño sólo se variaron las concentraciones tanto de TPP como el tiempo de agitación y de esta manera se midieron los pH, una vez determinados estos, se realizó un segundo diseño donde además de variar las concentraciones de TPP y tiempo de agitación también se variaron las concentraciones de PF-68, para determinar si era un factor que podía influir en la formulación.

Se obtuvieron tanto en los diseños de experimentos como en la optimización nanosuspensiones transparentes y sin presencia de ningún precipitado o aglomerado (Figura 14) entendiendo como nanosuspensión que es una dispersión compuesta de dos fases: la continua o externa que suele ser líquido normalmente acuoso en este caso la solución de ácido acético al 1 % y la fase dispersa o interna constituida por el principio activo en tamaños menores a 500 nm (Herrera,J.2017), que en la formulación la representa la encapsulación de GSH con TPP, Quitosán y PF-68. En comparación con las partículas de grado micrónico, las nanopartículas tienen una gran movilidad debido a su pequeño tamaño y pueden ingresar

fácilmente a las células para acumularse en el sitio de la lesión. Por lo tanto, la tasa de absorción celular es alta. (Gupta, S.2016)

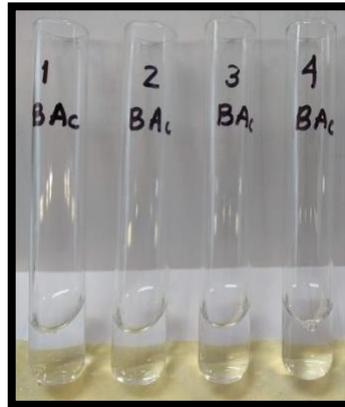


Figura 14 Sistemas inyectables óptimos

Las NP de quitosano al ser portadoras de fármacos con un amplio potencial de desarrollo, tienen la ventaja de la liberación lenta o controlada del fármaco, lo que mejora la solubilidad y la estabilidad del mismo, aumentando así la eficacia y reduciendo la toxicidad. (Gupta, S.2016). En la actualidad, generalmente se cree que el quitosano es un polímero no tóxico, así como un material seguro para el suministro de fármacos. Sin embargo, con el aumento de la densidad de carga, la toxicidad del quitosano se fortalecerá en consecuencia. (Ken, T.2010)

El método de obtención de NP que se utilizó fue la gelación iónica Figura 15 en donde la formación de NP se basa en la interacción electrostática entre los grupos amino del quitosano y los grupos de polianiones cargados negativamente, en este caso el TPP. El método implica la disolución del quitosano en ácido acético seguido de la adición de un estabilizador que en este caso se utilizó el PF-68. El quitosano es soluble en la mayoría de los ácidos diluidos. En condiciones ácidas, el quitosano se puede conferir cargas positivas, gelificación y propiedades de formación de membrana. (Jin, M.2008)



Figura 15 Prueba de gelación iónica



Esta técnica se ha utilizado para producir NP de quitosano en donde se observó que el TPP es parte fundamental, esto debido a la interacción de quitosano y TPP, en donde las partículas con carga opuesta pueden controlarse mediante el pH de solución. (Wang, J.2011). El TPP es un agente muy utilizado, cuando se agrega continuamente a una solución acuosa de quitosano con agitación constante a una temperatura moderada, dos componentes con cargas opuestas se combinarán para formar las NP. (Amidi, M.2010).

Los sistemas de NP obtenidos se sometieron a diferentes pruebas para determinar sus condiciones, los cuales se mencionan a continuación.

7.1 pH

Para determinar el pH de la formulación se realizaron pruebas en diferentes medios para poder obtener un pH similar al fisiológico, que este se encuentra entre 7.3 -7.4 aproximadamente, debido a que tener una presión osmótica similar a la de los líquidos con los que la formulación entra en contacto, evita fenómenos como la hemólisis o la plasmólisis, asimismo, si la formulación no es isotónica suele ser dolorosa y puede afectar a la concentración de fármaco (Garreta, J.2016), para ello se hicieron pruebas con los siguientes medios: PBS,SSF,BAc,BAc-SSF y Agua ajustada con NaOH, los cuales al ser expuestos a los sistemas de NP, de pH 4 aproximadamente disminuían significativamente su valor como se muestra en la Tabla 8 ,en ningún medio se observó aglomeración de los excipientes, y debido a la disminución del pH se ajustó el BAc-SSF para poder llegar al valor de pH deseado.

Tabla 8 Medios de dilución para los sistemas inyectables

Medio	PBS	SSF	BAc	BAc-SSF	Agua-NAOH
pH inicial	7.36	7.3	7.38	8.72	7.4
1	4.60	3.42	6.22	7.32	4.04
2	4.63	3.42	6.21	7.34	3.54
3	4.64	3.43	6.22	7.36	3.59
4	4.62	3.42	6.22	7.30	3.55
5	4.61	3.38	6.22	7.31	3.56
6	4.56	3.41	6.23	7.32	3.56





El BAc-SSF se realizó debido a las propiedades de la SSF, la cual también se denomina suero fisiológico o solución salina normal, es una solución estéril de cloruro de sodio diluida al 0,9% en agua. La concentración de sal del suero es similar a la de los fluidos de nuestro organismo. Por eso se considera como una sustancia isotónica y su uso no provoca daños como irritación, picores o posibles alergias, a cuál no tiene contraindicaciones y no interacciona con ningún medicamento. (Garreta, J.2016)

Para determinar la concentración del BAc-SSF se realizaron diferentes concentraciones de acetato de sodio, en el primer diseño de experimentos Tabla 9, en donde la mejor concentración es al 13 % presentando los mejores valores de pH, las concentraciones se determinaron debido a ciertas soluciones de referencia, que ya existen en el mercado como: Acetato sódico 1M FRESENIUS KABI (solución inyectable) que tiene una concentración de acetato de sodio de 13.6, tomando como referencia este porcentaje al exponerse a los sistemas de NP sobrepasa el valor de pH que se deseaba y a concentraciones menores al 12% los valores quedaban por debajo del valor de pH fisiológico, por esta razón se hicieron pruebas determinando cuatro concentraciones: 10%,12%,13% y 13.6%.

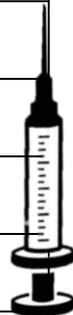
Tabla 9 pH de las soluciones inyectables en relación al porcentaje de acetato de sodio en dilución 1:50

Experimento	10%	12%	13%	13.6%
pH inicial	8.72	8.86	8.68	8.76
1	7.32	7.37	7.37	7.46
2	7.29	7.34	7.36	7.44
3	7.31	7.37	7.38	7.42
4	7.29	7.36	7.36	7.41
5	7.29	7.34	7.36	7.42
6	7.28	7.36	7.37	7.43



Las formulaciones del segundo diseño de experimentos de NP se sometieron al BAc-SSF obteniendo en la mayoría de las formulaciones valores de pH dentro del rango deseado 7.3-7.4 (Tabla 10). En estudios se ha demostrado que las NP de quitosano se caracterizan por la sensibilidad al pH y la termosensibilidad. (Pan, A.2009)

Tabla 10 pH del inyectable en dilución 1:50 en buffer de acetatos con solución salina			
Número de experimento	pH	Número de experimento	pH
1	7.32	7	7.30
2	7.30	8	7.31
3	7.30	9	7.29
4	7.32	10	7.29
5	7.31	11	7.28
6	7.30	12	7.32



7.2 Porcentaje de encapsulamiento

El porcentaje de encapsulamiento nos da a conocer el porcentaje de la concentración del principio activo que fue cargado. La mayoría de las investigaciones detalladas, enfatiza en la posibilidad de encapsulamiento que presentan las NP de quitosano y en la posibilidad de utilizar agentes modificantes que ayudan a estabilizar a las suspensiones. (Achig, B.2019). La siguiente ecuación permite determinar la eficiencia de encapsulamiento del principio activo.

$$\% EE = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Determinación del porcentaje de eficiencia de encapsulamiento

Donde:

%EE = Porcentaje de encapsulación

C_i = Concentración antes del proceso de encapsulación

C_f = Concentración después del proceso de encapsulación (Morón, G.2018)

El procedimiento utilizado se describe en el Diagrama 3 de porcentaje de encapsulamiento en donde se obtuvieron resultados del segundo diseño de experimentos donde se sometieron

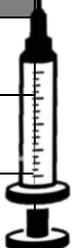
las 12 muestras a la prueba, obteniendo las absorbancias que se muestran en la Tabla 11 en donde se determina el contenido GSH en las NP poliméricas de quitosano mediante el análisis del grupo tiol (-SH) que su estructura presenta mediante el método de Ellman. Este método se basa en la reacción de los grupos tioles con el DTNB, el subproducto de esta reacción es el dianión amarillo del TNB Figura 16, la absorbancia de este subproducto se cuantifica por espectrofotometría UV-visible. (Morón, G.2018), ésta es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Díaz, A.2009), en dicho método se leyeron las muestras a una longitud de onda de 405 nm.



Figura 16 Reacción de Ellman

Tabla 11 Absorbancias de porcentaje de encapsulamiento en sistemas inyectables

1	2	3	4	5	6
0.805	0.766	0.624	0.899	0.937	0.851
0.821	0.748	0.902	0.851	0.938	0.860
0.823	0.738	0.879	0.791	0.926	0.899
7	8	9	10	11	12
0.875	0.819	0.818	0.839	0.809	0.798
0.839	0.797	0.768	0.831	0.850	0.833
0.754	0.748	0.772	0.781	0.802	0.819





Se realizó previamente una curva de calibración la cual establece una ecuación de la recta para el cálculo de la concentración del analito, es decir, el GSH. Es una representación gráfica de la relación entre la señal instrumental y la concentración de un analito. (Morón, G.2018)

A partir de los resultados de absorbancia de las distintas formulaciones, se determinó la concentración de GSH mediante la curva de calibración que se desarrolló. Una vez obtenida la concentración de GSH se procedió a aplicar la ecuación para determinar el porcentaje de encapsulamiento, como se muestra a continuación:

Ecuación de la recta $y = 0.0012x + 0.0053$

$$\text{Sistema 1} = \frac{253.2 \text{ mg GSH(peso real)} \times 1 \text{ mol GSH}}{0.05 \text{ L} \times 307.32 \text{ mg(Peso molecular GSH mg)}} = 16.4779 \text{ mmol GSH}$$

Sustituyendo en la ecuación de la recta

$$x = \frac{0.805 - 0.0053}{0.0012} = \frac{666.45 \mu\text{m}}{1000} = 0.6664 \text{ mmol}$$

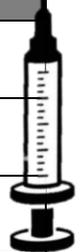
$$16.4779 \text{ mmol} - 0.6664 \text{ mmol} = 15.8115 \text{ mmol}$$

Porcentaje de encapsulamiento

$$\frac{15.8115}{16.4779} \times 100 = 95.9557 \%$$

Tabla 12 Porcentajes de encapsulamiento de sistemas inyectables

1	2	3	4	5	6
95.95	96.20	96.84	95.48	95.27	95.67
95.87	96.29	95.43	95.72	95.27	95.62
95.86	96.34	95.54	96.03	95.33	95.42
7	8	9	10	11	12
95.54	95.89	95.91	96.06	95.98	95.95
95.73	96.00	96.16	95.79	95.78	95.77
96.16	96.25	96.14	96.05	96.02	95.84



Dado que el quitosano es soluble en soluciones ácidas con un pH menor a 6.5, en el procedimiento el medio utilizado es el DMSO con un pH entre 6-8, el tratamiento de la muestra coincide en la precipitación de las NP de GSH y su centrifugación, para obtener un sobrenadante donde exista la porción libre no encapsulada del GSH. Conociendo la cantidad de GSH libre y el total, se realizan cálculos que dan finalmente como resultado el valor de porcentaje de encapsulación. (Morón, G.2018)

De acuerdo con lo anteriormente planteado en el diseño de experimentos se obtuvieron porcentajes de encapsulación, los cuales se describen en la Tabla 12 cada sistema se evaluó por triplicado, donde se presentan valores altos, todos superiores al 95%.

Como se puede observar en el diagrama de Pareto estandarizado para el porcentaje de encapsulamiento (Diagrama 5) las variables representan: A al TPP, B el tiempo de agitación, C el PF-68, AC es el efecto de la combinación de TPP-PF-68, BC el efecto de la combinación de tiempo de agitación y PF-68 y AB el efecto de la combinación de TPP y tiempo de agitación, Los signos + y - representan si tienen un efecto positivo o negativo, donde la mayoría de las variables no son significativas para el porcentaje de encapsulamiento a diferencia del TPP con un efecto positivo, y la combinación de TPP con PF-68 con un efecto negativo.

A pesar de que el TPP tiene un buen efecto en la formulación, la fuerza iónica del medio puede influir sobre el hinchamiento de las partículas, ya que la presencia de Na en el medio interactúa iónicamente con los O del TPP (Rodríguez, N.2010), esto puede hacer que el PF-68 no pueda cumplir su papel como estabilizador en las NP y afectando de esta manera el encapsulamiento.

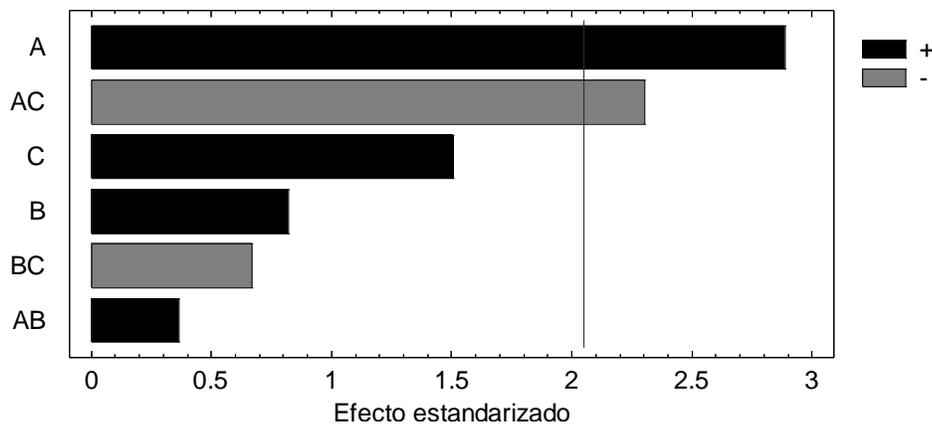
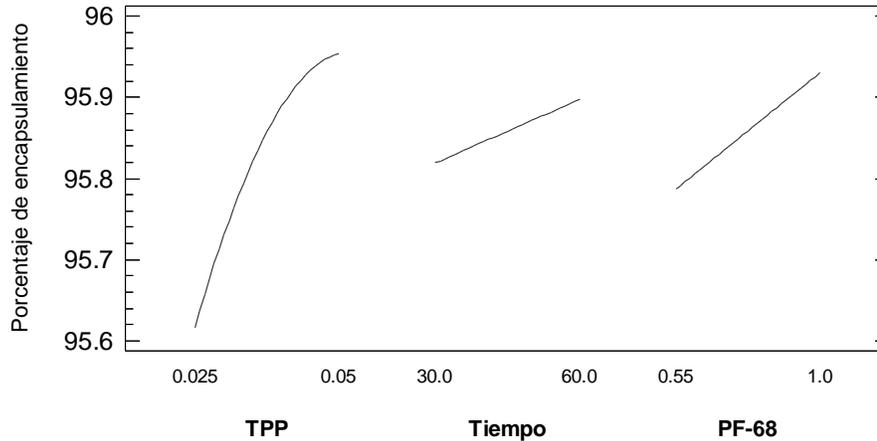


Diagrama 5 Diagrama de Pareto estandarizado para porcentaje de encapsulamiento

En la Gráfica 1 se indica que a mayor concentración de TPP y PF-68 aumenta el porcentaje de encapsulamiento, el TPP al ser una variable que influye en el porcentaje de encapsulamiento se puede observar en la gráfica que el efecto no es lineal lo que quiere decir que en algún punto se mantendrá en un determinado porcentaje y ya no exista aumento en dicho parámetro, por otro lado la concentración de Pluronic F-68 y el tiempo de agitación



si se demuestra que en el aumento de estos parámetros aumenta el porcentaje de encapsulamiento.



Gráfica 1 Efectos principales para porcentaje de encapsulamiento

7.3 Porcentaje de hemólisis

En la formulación de inyectables se debe tomar en cuenta que las soluciones sean isotónicas, ya que como se mencionó anteriormente puede producir hemólisis y esto puede llegar a causar problemas. La inyección intravenosa de quitosano excesivo puede causar la muerte debido a la coagulación de la sangre. (Ken, T.2010) en esta prueba se debe tomar en cuenta desde la preformulación hasta el control de calidad y en este caso hasta la formulación, con el fin de elegir los excipientes adecuados.

Para poder estimar la capacidad de hemólisis provocada por la nanosuspensión de nanopartículas en estudio, se utilizó el procedimiento descrito en el Diagrama 4 (Procedimiento de porcentaje de hemólisis), sometiendo las 12 formulaciones del segundo diseño, así como también la elaboración de los controles negativo y positivo Figura 17, en donde las 12 formulaciones se realizaron por triplicado y se obtuvieron las absorbancias que se muestran en la Tabla 13. Para determinar el porcentaje de hemólisis se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{A_t - A_s}{A_c} \times 100$$

Donde:

At: Absorbancia del sobrenadante obtenido de la muestra prueba(inyectable)

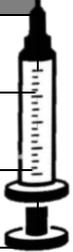
As: Absorbancia del sobrenadante obtenido de la SSF (-)



Ac: Absorbancia del sobrenadante obtenida de hemoglobina de la lisis completa de las células (+)

Tabla 13 Absorbancias obtenidas por triplicado de las 12 formulaciones en estudio para calcular el porcentaje de hemólisis en los sistemas inyectables.

1	2	3	4	5	6
0.044	0.043	0.044	0.041	0.041	0.046
0.042	0.042	0.041	0.041	0.040	0.040
0.041	0.043	0.042	0.041	0.040	0.041
7	8	9	10	11	12
0.046	0.041	0.046	0.040	0.041	0.041
0.048	0.041	0.039	0.049	0.040	0.040
0.041	0.042	0.040	0.040	0.040	0.041



Como se muestra en el procedimiento, para el control negativo se utilizó SSF con un pH inicial de 7.4, en ese medio los eritrocitos no sufren hemólisis debido a que las condiciones en las cuales se encuentran son similares a la sangre.

Por otro lado, en el control positivo se necesita que exista una ruptura total de los eritrocitos al 100 %, esto debido a que la hemoglobina contenida en las células sea liberada por completo y se pueda determinar la hemólisis completa, para esta prueba se utilizó solución de tritón al 1 %, el cual es un tensoactivo no iónico de polioxietileno que se usa con mayor frecuencia como componente de tampones de lisis celular u otras soluciones destinadas a extraer y solubilizar proteínas. (Thermo Fisher Scientific Inc.,2020). Esta solución es similar al detergente, pero a diferencia de que es menos viscoso, por lo tanto, más fácil de pipetear y dispensar con precisión. Por su actividad tensoactiva, ésta al producir un cambio en la tensión superficial de la membrana del glóbulo rojo produce la ruptura de las membranas y por consecuencia la liberación de hemoglobina. (Piña, S.2008)

Tabla 14 Absorbancias de control de porcentaje de hemólisis en sistemas inyectables

Control positivo	Control negativo
0.816	0.040
0.833	0.039
0.842	0.040
x= 0.830	x= 0.039

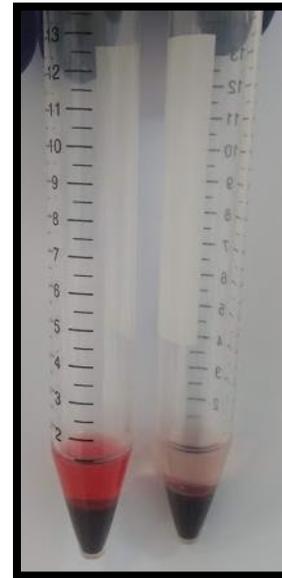
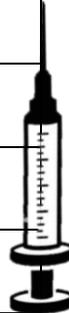


Figura 17 Control positivo y negativo de prueba de hemólisis

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

$$\text{Sistema 1} = \frac{0.044-0.039}{0.830} \times 100 = 0.6024 \%$$

Al utilizar dentro de la formulación BAc-SSF, se determinó en investigaciones que al contener cloruro de sodio en la formulación (0.9%) la hemólisis se obtiene en niveles mínimos permitiendo tener una isotonicidad considerable y por lo tanto porcentajes de hemólisis bajos. Un porcentaje de hemólisis inferior al 2 % es considerado no-hemolítico, considerando el valor del 100 % para la cantidad total de hemoglobina presente en los eritrocitos añadidos. (ENAC.2020). En la Tabla 15 se muestran los porcentajes de hemólisis obtenidos, los cuales son menores al 2% por lo tanto en ningún sistema se presenta hemólisis.

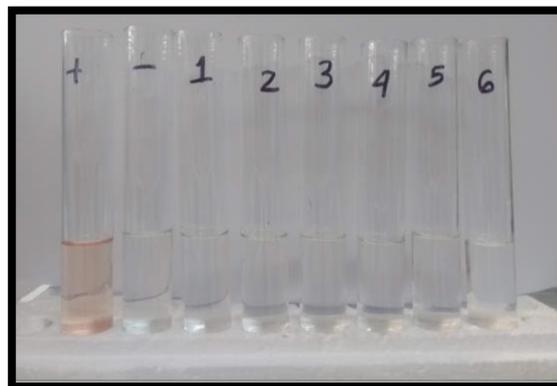


Figura 18 Prueba de hemólisis (Sistemas 1-6)

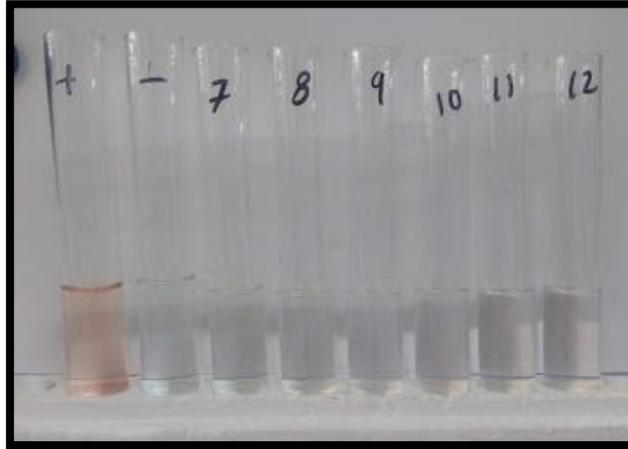
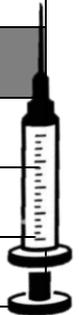


Figura 19 Prueba de hemólisis (Sistemas 7-12)

Tabla 15 Porcentaje de hemólisis en sistemas inyectables

1	2	3	4	5	6
0.6024	0.4819	0.6024	0.2409	0.2409	0.8433
0.3614	0.3614	0.2409	0.2409	0.1204	0.1204
0.2409	0.4819	0.3614	0.2409	0.1204	0.2409
7	8	9	10	11	12
0.8433	0.2409	0.8433	0.1204	0.2409	0.2409
1.0843	0.2409	0	1.2048	0.1204	0.1204
0.2409	0.3614	0.1204	0.1204	0.1204	0.2409



En el Diagrama 6 se observan los efectos estandarizados para porcentaje de hemólisis las variables representan: A al TPP, B el tiempo de agitación, C el PF-68, AB el efecto combinado de TPP con tiempo de agitación, AC el efecto combinado de TPP y PF-68, BC el efecto combinado de tiempo de agitación y PF-68 y AA. Los signos + y – representan si tiene un efecto positivo o negativo en el porcentaje de hemólisis, donde se puede ver que el TPP es de las variables que más se acerca al porcentaje permitido, el cual es del 2% pero de igual forma no es significativa por lo tanto no influye este parámetro en el espacio de diseño establecido.

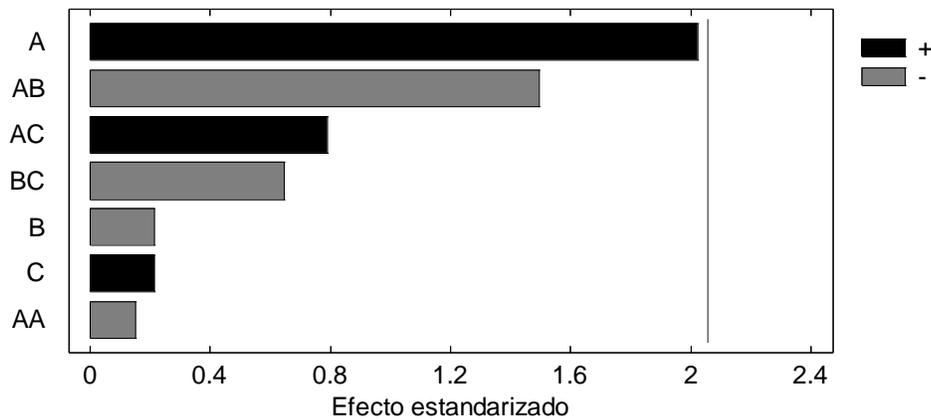
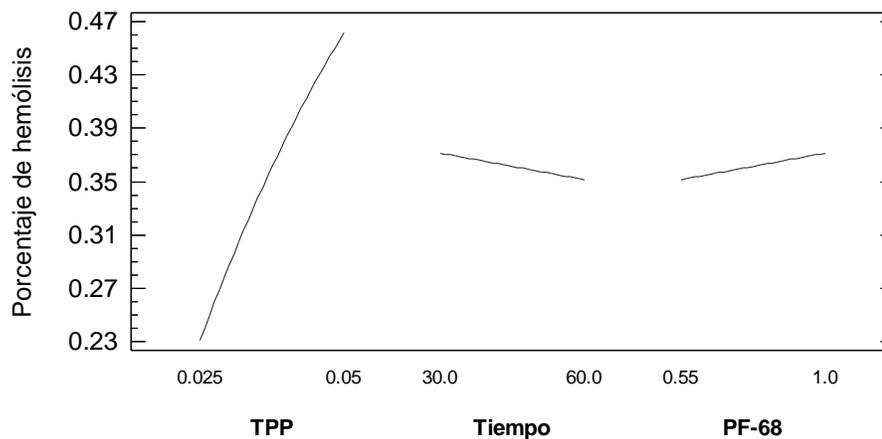


Diagrama 6 Diagrama de Pareto estandarizado para porcentaje de hemólisis

En la Gráfica 2 se indica que a mayor cantidad de TPP aumenta minimamente el porcentaje de hemólisis, mientras que el tamaño de partícula y la concentración de PF-68 no se ven en gran medida afectados, esto se puede observar debido a que su línea es casi horizontal, lo cual nos indica que el valor de la pendiente se acerca a 0 por lo tanto no influye en el porcentaje de hemólisis.



Gráfica 2 Efectos principales para porcentaje de hemólisis

7.4 Tamaño de partícula

Como ya se mencionó anteriormente al desarrollar una nanosuspensión se espera que el tamaño de partícula sea menor a 500 nm. Para determinar los tamaños de partícula de los distintos sistemas se utilizó el Zetaziser, el cual utiliza la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés Dynamic Light Scattering), sirve para medir el tamaño de partícula en el rango submicrónico. DLS mide la velocidad del movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de la partícula. El movimiento browniano es un movimiento al azar de las partículas.



debido al “golpeteo” de las moléculas del solvente alrededor de ellas. Entonces, esta determinación puede realizarse sobre partículas en suspensión líquida. A mayor tamaño, menor movimiento. (Morilla, M.2018)

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de tamaños de partícula de los 12 sistemas por triplicado, dando como resultado en la mayoría de los sistemas tamaños aceptables menores a 500 nm, a excepción de los sistemas 1, 4 y 7, donde se puede atribuir el incremento del tamaño de partícula al procedimiento por parte del formulador ya que si en los sistemas el goteo se realizó a una velocidad mayor puede existir una aglomeración por parte de los excipientes, u otro factor por el que se podría influenciar, como se mencionó en porcentaje de encapsulamiento, es la fuerza iónica del medio, que puede influir sobre el hinchamiento de las partículas, ya que la presencia de Na en el medio interactúa iónicamente con los O del TPP, de igual forma el Cl va a interactuar con la amina protonada del quitosán. Por lo tanto, estos iones competirían por el TPP y quitosán, debilitando las interacciones entre el quitosán y el TPP, lo que se traduce en una disminución del entrecruzamiento y por lo tanto la aparición del hinchamiento, debido a que se produciría un aumento en la separación de las cadenas del quitosano. (Rodríguez, N.2010)

Tabla 16 Tamaños de partícula en sistemas inyectables

Experimento	2° diseño											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TPP	0.05	0.05	0.0375	0.0375	0.025	0.025	0.05	0.05	0.0375	0.0375	0.025	0.025
PF-68	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1	1	1
Tiempo(min)	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60	30	60
Tamaños de partícula (nm)	657.2	101.1	184.9	2055	65.13	76.44	1272	75.28	65.74	126.3	69.92	153.6
	486.85	105.5	173.15	1205.46	64.18	34.84	435.53	71.61	63.55	117.72	68.83	150.29
	827.54	221.3	196.64	2904.53	189.3	99.57	2108.46	78.94	67.92	134.87	71.00	156.90



En el diagrama de pareto estandarizado para tamaño de partícula (Diagrama 7), las variables representan A al TPP, B el tiempo de agitación, C el PF-68, AB la combinación de efectos entre TPP y tiempo de agitación, AC la combinación de efectos entre TPP y PF-68. Los signos + y – representan si tiene efecto negativo o positivo en el tamaño de partícula, pero ninguno de los efectos es significativo ya que sus cambios son mínimos.

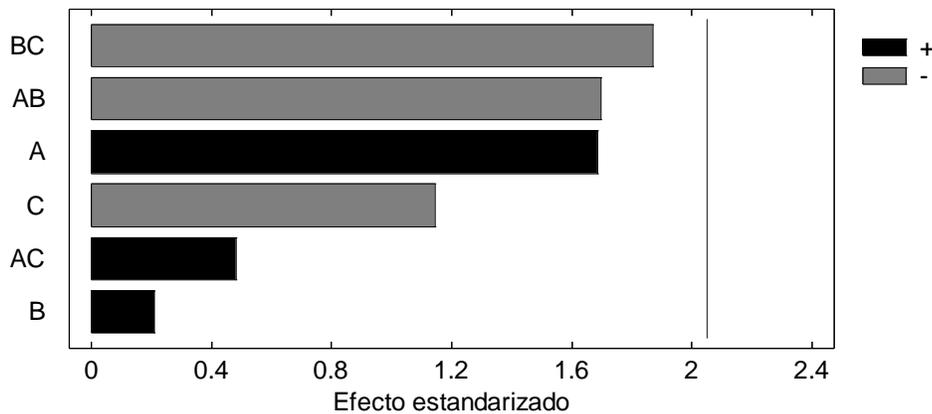
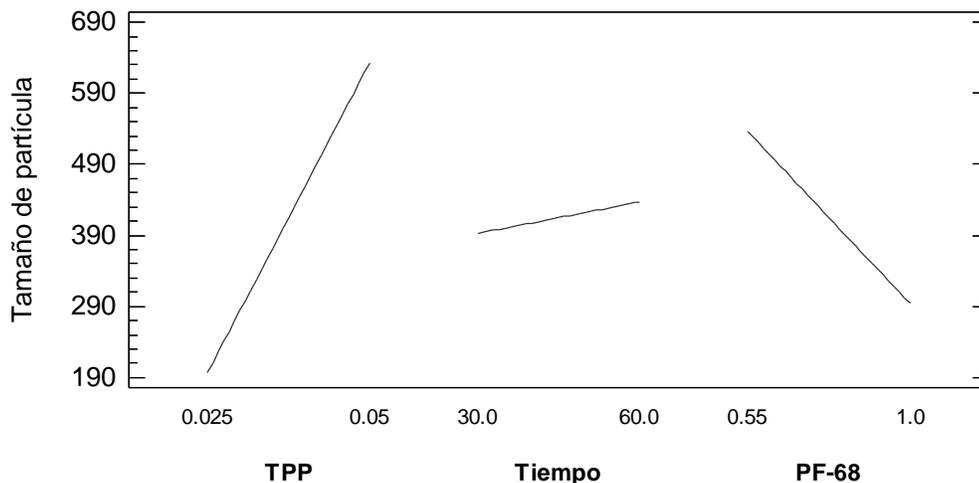


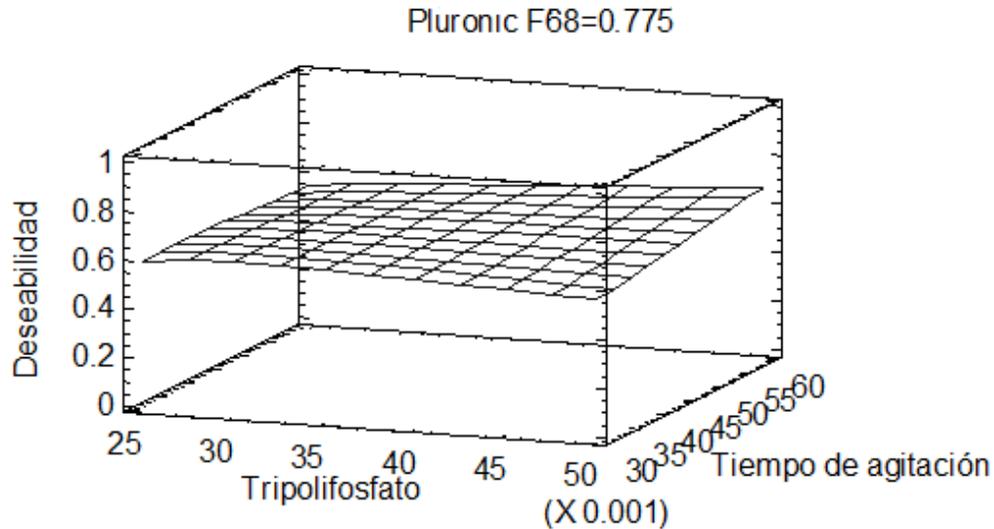
Diagrama 7 Diagrama de Pareto estandarizado para tamaño de partícula

En la Gráfica 3 se muestra que el tiempo de agitación no influye en el tamaño de partícula al permanecer casi constantes a cualquier tiempo mientras que a mayor concentración de TPP incrementa el tamaño de partícula a diferencia del PF-68 en el cual a mayor concentración el tamaño de partícula disminuye.



Gráfica 3 Efectos principales para tamaño de partícula

En la gráfica de superficie de respuesta (Gráfica 4) se muestran las variables estudiadas, donde se mide la optimización de los sistemas (disminuir el tamaño de partícula, obtener el máximo porcentaje de encapsulamiento y el mínimo porcentaje de hemólisis) donde para el TPP se necesita utilizar la mínima concentración y del PF-68 una concentración intermedia, en este caso se determinó que la cantidad a utilizar debería ser 0.775, el tiempo de agitación mínimo (30 min) ya que este no afecta en gran medida las respuestas, este tipo de graficas nos permite obtener un panorama de los factores en conjunto y como sus variaciones influyen en la respuesta. (Herrera, J.2017)



Gráfica 4 Superficie de respuesta estimada

7.5 Optimización de sistemas inyectables

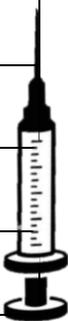
Se realizaron dos diseños de experimentos y posteriormente la optimización de los mismos, en el primer diseño se variaron las concentraciones de TPP (0.05, 0.0375 y 0.025), así como su tiempo de agitación (30 y 60 min), donde se obtuvieron buenos resultados de pH, para verificar si tampoco el PF-68 afectaba en los resultados se realizó el segundo diseño de experimentos en donde además de TPP y tiempo de agitación también se varió la concentración de PF-68 (0.5 y 1), en este diseño además de pH se estudiaron las demás variables a evaluar como son: porcentaje de encapsulamiento, tamaño de partícula y porcentaje de hemólisis.

Los valores de los sistemas optimizados se obtuvieron a partir de los resultados de los diseños anteriores, donde se puede observar que a la mínima concentración de TPP la formulación funcionaba adecuadamente, por lo cual se manejó la concentración de 0.025 en las primeras 3 formulaciones y en el cuarto una concentración de 0.05 como concentración máxima para poder comparar con los sistemas anteriores, en el caso del PF-68 en el segundo diseño de experimentos se determinó que la concentración conveniente a utilizar es una intermedia entre las concentraciones proporcionadas, la cual es de 0.075, en cuanto al tiempo de agitación se determinó que el mejor tiempo de agitación son 30 minutos y de igual forma que con el TPP se determinaron un valor máximo (60 min) y un valor intermedio (45 min) para poder comparar los resultados de la optimización.

En las pruebas de optimización de pH, en las diferentes formulaciones los cuatro sistemas evaluados quedaron en el rango deseado, (Tabla 14), debido a este parámetro cualquiera de las cuatro formulaciones es aceptable en referencia al pH.

Tabla 17 pH en sistemas inyectables optimizados

Sistema	pH
1	7.32
2	7.30
3	7.31
4	7.33



Como se observa en la Tabla 18, para las formulaciones optimizadas, de la misma forma se obtuvieron las absorbancias para determinar su respectivo porcentaje de encapsulamiento.

Tabla 18 Absorbancias de porcentaje de encapsulamiento en sistemas inyectables optimizados

1	2	3	4
1.366	1.339	1.339	1.361
1.355	1.349	1.340	1.345
1.285	1.337	1.331	1.344



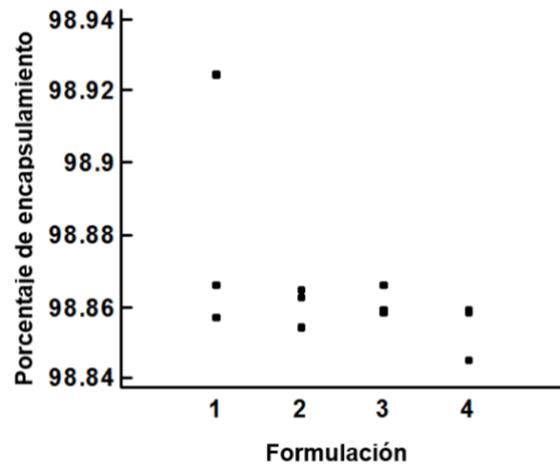
Teniendo las condiciones óptimas en referencia al porcentaje de encapsulamiento éste mejoro en las formulaciones obteniendo valores mayores al 98%. Gráfica 5 donde se nota que las 4 formulaciones realizadas tienen buenos porcentajes de encapsulamiento y no existe gran diferencia. Aquí se puede ver una mejora en el porcentaje de encapsulación en comparación con el segundo diseño de experimentos. Este aspecto como ya se mencionó en el porcentaje de encapsulamiento puede deberse al hinchamiento de las partículas en



este caso al tener las cantidades óptimas en la formulación se obtuvieron mejores porcentajes de encapsulamiento.

Tabla 19 Porcentaje de encapsulamiento en sistemas inyectables optimizados

1	2	3	4
98.8567	98.8625	98.8589	98.8450
98.8658	98.8539	98.8583	98.8585
98.9245	98.8644	98.8657	98.8592



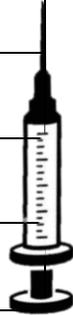
Gráfica 5 Dispersión de optimización (porcentaje de encapsulamiento)

Para la optimización de porcentaje de hemólisis se sometieron los cuatro sistemas a la prueba, y de la misma forma se obtuvieron de cada sistema por triplicado las absorbancias, (Tabla 20) tanto de los sistemas como sus respectivos controles negativo y positivo. (Tabla 21)

Tabla 20 Absorbancias de porcentaje de hemólisis en sistemas inyectables optimizados

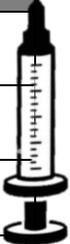
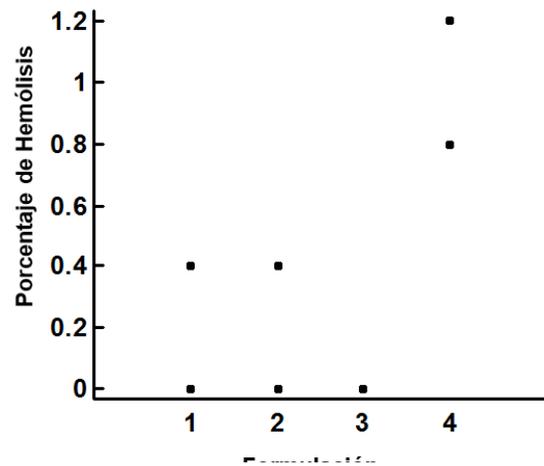
1	2	3	4
0.043	0.044	0.043	0.045
0.043	0.043	0.043	0.046
0.044	0.044	0.043	0.046

Tabla 21 Absorbancias de control de porcentaje de hemólisis <i>optimizados</i> en sistemas inyectables	
Control positivo	Control negativo
0.242	0.043
0.250	0.043
0.260	0.043
X= 0.250	X= 0.043



Al realizar el porcentaje de hemólisis de los sistemas, todos presentaron un porcentaje menor al 2%, entrando en el rango permitido, (Tabla 22) incluso en la optimización teniendo lecturas sin diferencia de los controles y teniendo un porcentaje nulo de hemólisis, lo que de igual forma que en el segundo diseño, ningún sistema presenta hemólisis, por lo tanto los cuatro sistemas son funcionales, a diferencia de los primeros tres sistemas el porcentaje del cuarto sistema es mayor(Gráfica 6), esto se puede atribuir a la cantidad mayor de TPP que tiene las formulación.

Tabla 22 Porcentaje de hemólisis en sistemas inyectables optimizados			
1	2	3	4
0	0.4	0	0.8
0	0	0	1.2
0.4	0.4	0	1.2

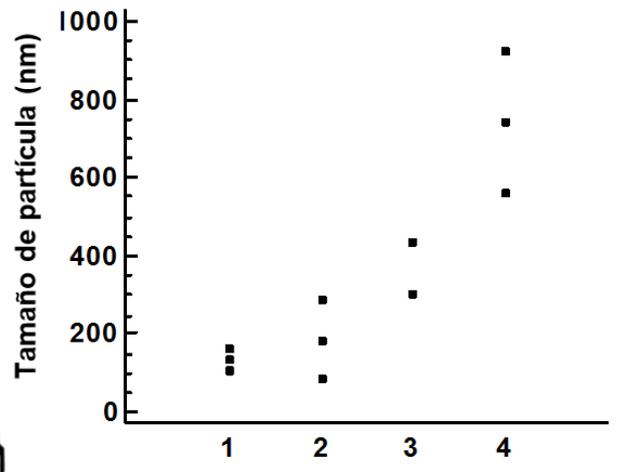
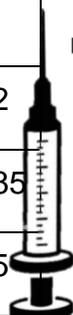
Gráfica 6 Dispersión de optimización(porcentaje de hemólisis)

Al determinar el tamaño de partícula de los 4 sistemas por triplicado (tabla 23) los primeros tres sistemas presentan buenos tamaños de partícula siendo estos menores a 500 nm, a pesar que los tres sistemas son efectivos en el tamaño de partícula los tamaños del primer sistema son más semejantes entre sus respectivas lecturas a comparación de los sistemas



2 y 3,(Gráfica 7) y por otro lado los tamaños de partícula del cuarto sistema supera los 500 nm, como se mencionó anteriormente en el tamaño de partícula a mayor cantidad de TPP aumenta el tamaño de partícula.

Tabla 23 Tamaño de partícula de sistemas optimizados				
Sistema	1	2	3	4
TPP	0.025	0.025	0.025	0.05
PF-68	0.775	0.775	0.775	0.775
Tiempo(min)	30	45	60	60
Tamaños de partícula	132.6	184.78	433.84	563.2
	158.9	83.22	300.5	741.85
	106.3	286.3	303.1	920.5



Gráfica 7 Dispersión de optimización (tamaño de partícula)



CONCLUSIONES



e investigaron las características y funciones de los excipientes utilizados en las formulaciones, así como efecto al combinarse en las mismas, así como los procedimientos y métodos que se deben aplicar a una formulación parenteral.

A partir del diseño de experimentos y de optimización se desarrollaron diversas formulaciones, desarrollando NP por el método de gelación iónica, variando la concentración de sus excipientes para medir aspectos como pH, porcentaje de encapsulamiento, porcentaje de hemólisis y tamaño de partícula, las cuales cumplen con los criterios de calidad, que deben tener las formulaciones parenterales.

Las concentraciones de las formulaciones fueron obtenidas de los diseños de experimentos previos, donde se manejaron diferentes valores para llegar a la optimización los cuales fueron: TPP (0.025, 0.0375 y 0.5), PF-68 (0.5, 0.075 y 1) y tiempo de agitación (30, 45 y 60 minutos). Como formulación final se obtuvo una nanosuspensión transparente, la cual no presenta ningún tipo de precipitado o aglomerado, con la siguiente cantidad de excipientes: 0.025 g TPP, 0.775 PF-68, 0.165 g de quitosán y 0.5 g de GSH realizando el sistema de nanopartículas a un tiempo de 30 minutos y llevándolo a una dilución en BAc-SSF 1:50. Tanto en el segundo diseño como en la optimización se obtuvieron valores aceptables de pH, los cuales entran dentro del rango aceptado (7.3-7.4) para ser una formulación funcional al tener un pH similar al fisiológico.



Evaluando el porcentaje de encapsulamiento, se obtuvieron porcentajes superiores al 95% en el segundo diseño experimental, los cuales mejoraron al momento de obtener los valores optimizados de los excipientes debido a diferentes propiedades de los mismos, obteniendo porcentajes superiores al 98%.

Como criterio de las formulaciones parenterales, estas deben cumplir con la isotonicidad, en donde al realizar la prueba de porcentaje de hemólisis ninguna formulación presentó porcentajes mayores al permitido, manteniéndose todos menores al 2 %.

Los tamaños de partícula en las diferentes formulaciones variaron debido a las condiciones que fueron expuestas, determinando como mejores, las formulaciones que presentaron tamaños de partícula menores a 500 nm ya que estos ayudan en la absorción al momento de ser administradas.

Como parte de la optimización se eligió la formulación 1 debido a que ésta presenta valores aceptables de los parámetros evaluados, y a diferencia de las formulaciones 2 y 3 en las cuales sus valores son muy similares obtiene los resultados en un menor tiempo de agitación lo cual es más conveniente al momento de formular.



PERSPECTIVAS



Realizar conteo de partículas subvisibles para verificar la ausencia de estas en la formulación.

- Llevar a cabo pruebas de estabilidad de la formulación para evaluar a que condiciones puede estar expuesto, como temperatura, luz o humedad y que tiempo de vida tiene la formulación.
- Realizar la prueba de hemólisis en sangre animal para verificar si la formulación puede servir para uso veterinario.
- Hacer estudios in vivo en un modelo animal para evaluar la eficacia de la formulación obtenida y así poder verificar la biodisponibilidad de la misma y/o reacciones adversas.
- Escalar la formulación para llegar a obtener un registro sanitario de la formulación.



REFERENCIAS

- ❶ Achig,B.(2019). Síntesis de nanopartículas de quitosano a partir de quitina de exoesqueleto de camarón para encapsulamiento de colorantes naturales (Tesis de licenciatura) Universidad central de Ecuador, Ecuador.
- ❷ Álvarez,A., Espinar,F.,Méndez,J.(2016). Cap 7 Sistemas dispersos heterogéneos: emulsiones y suspensiones. En Pacheco, R. del libro Tatado de tecnología farmacéutica volumenI:Operaciones básicas(pp 227-263).Madrid: Síntesis
- ❸ Álvarez,C.,Concheiro,Á.(2016). Cap.6 Dispersiones coloidales y geles. En Pacheco, R. del libro Tatado de tecnología farmacéutica volumenI:Operaciones básicas(pp 297-226).Madrid: Síntesis
- ❹ Amidi, M., Mastrobattista, E., Jiskoot, W., Hennink,W. (2010) . Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. [versión electrónica]Adv Drug Deliv Rev. Vol 62 (1),59-82
- ❺ Ando,H.,Radebaugh,G.(2000).Cap.38 Preformulación.En Remington del libro Farmacia(pp 815-837).Buenos aires:Médica panamericana
- ❻ Ayala, A.(2014). Validación del método analítico por espectrofotometría UV/VIS para la cuantificación de albendazol en suspensiones comerciales (Tesis de Licenciatura). Universidad nacional de trujillo,Perú.
- ❼ Billany,M.(2016). Cap. 23 Suspensiones y emulsiones. En Aulton,E. del libro Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas (pp 114-140). España: Elsevier
- ❽ Bruxel, F. (2012). Nanoemulsiones como sistemas de liberación parenteral de fármacos. Marzo 3, 2019, de Facultad de Farmacia, Universidad Federal de Río Grande del Sur Sitio web: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900023



- ⓧ Díaz, A., Ruiz, A., Reyes, E. (2009). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. Recuperado de <http://www.slideshare.net/asaor/espectrofotometria-presentation>
- ⓧ Doménech, J. (2013). Tratado general de biofarmacia y farmacocinética. Madrid España: Síntesis
- ⓧ Dudhani, A., Kosaraju, S. (2010). Bioadhesive chitosan nanoparticles: preparation and characterization. "[versión electrónica]Carbohydr Polym. Vol. 81 (2), 243–251.
- ⓧ ENAC. (2020). Pruebas de toxicología, prueba de hemólisis. 29 de mayo del 2020, de Instituto valenciano de microbiología Sitio web: <https://www.ivami.com/es/evaluacion-biologica-de-dispositivos-medicos/2457-pruebas-de-toxicologia-hb-evaluacion-biologica-de-productos-sanitarios-hemocompatibilidad-b-prueba-de-hemolisis-b-une-en-10993-4-seleccion-de-ensayos-para-las-interacciones-con-la-sangre-metodo-astm-f756-03-b-acreditada-por-enac-b>
- ⓧ Fernández, J., García, C. (2008) Cap. 16 Glutación. En Königsberg, M del libro Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas (pp 253-267). Manual moderno, México.
- ⓧ Fernández, K. (2011). Desarrollo de un polvo con microcápsulas de antioxidante a base de zarzamora, uva, arándano y fresa para la preparación de galletas (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- ⓧ Garreta, J., Millán, S. (2016). Cap. 5 Formas de administración parenteral. En Pacheco, R. del libro Tratado de tecnología farmacéutica volumen III: Formas de dosificación (pp 157-196) Madrid: Síntesis
- ⓧ Gupta, S., Jassal, P., Chand, N. (2016). Chitosan nanoparticles: synthesis and their applications [versión electrónica]. Journal of basic and applied engineering research. Volumen 3(8), 686-689.
- ⓧ Hernández, G. (2011). Tratado de medicina farmacéutica. México: Medica panamericana
- ⓧ Herrera, J. (2017). Desarrollo de una nanosuspensión de un derivado de carbamatos (LQM 919) para el tratamiento de garrapatas en vacas (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- ⓧ Hopp, V., Klaus, H., Loos, G., Mayer, H., Merz, F., Naundorf, H., Stärz, E., Winterer, H. (2014). Fundamentos de tecnología química. Bogotá: Reverté
- ⓧ Jin, M., Hu, Q. (2008) Characterization and application in bioadhesive drug delivery system [versión electrónica]. Centr South Pharm. Vol. 6 (3), 324–327.
- ⓧ Kean, T., Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. [versión electrónica.] Adv Drug Deliv Rev. Vol. 62 (1), 3-11.
- ⓧ Lamas, A. (2013). Desarrollo de sistemas micro y nano particulares de liberación sostenida para administración parenteral (Tesis de Licenciatura) Universidad Complutense, Madrid
- ⓧ Lares, C. (2008). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. Iberoamericana de polímeros. 4(2). recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Cristobal_Larez_Velasquez/publication/235791932_ALGUNOS_USOS_DEL_QUITOSANO_EN_SISTEMAS_ACUOSOS/links/09e415138b27c9dc37000000.pdf



- Ⓣ López, C. (2016). Estabilidad de los preparados estériles. Curso precongreso farmacotecnia de preparados estériles. Recuperado de : <https://docplayer.es/47543078-Carmen-lopez-cabezas-hospital-clinic-barcelona-curso-precongreso-farmacotecnia-de-preparados-esteriles.html>
- Ⓣ López, R. (2013). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano. Marzo 6, 2019, de Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela Sitio web: <https://analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/990/1024>
- Ⓣ López, C., Fernández, M., Fuentes, M. (2016). Cap 4 Micro y nanoencapsulación de fármacos. En Pacheco, R. del libro Tratado de tecnología farmacéutica volumen II: Operaciones básicas (pp 85-117). Madrid: Síntesis
- Ⓣ López, H., López C., Múzquiz, E., Hernández, F., Hernández, C. (2016). Nanopartículas: aplicaciones actuales y futuras en la industria alimentaria. Ciencia cierta, 48. Recuperado de : <http://www.cienciacierta.uadec.mx/articulos/cc48/Nanoparticulas.pdf>
- Ⓣ Martínez, J. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Mayo 4, 2019, de Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Sitio web: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2011/reb112c.pdf>
- Ⓣ Martínez, M. (enero-marzo, 2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis, 40, 45-54. agosto 24, 2019, De redalyc.org Base de datos.
- Ⓣ Martínez, M., Barrado, D., Zubillaga, M., Hager, A., Paoli, T., Boccio, J. (2006) Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 40(1). Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53540108.pdf>
- Ⓣ Martínez, R. (2017). Tratado de Tecnología Farmacéutica. Madrid España: Síntesis.
- Ⓣ Martínez, J., Victoria, P., Juárez, M. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Revista de educación bioquímica. 30(2). Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2011/reb112c.pdf>
- Ⓣ Mendoza, L. (2006). Química general. Manual de prácticas de laboratorio. República dominicana: Búho
- Ⓣ Montgomery, D. (2004) Cap. 1 Introducción del libro Diseño y análisis de experimentos (pp 1-19), México: Limusa Wiley
- Ⓣ Morilla, M. (2018). Técnicas de determinación de tamaño y potencial Z recuperado el día 23 de mayo del 2020 de: <http://nanobiotecnologia.blog.unq.edu.ar/wp-content/uploads/sites/115/2018/03/Clase-Determinacion-tama%C3%B1o-y-potencial-Z.pdf>
- Ⓣ Morón, G. (2018) Determinación de actividad antifúngica de nanopartículas poliméricas de quitosano cargadas con Ácido S-nitrosomercaptosuccínico sobre candida albicans y candida glabrata (Tesis de licenciatura) Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima Perú



- Ochoa, D., Alegre, E., Torrado, J. (2016). Cap.9 Estudios de preformulación. En Pacheco, R. del libro Tratado de tecnología farmacéutica volumen II: Operaciones básicas (pp 267-292). Madrid: Síntesis
- Omar Guaymas. (2020). Breve fundamento de técnicas de purificación y caracterización de sólidos. 25 de junio del 2021, de Universidad Nacional de La Plata Sitio web:
https://www.ing.unlp.edu.ar/catedras/U0904/descargar.php?Secc=0&id=U0904&id_in_c=46504
- Osorio, R. (2009). Manual de técnicas de laboratorio químico. Colombia: Universidad de Antioquia .
- Pan, A., Wu, B., Wu, J. (2009) Chitosan nanoparticles crosslinked by glycidoxypolytrimethoxysilane for pH triggered release of protein. Chin Chem Lett. Vol. 20 (1), 79–83.
- Peris, J., Torres, F. (2013) Cap.2 Administración de fármacos por vía parenteral. En Doménech, J. del libro Tratado general de Biofarmacia y farmacocinética (pp 57-75)
- Piña, S. (2008). Optimización de un método in vitro para evaluar el potencial hemolítico de vehículos para inyectables (Tesis de licenciatura). Universidad nacional Autónoma de México, México
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., De Tata, V., Casini, A. F. (octubre de 2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem Pharmacol. 66 (8). Recuperado de:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295203005045?via%3Dihub>
- Elejalde, J. (Junio de 2011). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. An. Med. Interna. 18(6). Recuperado de:
http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992001000600010
- Ramos, Y. Padilla, H Camilo, C., López, D., Quintana, L., Corrales, H., Moscote, L. (2017). N-Acetilcisteína en neuroprotección y lesión traumática cerebral: revisión de la literatura. Revista chilena de neurocirugía. 43(1). Recuperado de:
https://www.neurocirugiachile.org/pdfrevista/v43_n2_2017/ramos-villegas_p166_v43n2_2017.pdf
- Reinier Oropesa Núñez. (2011). Las nanopartículas como portadores de fármacos: características y perspectivas. CENIC ciencias biológicas, 43, sin p.p.
- Rodríguez, N., Valderrama, A., Alarcón, L., López, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. Revista sociedad química de Perú. [versión electrónica], Vol. 76(4), 335-354
- Rodríguez, R. (2009). Estudios de preformulación y formulación para una suspensión oral de albendazol, evaluando el efecto de agentes humectantes y suspensiones (tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Rojas, C., Quesada, M., Esquivel, N. (2019). Intoxicación por acetaminofén: diagnóstico y abordaje en el adulto. Revista Médica Sinergia. 4(7). Recuperado de:
<https://www.medigraphic.com/pdfs/sinergia/rms-2019/rms197d.pdf>
- Roter, O., Tendeja, K., Arkhelyuk, A., Davidenko, I., Fediv, V. (2014) Preparación de loa de nanopartículas de quitosano con glutatión para disminuir la lesión



- por isquemia-reperusión. Revista Internacional de Advanced Ingeniería y nanotecnología.1(6). Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/320172233_Preparation_of_chitosan_nano_particles_loaded_with_glutathione_for_diminishing_tissue_ischemiareperfusion_injury
- Ⓟ Sánchez,V.(2018). Estudio del entorno general de la industria alimenticia (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,México.
 - Ⓟ Sánchez,V.,Méndez,N.(2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. Investigación médica sur.20(3). Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2013/ms133e.pdf>
 - Ⓟ Sanz,M.,Álvarez,M.,Álvarez,I.(2016) Cap.6 Filtración En Pacheco, R. del libro Tatado de tecnología farmacéutica volumen II:Operaciones básicas(pp 166-199).Madrid:Síntesis
 - Ⓟ Soutter, W. (2013). Nanopartículas de Chitosan. Propiedades y Aplicaciones. Marzo 3, 2019, de AZO NANO Sitio web: <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3232>
 - Ⓟ Suárez,A.,Durán.(2016). Cap.7 Esterilización. En Pacheco, R. del libro Tatado de tecnología farmacéutica volumen II:Operaciones básicas(pp 201-244).Madrid:Síntesis
 - Ⓟ Tanarro, C.(2009). Nanopartículas: ¿un riesgo pequeño? Octubre 7 2018, de Centro Nacional de Nuevas Tecnologías. Madrid. INSHT Sitio web: http://www.ladep.es/ficheros/documentos/Nanopart%EDculas_un%20peque%F1o%20riesgo_INSHT_2009.pdf
 - Ⓟ Téllez, V. (2017). Estudio de la capacidad antigenotóxica de las nanopartículas d quitosán-GSH en linfocitos humanos (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México, México
 - Ⓟ Thermo Fisher Scientific Inc.. (2020).Solución de detergente Triton X-100 Surfact-Ams. 04 de junio del 2020, de Thermo scientific Sitio web: <https://www.fishersci.es/shop/products/triton-x-100-detergent-surfact-ams-solution/p-6014005>
 - Ⓟ Turco,S.(2003).Cap.42 Mezclas intravenosas. En Gennaro, A.del libro Remington: Farmacia (pp 938-942)
 - Ⓟ Urrejola, M., Soto,L.,Zumarán,C., Peñaloza,J., Álvarez,B., Fuentevilla,I., Haidar,Z.(2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa.(Febrero 13,2020). <https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v36n4/0717-9502-ijmorphol-36-04-01463.pdf>
 - Ⓟ Vila, J.(2001) Tecnología farmacéutica.Madrid:Síntesis
 - Ⓟ Vulcano, D. (2013). Homeostasis del glutatión. Mayo 4, 2019, de Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires Argentina Sitio web: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53529349007.pdf>
 - Ⓟ Wang,J.,Zeng,Z.,Xiao,R.,Xie, T.,Zhou,G. Zhan,X., Wang,S.(2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. US National Library of Medicine National



Institutes of Health. Recuperado el 29 de Abril del 2020 de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3090273/#b2-ijn-6-765>

- Ⓣ Wells,J.(2016). Cap 8 Preformulación farmacéutica: propiedades fisicoquímicas de las sustancias farmacológicas. En Aulton,E. del libro Farmacia la ciencia del diseño de las formas farmacéuticas (pp 114-140). España:Elsevier
- Ⓣ Xiomara,E. (2014). Análisis termodinámico del equilibrio sólido-líquido de un sistema binario. Septiembre 17,2019, de Universidad Nacional de Colombia Sitio web: shorturl.at/cuY14
- Ⓣ Zetina,L.(2019). Efecto de la administración intrarticular de nanopartícula de quitosán con glutatión en osteoartrosis [tesis de maestría]. Universidad nacional Autónoma de México, México