



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

***“DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN PARENTERAL  
DE RESVERATROL”***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

**LICENCIADA EN FARMACIA**

**P R E S E N T A**

IRIS ANAHÍ BLANCO ALCÁNTARA

**Asesora:**

Dra. Raquel López Arellano

**Coasesora:**

M. en C. Elvia Adriana Morales Hipólito



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## DEDICATORIAS

El presente trabajo va dedicado a mi familia por el apoyo que me brindaron en esta etapa, sin ustedes no habría llegado hasta donde estoy.

A mi Tío Rubén, *“No hay día en que no piense en ti, no estás físicamente, pero vives en mi mente y corazón”*.

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por darme salud, permitirme tener a mi familia y amigos conmigo en todo momento, y rodearme de amor.

A mis padres, **Ma. Dolores Alcántara** y **José A. Blanco**, por su apoyo incondicional, por su motivación y por haberme forjado como la persona que soy; mis logros se los debo a ustedes, los amo.

A mis hermanos, Ángel, Rebeca, Sarai y Lidia quienes siempre me alentaron a seguir con mis metas, los amo.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por formarme como profesional, por ser mi segundo hogar; es un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios.

A la **Dra. Raquel López Arrellano** por tenerme paciencia, por la confianza, apoyo y todos los conocimientos que me brindó; es usted una persona admirable y de gran corazón.

A la **M. C. Adriana Morales Hipólito**, por compartir su conocimiento, tenerme paciencia y haberme brindado todo el apoyo para el presente trabajo.

A todo **LEDEFAR** por permitirme formar parte del equipo y confiar en mí para realizar este trabajo.

A mis amigos, **Arturo, Brandol, David, Esmeralda, Felipe, Fernanda, Jazmín, Chuy, Roxana, Yosabeth**, quienes siempre me apoyaron en esta etapa, porque de ustedes también aprendí mucho y me brindaron momentos increíbles, siempre los llevaré conmigo, gracias.

A mis compañeras, **Alma, Paty, Mariana, Esmeralda, Esbeydy, Cinthya**, quienes aportaron a este trabajo con muestras sanguíneas, y la profesora **Sofía** por tomar las muestras, gracias.

A **Genomma Lab** por haber aportado los materiales de excipientes que hizo posible el presente trabajo.

## ¡G R A C I A S!

Se agradece el apoyo aportado a través del proyecto **PAPIIT clave IT201620** de DGAPA-UNAM

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. OBJETIVOS .....	4
3.1 Objetivo general .....	4
3.2 Objetivos particulares .....	4
4. HIPÓTESIS .....	5
5. MARCO TEÓRICO.....	6
5.1. Monografía del resveratrol.....	6
5.1.1. Características fisicoquímicas del resveratrol.....	7
5.2. Importancia terapéutica de resveratrol y dosis .....	8
5.3. Farmacocinética.....	10
5.3.1. Absorción .....	10
5.3.2. Distribución .....	10
5.3.3. Biotransformación.....	10
5.3.4. Eliminación .....	11
5.4. Formulaciones inyectables reportadas de resveratrol .....	11
5.5. Inyectables .....	13
5.5.1. Soluciones inyectables .....	16
5.5.2. Vehículos .....	16
5.5.3. Amortiguadores de pH.....	20
5.5.4. Agentes isotónicos .....	20
5.5.5. Antioxidantes .....	21
5.5.6. Antimicrobianos.....	22
5.6. Atributos de calidad que debe de tener una solución inyectable.....	23
5.6.1. Libre de partículas extrañas.....	23
5.6.2. pH.....	24
5.6.3. Isotonicidad.....	25
5.6.4. Esterilidad .....	26
5.6.5. Libre de pirógenos.....	27
5.7. Potencial hemolítico de cosolventes.....	28
5.8. Enfoques para incrementar solubilidad en fármacos poco solubles.....	29
6. PLAN EXPERIMENTAL .....	32
7. MATERIALES .....	34

8. EQUIPOS E INSTRUMENTOS.....	36
9. METODOS.....	37
9.1. Estudios de pre-formulación.....	37
9.1.1. Comportamiento espectrofotométrico del resveratrol .....	37
9.1.2. Solubilidad .....	37
9.1.3. Morfología .....	38
9.1.4. Estabilidad de la materia prima de resveratrol en diferentes medios de pH.....	38
9.1.5. Compatibilidad fármaco-excipientes.....	40
9.2. Estudios de formulación.....	41
9.2.1. Diseño experimental para obtener una solución óptima de resveratrol.....	41
9.3. Potencial hemolítico.....	43
9.4. Estudio de estabilidad .....	44
9.5. Propuesta de procedimiento de fabricación .....	46
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	47
10.1. Estudios de pre-formulación .....	47
10.1.1. Comportamiento espectrofotométrico .....	47
10.1.2. Solubilidad .....	48
10.1.3. Morfología.....	51
10.1.4. Estabilidad del resveratrol en diferentes medios de pH.....	52
10.1.5. Compatibilidad fármaco-excipientes.....	57
10.2. Estudios de formulación .....	60
10.2.1. Propuesta de formulaciones .....	60
10.3. Pruebas de hemólisis.....	74
10.4. Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para la determinación de resveratrol en las formulaciones parenterales.....	76
10.4.1. Linealidad del sistema .....	77
10.4.2. Especificidad .....	79
10.4.3. Linealidad del método.....	81
10.4.4. Precisión y exactitud .....	84
10.4.5. Reproducibilidad .....	85
10.5. Estudios de estabilidad.....	87
11. CONCLUSIONES.....	102
12. PERSPECTIVAS.....	103
13. REFERENCIAS .....	104
14. ANEXOS.....	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

- Figura 1. Estructura química de los isómeros de resveratrol. (A) trans- 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, y (B) cis- 3,5,4'-trihidroxiestilbeno..... 6
- Figura 2. Espectros de absorción en UV/VIS del resveratrol. (Zupancic, Lavric, & Kristl, 2015). ..... 8
- Figura 3. Ejemplo de un envase saturado de gas inerte para el desplazamiento de oxígeno..... 21
- Figura 4. Tonicidad en eritrocitos. .... 25
- Figura 5. Diagrama metodológico para desarrollar la formulación de RSV. .... 32
- Figura 6. Diagrama metodológico para desarrollar y validar el método para cuantificar RSV..... 33
- Figura 7. Barrido de estándar de resveratrol para determinar comportamiento espectrofotométrico.. 47
- Figura 8. Solubilidad del resveratrol en diferentes solventes..... 49
- Figura 9. Morfología del resveratrol. .... 51
- Figura 10. Comparación de cromatogramas de RSV mostrando su estabilidad en diferentes pH's en los diferentes días..... 54
- Figura 11. Comparación de espectros de RSV mostrando su estabilidad en diferentes pH's en los diferentes días. .... 55
- Figura 12. Degradación del resveratrol en pH 2.0, 5.8, 7.0 y 8.0..... 56
- Figura 13. Espectro de mezclas de solventes con RSV para determinar compatibilidad fármaco- excipientes..... 58
- Figura 14. Cromatogramas de mezclas de solventes con RSV para determinar compatibilidad fármaco- excipientes..... 59
- Figura 15. Formulaciones iniciales con RSV 50 %. ..... 62
- Figura 16. Formulaciones del diseño de experimentos con RSV 95.2 %. .... 63
- Figura 17. Diagramas de pareto estandarizado. .... 67
- Figura 18. Diagrama de superficie de respuesta para la determinación de resveratrol determinado por HPLC en la solución inyectable..... 69
- Figura 19. Diagrama de superficie de respuesta para la determinación de resveratrol determinado por espectrofotometría UV/Vis en la solución inyectable..... 70
- Figura 20. Diagrama de superficie de respuesta para la determinación de pH en la solución inyectable. .... 71
- Figura 21. Resultados del potencial hemolítico de las formulaciones seleccionadas. .... 75

▪ Figura 22. Evaluación del potencial hemolítico. ....	76
▪ Figura 23. Curva de calibración del resveratrol para determinar linealidad del sistema. ....	78
▪ Figura 24. Especificidad con formulación 5. ....	80
▪ Figura 25. Especificidad con formulación 23. ....	80
▪ Figura 26. Concentración adicionada vs concentración estimada para determinar linealidad del método. ....	82
▪ Figura 27. Comparación de líneas de regresión para las formulaciones F2, F5 y F23 en envase de vidrio. ....	91
▪ Figura 28. Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre el pH para formulación 2. ....	97
▪ Figura 29. Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre el pH para formulación 5. ....	97
▪ Figura 30. Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre el pH para formulación 23. ....	97
▪ Figura 31. Evaluación física de las formulaciones sometidas a estabilidad acelerada. ....	98
▪ Figura 32. Cambio de color en la solución de la F23 en envase de vidrio ámbar a 60°C después de las 24 horas. ....	99
▪ Figura 33. Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre % resveratrol para formulación 2. ....	101
▪ Figura 34. Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre % resveratrol para formulación 5. ....	101
▪ Figura 35. Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre % resveratrol para formulación 23. ....	101

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
▪ Tabla 1. Ejemplos de formas farmacéuticas de resveratrol en el mercado.....	9
▪ Tabla 2. Ventajas y desventajas de los inyectables. ....	15
▪ Tabla 3. Requerimientos que deben cumplir los inyectables. ....	15
▪ Tabla 4. Enfoques para incrementa la solubilidad. ....	30
▪ Tabla 5. Ejemplos de productos parenterales comercializados que hacen uso de cosolventes. ....	31
▪ Tabla 6. Resumen de condiciones de análisis de estabilidad en diferentes medios de pH.....	39
▪ Tabla 7. Diseño experimental 3 <sup>3</sup> . ....	42
▪ Tabla 8. Matriz del diseño experimental.....	42
▪ Tabla 9. Diseño experimental codificado de soluciones inyectables de RSV y resultados de la medición de las respuestas.....	61
▪ Tabla 10. Análisis de Varianza para contenido de RSV (%) determinado por UV/Vis. ....	64
▪ Tabla 11. Análisis de Varianza para contenido de RSV (%) determinado por HPLC.....	64
▪ Tabla 12. Análisis de Varianza para pH Iny.....	65
▪ Tabla 13. Cantidades óptimas de los cosolventes a emplear para la formulación parenteral de RSV.73	73
▪ Tabla 14. Formulaciones seleccionadas. ....	74
▪ Tabla 15. Datos de concentraciones de la curva de calibración de resveratrol para evaluar linealidad del sistema.....	77
▪ Tabla 16. Parámetros obtenidos de la regresión de la curva de calibración de resveratrol para evaluar linealidad del sistema.....	78
▪ Tabla 17. Análisis de varianza para determinar la linealidad del sistema con un nivel de significancia del 95%.....	79
▪ Tabla 18. Datos de concentración adicionada vs concentración recuperada para determinar linealidad del método a partir de placebos cargados. ....	82
▪ Tabla 19. Datos de los parámetros obtenidos para determinar linealidad del método.....	83
▪ Tabla 20. Análisis de varianza para determinar la linealidad del método con un nivel de significancia del 95%.....	83
▪ Tabla 21. Datos de concentración adicionada vs concentración estimada para determinar precisión y exactitud del método a partir de placebos cargados. ....	84
▪ Tabla 22. Datos de regresión para determinar precisión y exactitud del método.....	85
▪ Tabla 23. Cantidad estimada de Resveratrol a partir de placebos cargados para evaluar reproducibilidad del método (Precisión intermedia del método). ....	86
▪ Tabla 24. Resultados de las evaluaciones de % resveratrol en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio ámbar. ....	89
▪ Tabla 25. Resultados de las evaluaciones de % resveratrol en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio transparente. ....	90

▪ Tabla 26. Aplicación de la ecuación de Arrhenius .....	92
▪ Tabla 27. Aplicación de la Ecuación de Arrhenius.....	93
▪ Tabla 28. Resultados de las evaluaciones de pH en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio transparente. ....	95
▪ Tabla 29. Resultados de las evaluaciones de pH en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio ámbar.....	96
▪ Tabla 30. Condiciones cromatográficas para el análisis de RSV.....	117
▪ Tabla 31. Resultados de intervalos de confianza para F2.....	119
▪ Tabla 32. Resultados de intervalos de confianza para F5.....	119
▪ Tabla 33. Resultados de intervalos de confianza para F23.....	119

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

mL	Mililitros
mg	Miligramo
µg	Microgramos
nm	Nanómetros
µm	Micrómetros
RSV	Resveratrol
t-RSV	<i>Trans</i> -resveratrol
FD	Factor de dilución
FDA	Food and Drug Administration
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
USP	Farmacopea de Estados Unidos
PG	Propilenglicol
PEG	Polietilenglicol
EtOH	Etanol
NaOH	Hidróxido de sodio
IV	Intravenosa
IM	Intramuscular
BA	Alcohol bencílico
N	Normalidad
LI	Límite inferior
LS	Límite superior
K	Constante de velocidad de reacción
t <sub>90</sub>	Tiempo en el cual el fármaco se ha degradado el 10% de su concentración
%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
°K	Grados kelvin
pKa	Constante de acidez

VA	Envase de vidrio ámbar
VT	Envase de vidrio transparente
rpm	Revoluciones por minuto
CV%	Porcentaje de coeficiente de variación
$r^2$	Coeficiente de determinación
r	Coeficiente de correlación
IC ( $\beta_1$ )	Intervalo de confianza de la pendiente
IC( $\beta_0$ )	Intervalo de confianza de la ordenada a la origen o intercepto
IC( $\mu$ )	Intervalo de confianza de la media aritmética
m	Pendiente
b	Intercepto
UV/Vis	UV visible
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución

## 1. INTRODUCCIÓN

Muchos de los fármacos desarrollados que son de baja solubilidad presentan una biodisponibilidad baja, o bien variable y, por lo tanto, una variabilidad en la respuesta clínica (Williams, Trevaskis, Charman, Shanker, & Charman, 2013). Todo lo anterior presenta un mayor reto para los científicos farmacéuticos en el desarrollo de medicamentos. Siendo esto uno de las problemáticas en la industria farmacéutica durante muchas décadas (Michael, 2014). Es así que, al encontrar nuevos fármacos para la cura de enfermedades, los tratamientos no llegan a ser efectivos a causa de la baja solubilidad (Michael, 2014). Entonces en 1995, se introdujo el sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS) para facilitar el desarrollo de medicamentos, clasificando las moléculas del fármaco según su solubilidad y permeabilidad (Michael, 2014).

La baja solubilidad también se presenta en grupos activos naturales, como los polifenoles tal es el caso del resveratrol (RSV) (Seljak, German, Ga, & Pobirk, 2018). A pesar de la baja solubilidad de este compuesto, exhibe una alta permeabilidad de la membrana y por eso puede considerarse un compuesto de clase II de acuerdo al BCS (Amri, Chaumeil, Sfar, & Charrueau, 2012).

El resveratrol (RSV) es un polifenol que, entre otras fuentes, se encuentra en las uvas y, por esta razón, los vinos tintos también contienen cantidades considerables de este compuesto (Neves, Lúcio, Lima, & Reis, 2012). El interés en el resveratrol ha aumentado debido a sus efectos farmacológicos, que incluyen cardioprotección, neuroprotección y otras acciones benéficas por ejemplo, antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos y antienvjecimiento (Neves et al., 2012). En cuanto a las propiedades neuroprotectoras del resveratrol existen estudios que han demostrado que reduce la incidencia de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Huntington y los accidentes cerebrovasculares (Kwon et al., 2011; Peñalver, Efres, Norma, & Marta, 2018). El RSV ha atraído interés muy alto debido a los grandes beneficios que ofrece a la salud. Sin embargo, su baja biodisponibilidad presenta una barrera para el desarrollo de aplicaciones terapéuticas especialmente por vía oral. Sabiendo esto existen grandes investigaciones de estrategias recientes dirigidas a la obtención de formulaciones de resveratrol para cruzar las limitaciones debido a su baja solubilidad; por ejemplo: liposomas, nanopartículas biodegradable, emulsiones, ciclodextrinas, entre otras (Amri et al., 2012; Mardare, 2001; Matos et al., 2018; Rajput & Butani, 2019). No obstante estas estrategias no son simples debido a los largos procesos de fabricación y altos costos.

A pesar de las propiedades benéficas para la salud que ofrece el resveratrol, el presentar baja solubilidad y efecto de primer paso da como resultado una escasa biodisponibilidad después de su administración oral (Rajput & Butani, 2019). Por tal motivo es relevante optar por otra estrategia que permitan mejorar la administración integra del resveratrol para lograr los efectos terapéuticos deseados; teniendo como opción una vía de administración alterna a la vía oral, la vía parenteral.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el mercado existen actualmente formas farmacéuticas de vía oral (cápsulas, tabletas, jarabes y polvos) para la administración del resveratrol. No obstante, una de las grandes desventajas que se tiene para esta vía es que se tienen que emplear dosis altas a causa de su baja biodisponibilidad, además de que no se garantiza la administración íntegra del resveratrol. Por ende se desarrolló una formulación parenteral (intravenosa) para garantizar la administración eficaz del resveratrol, esto mediante el desarrollo de una estrategia que permita obtener en solución el resveratrol y que esta pueda ser administrada vía parenteral.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Desarrollar una formulación de resveratrol en una solución inyectable mediante el uso de cosolventes que permitan aumentar su solubilidad para obtener una solución con potencial hemolítico no significativo y estable.

#### 3.2 Objetivos particulares

1. Hacer una investigación documental sobre las características fisicoquímicas, formulaciones y métodos analíticos tanto de identificación como de cuantificación de resveratrol.
2. Realizar la caracterización del resveratrol para definir condiciones de análisis de cuantificación y desarrollo de formulaciones.
3. Hacer estudios de compatibilidad de excipientes con resveratrol para establecer posibles formulaciones.
4. Comparar las formulaciones obtenida en base a un diseño experimental para seleccionar las que presenten mejor estabilidad física.
5. Realizar pruebas de hemolisis de formulaciones con mejor estabilidad física para determinar su potencial hemolítico empleando sangre humana.
6. Hacer un estudio exploratorio de estabilidad acelerada de las formulaciones con mejor estabilidad física para estimar su periodo de vida útil.
7. Desarrollar y validar un método de análisis para cuantificar resveratrol en formulaciones parenterales desarrolladas mediante espectrofotometría UV/Vis.

#### 4. HIPÓTESIS

Si se desarrolla apropiadamente los estudios de preformulación y formulación se podrá obtener el resveratrol en una solución inyectable que sea estable.

## 5. MARCO TEÓRICO

### 5.1. Monografía del resveratrol

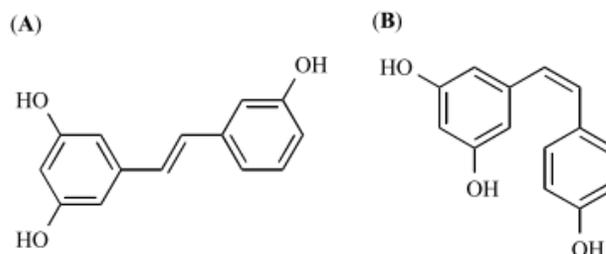
*Nombre común* Resveratrol

*Nombre químico* 3,5,4'-trihidroxiestilbeno

- Sinónimos*
- (E) -5- (2- (4-hidroxifenil) etenil) -1,3-bencenodiol (E) -5-(2- (4-hidroxifenil) etenil) -1,3-bencenodiol
  - (E) -resveratrol
  - 3,4', 5-trihidroxi-*trans*-estilbeno
  - 3,4', 5-trihidroxiestilbeno
  - 3,5,4'-trihidroxiestilbeno
  - 5 - [(E) -2- (4-hidroxifenil) vinil] benceno-1,3-diol
  - *trans*-resveratrol

*Formula condensada* C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

*Estructura*



**Figura 1.** Estructura química de los isómeros de resveratrol. (A) *trans*- 3,5,4'-trihidroxiestilbeno, y (B) *cis*- 3,5,4'-trihidroxiestilbeno.

*Apariencia* Sólido cristalino. La apariencia depende de su pureza.

*Descripción* El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina polifenólica. Es un estilbenoide, un derivado del estilbeno, y se produce en plantas con la ayuda de la enzima estilbeno sintasa. Existe como dos isómeros estructurales: *cis*- (*Z*) y *trans*- (*E*). La forma *trans* es una molécula que puede presentar oxidación y también puede sufrir isomerización a

la forma *cis* cuando se calienta o se expone a radiación ultravioleta. Se ha afirmado que es fácilmente degradado por la exposición a la luz, altas temperaturas y el oxígeno. Sin embargo, los estudios encuentran que *trans*-resveratrol sufre una oxidación insignificante en la atmósfera normal a temperatura ambiente (Prokop, Abrman, Seligson, & Sovak, 2006).

El *trans*-resveratrol presenta baja solubilidad pero exhibe una alta permeabilidad de la membrana, por ello es un compuesto de clase II en el Sistema de clasificación biofarmacéutica.

Número CASS 501-36-0

(Kwon et al., 2011; Peñalver et al., 2018; Protocols, 1991), [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)

### 5.1.1. Características fisicoquímicas del resveratrol

*Peso molecular* 228.2433 g/mol

*Punto de fusión* 254°C

Agua 0.0688 mg/ml

*Solubilidad* Dimetil Sulfóxido (DMSO) y etanol 50mg/ml

Dimetil formamida (DMF) 100mg/ml

*pKa* pKa1 8.99

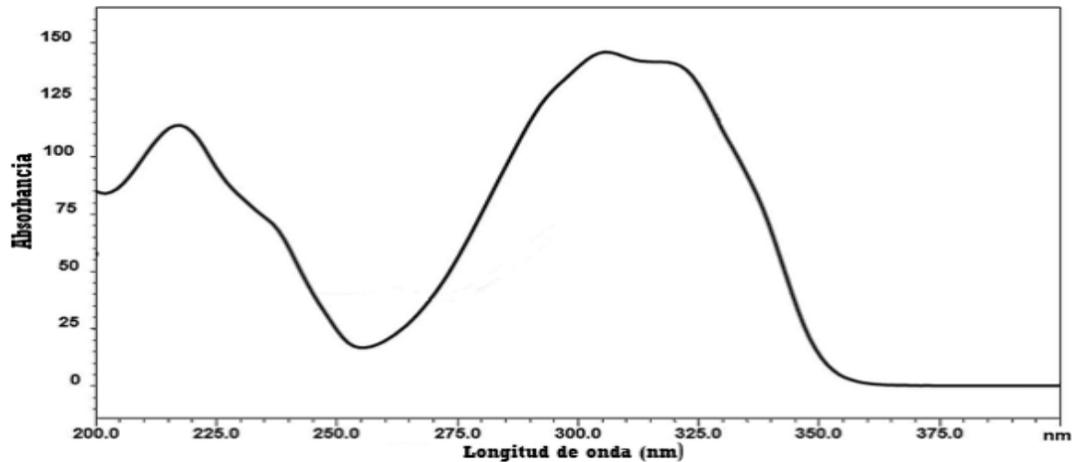
pKa2 9.63

pKa3 10.64

*Constante de partición* 3.1

*UV/Vis* Long. de onda máxima 218, 307, 321 nm

[www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca); <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



**Figura 2.** Espectros de absorción en UV/VIS del resveratrol. (Zupancic, Lavric, & Kristl, 2015).

## 5.2. Importancia terapéutica de resveratrol y dosis

En los últimos años el interés por estudiar el resveratrol ha aumentado de manera considerable debido a sus efectos farmacológicos, que incluyen cardioprotección, neuroprotección y otras acciones benéficas por ejemplo, antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos y antienvjecimiento (Gao & Hu, 2005; Moshawih, Mydin, Kalakotla, & Jarrar, 2019; Neves et al., 2012; Shanan, GhasemiGharagoz, Abdel-Kader, & Breitinger, 2019). En cuanto a las propiedades neuroprotectoras del resveratrol existen estudios que han demostrado que reduce la incidencia de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, Huntington y los accidentes cerebrovasculares (Kwon et al., 2011; Peñalver et al., 2018).

Diversas investigaciones han realizado pruebas sobre los efectos del resveratrol empleando dosis aplicadas a modelos biológicos para pruebas *in vivo* y estudios clínicos en humanos, variando dichas dosis según el objetivo del estudio abarcando dosis orales, inyectables vía intraperitoneal e intravenosa, que van de 0.6 mg/kg/día hasta los 10, 15 y 20 mg/kg/día de resveratrol, para el primer caso de tipo de estudio (Park & Pezzuto, 2015; Yu et al., 2002), y de 25 mg, 500 mg hasta 1 g al día respectivamente (Amri et al., 2012; Chávez, Ocañas, Castañeda, Tamez de la O, & Verástegui, 2014; Elshaer, Chen, Wang, & Tang, 2018; Park & Pezzuto, 2015; Yu et al., 2002). El resveratrol se encuentra comercialmente como suplemento alimenticio en dosis de 20 a 500 mg, comúnmente, para la administración vía oral. Algunos ejemplos de productos comerciales de resveratrol se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Ejemplos de formas farmacéuticas de resveratrol en el mercado.

Nombre del producto	Presentación y contenido de resveratrol	Vía de administración	Lugar	Fabricante	Imagen del producto
Resveratrol	Jarabe 333.3 mg/ 100ml	Oral	México	Solanum	
Resveratrol	250 mg por cápsula	Oral	US	RITE AID PHARMACY	
Resveratrol. Extracto de vino rojo Plus.	200 mg por cápsula	Oral	US	Mason Vitamins	
Trans-Resveratrol	Frasco con 60 gramos de resveratrol puro en polvo.	Oral	US	FourRealms	
Resveratrol	100 mg por tableta	Oral	US	Youtheory	
Resveratrol	500 mg por cápsula	Oral	Tailandia	S5 Supplement Labs	
Resveratrol	Cápsulas con 500 mg	Oral	México	ResVitale®	

[www.micromedexsolutions.com](http://www.micromedexsolutions.com), <https://www.drugbank.ca>

## 5.3. Farmacocinética

### 5.3.1. Absorción

Las formas de dosificación, las condiciones fisiológicas de los pacientes y la dieta pueden afectar la absorción del resveratrol. El resveratrol es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal (GI) después de la administración oral con una concentración (C<sub>max</sub>) que se da en los primeros 30 minutos y 1.5 a 2 horas después de dosis bajas y dosis más altas respectivamente, todo esto en estado de ayuno (Amri et al., 2012; Huang et al., 2019).

### 5.3.2. Distribución

Aunque la distribución de resveratrol en todo el cuerpo humano no ha sido completamente estudiado o bien, determinado, un estudio demostró que el resveratrol se concentra en órganos como el cerebro, el hígado, el intestino y la grasa (Huang et al., 2019). El resveratrol se reporta que se une a proteínas séricas como lipoproteínas, hemoglobina y albumina, las cuales facilitan su transporte (Amri et al., 2012; Neves et al., 2012).

### 5.3.3. Biotransformación

Los enterocitos y los hepatocitos son las principales células biotransformadoras del resveratrol después de su administración oral (Huang et al., 2019).

El resveratrol sufre cambios bioquímicos extensos de fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) y fase II (ácido glucurónico, sulfato y metilo) inmediatamente después de la ingestión, metabolizándose en conjugaciones de ácido glucurónico y sulfato de los grupos fenólicos en las células epiteliales hepáticas e intestinales (Neves et al., 2012).

#### 5.3.4. Eliminación

En el último proceso todos los metabolitos del resveratrol se eliminan del organismo a través de la orina y de las heces. Una casi completa eliminación del resveratrol y sus metabolitos, se observa después de las 72 horas de la dosis única (Neves et al., 2012). Los dos principales metabolitos del resveratrol descubiertos en orina son los monoglucurónidos de trans-resveratrol y dihidro-resveratrol. La recuperación total de las conjugaciones de glucurónico y sulfato en la orina y las heces de los humanos reportados en literatura han sido aproximadamente el 71-98 % después de las dosis orales y del 54-91 % después de las dosis intravenosas. (Amri et al., 2012; Neves et al., 2012).

#### 5.4. Formulaciones inyectables reportadas de resveratrol

A nivel investigación existen algunos estudios realizados donde emplean diferentes estrategias para mejorar la solubilidad del resveratrol y la administración integra de este por vía parenteral. A pesar de que se han presentado nuevas estrategias de formulaciones inyectables de RSV estas están todavía lejos de optimizarse, en algunos casos, o bien no se encuentran como tal en el mercado, además de que suelen ser estrategias que son costosas y que implican un tiempo de proceso largo, y principalmente los estudios de formulación para el resveratrol van más enfocados a vía oral, aunque ha demostrado ser una vía no tan eficaz para la administración del RSV. A continuación se mencionan algunas de las investigaciones:

Thomas Walle, Faye Hsieh et al., (2004) llevaron a cabo un estudio en donde evaluaron el proceso de absorción, biodisponibilidad y metabolismo del resveratrol después de la administración vía oral y vía intravenosa, dichos investigadores realizaron el estudio *in vivo* con voluntarios humanos. Para realizar la evaluación, particularmente hablando de vía intravenosa, los investigadores se dieron a la tarea de obtener en solución el resveratrol y para ello disolvieron 1.5 mg del activo en 1.5 ml de etanol al 100%, una vez obtenida esta sencilla formulación procedieron a realizar pruebas de esterilidad y pirógenos. Posteriormente, antes de realizar la administración intravenosa, tomaron 0.2 ml de esta solución para agregarla a 10ml de una solución salina estéril (Thomas Walle, Faye Hsieh, Mark H. DeLegge, John E. Oatis, Jr. & Department, 2004).

En otra investigación Hung, Chen, Liao, Lo, & Fang., (2006) desarrollaron una estrategia para incorporar resveratrol en combinaciones de emulsiones y liposomas para su posterior inyección intraperitoneal. Dichas mezclas de emulsión-liposoma estaban compuestas de aceite de coco, lecitina de soja, glicerol y tensoactivos no iónicos. Para la administración de las formulaciones los investigadores emplearon como vehículo 30 % etanol en buffer pH 7.4. Una vez obtenidas las formulaciones se realizaron pruebas de hemolisis y la examinación histológica de los modelos experimentales (C.-F. Hung, Chen, Liao, Lo, & Fang, 2006; C. F. Hung, Fang, Liao, & Fang, 2007). (C.-F. Hung, Chen, Liao, Lo, & Fang, 2006); (C. F. Hung, Fang, Liao, & Fang, 2007)

Das, Lin et al., (2008) realizaron un estudio que tuvo como objetivo determinar el impacto de la solubilidad acuosa y la manipulación de dosis en la farmacocinética del resveratrol. Dicho estudio fue realizado empleando la vía oral y vía intravenosa, para ello los investigadores prepararon formulaciones intravenosas y orales de resveratrol que fueran solubles en agua empleando hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HP- $\beta$ -CD) y  $\beta$ -ciclodextrina metilada al azar (RM- $\beta$ -CD) respectivamente. La sal de sodio y la suspensión de resveratrol en carboximetilcelulosa (CMC) fueron empleadas para el desarrollo de las formulaciones intravenosas de resveratrol (Das, Lin, Ho, & Ng, 2008).

El investigador Frozza et al., (2010) se encargaron de desarrollar nanocápsulas suspendidas cargadas de resveratrol, para garantizar la administración integral del activo por vía intraperitoneal.

Los investigadores evaluaron con las formulaciones planteadas la distribución de las nanocápsulas en el tejido cerebral esto mediante rutas intraperitoneales (i.p.) y de sonda en ratas sanas. Las nanocápsulas de resveratrol mostraron mayor concentración de este a nivel cerebral, así como en hígado y riñón en comparación a una formulación de resveratrol libre, sin encapsular, que contenía únicamente NaCl 0.9% con dimetilsulfóxido (DMSO) al 30 % (Frozza et al., 2010).

Para el 2011, Coimbra et al., tuvieron una idea innovadora para solubilizar compuestos de baja solubilidad acuosa sin el uso de solventes y así poder administrar de manera intravenosa, uno de sus activos de estudio fue el resveratrol. Coimbra et al., desarrollaron formulaciones liposomales y como resultados demostraron que la 3-oxo-C12-homoserina lactona lipofílica y los derivados de estilbeno se pueden cargar en la bicapa lipídica liposómica con eficiencias del 50-70 % y de este modo, los liposomas solubilizan estos

compuestos, permitiendo la administración intravenosa además de conservar el activo de manera estable (Coimbra et al., 2011).

Vijayakumar et al., (2016) mejoraron la vida media biológica del resveratrol para vía intravenosa a través de la nanotecnología, estableciendo una formulación de nanopartículas de lípidos sólidos recubiertos con succinato de d- $\alpha$ -tocoferil polietilenglicol 1000 (TPGS) cargadas de resveratrol (RSV-TPGS-SLN). Las formulaciones de RSV-TPGS-SLN las prepararon mediante un método de evaporación por emulsión de disolvente y caracterizaron las nanopartículas obtenidas. Realizaron los estudios de farmacocinética y biodistribución, después de la administración intravenosa en ratas. Para la administración en ratas, las nanopartículas fueron resuspendidas en una solución de cloruro de sodio al 0.9% posteriormente de haber evaluado el potencial hemolítico de la formulación (Vijayakumar et al., 2016).

Destacando también la investigación realizada por Katekar et al., (2019) quienes desarrollaron una formulación de micelas mixtas cargadas con RSV utilizando Pluronic F-127 (PF-127) y succinato de d- $\alpha$ -tocoferil polietilenglicol 1000 (TPGS) mediante el proceso de hidratación de película. Dichas formulaciones se caracterizaron en cuanto a tamaño de partículas, potencial zeta, eficacia, carga de fármaco y potencial hemolítico de las micelas debido a que estas tenían el propósito de administrarse intravenosamente. Realizaron un estudio farmacocinético en ratas en donde determinaron la formulación óptima de acuerdo a las caracterizaciones realizadas (Katekar et al., 2019).

## 5.5. Inyectables

En primera instancia una forma farmacéutica se define como la disposición física que se da a los fármacos y aditivos para constituir un medicamento y facilitar su dosificación y administración (FEUM, 2018). Existen diversas formas farmacéuticas que tienen la finalidad de facilitar la administración de activos o fármacos al organismo, entre las más comunes destacan los aerosoles, cápsulas, tabletas o comprimidos, cremas, emulsiones, suspensiones, geles, grageas, óvulos, parches, ungüentos, soluciones, entre otros. Cada una destinada a una vía de administración específica ya sea enteral (cuando la administración es en algún sitio del conducto digestivo) o parenteral (cuando la administración es por la vía diferente a la enteral) (FEUM, 2018).

Para el presente trabajo se hizo énfasis en la forma farmacéutica de tipo solución para una vía de administración parenteral ya que la formulación desarrollada será destinada para dicha vía y por ello primero se debe entender cómo se define un inyectable.

A continuación se muestran las definiciones de inyectables descritas por las farmacopeas: La USP utiliza el término “Artículos parenterales” para referirse a los inyectables y definirlos como aquellas preparaciones destinadas para inyección a través de la piel u otro tejido externo, en lugar de la vía alimentaria, administrando sustancias activas directamente en un vaso sanguíneo, órgano, tejido o lesión, usando la fuerza de la gravedad u otra fuerza (USP40, 2016).

Por su parte, la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) maneja el término “preparaciones inyectables” para hacer referencia a los inyectables y definirlos como soluciones, suspensiones o emulsiones estériles, que contienen uno o más fármacos preparados por disolución o suspensión del principio activo y otros aditivos en agua para inyección o en un líquido no acuoso o en una mezcla de líquidos miscibles entre sí, envasados en recipientes adecuados, que se destinan para introducirse al organismo parenteralmente (FEUM, 2018).

Para fines del presente trabajo, debido a que se enfocó en el desarrollo de una formulación parenteral, el término adoptado será el dado por la FEUM pues abarca las formas en que puede estar presentar un inyectable a diferencia de la USP que apunta más a la vía de administración.

Las preparaciones inyectables son necesarias porque existe la necesidad de un efecto terapéutico muy rápido o porque el compuesto farmacológico no está disponible sistemáticamente por vías de administración no inyectable como es la vía oral; siendo esto una de las grandes ventajas de las formas parenterales (Tabla 2). Los inyectables, en comparación con las formas farmacéuticas orales, permiten su aplicación en pacientes que están inconscientes y no pueden deglutir una forma farmacéutica vía oral (FEUM, 2018).

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de los inyectables.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> <li>Se puede tener un efecto inmediato o, incluso, instantáneo.</li> <li>Cuando se requiere evitar destrucción o la inactivación de principios activos a causa de los jugos digestivos o por las condiciones particulares de las mucosas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Necesidad de trabajar con materiales y equipos muy específicos.</li> <li>Uso de personal manipulador competente</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Se puede emplear en casos donde el activo no se absorba por la mucosa gástrica o intestinal.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Efectos dolorosos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cuando el activo presente un efecto de primer paso muy importante.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Riesgos de infección</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>En caso de requerir minimizar ciertos efectos secundarios por vómitos u obstrucción intestinal.</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cuando se requiere asegurar la absorción íntegra de la dosis administrada.</li> </ul>	

(Jato, 2001)

De acuerdo a la FEUM las preparaciones inyectables pueden ser fabricadas por diferentes procedimientos, los cuales están diseñados para asegurar que cumplan con los requerimientos de esterilidad, pirógenos, partículas extrañas y de otros contaminantes (Tabla 3) (FEUM, 2018).

**Tabla 3.** Requerimientos que deben cumplir los inyectables.

#### Características y requerimientos para los inyectables

<ul style="list-style-type: none"> <li>Esterilidad</li> <li>Libre de pirógenos</li> <li>Libre de partículas extrañas</li> <li>Estable: no solo físicamente y químicamente sino también microbiológicamente</li> <li>Isotonicidad</li> <li>pH (lo más cercano al fisiológico)</li> </ul>
---

(Gupta & Brazeau, 1999; Lozano, 2012)

### 5.5.1. Soluciones inyectables

Una solución está definida como aquella forma farmacéutica líquida transparente y homogénea que contiene una o más sustancias químicas, como son fármacos o excipientes, disueltos en un disolvente acuoso o no acuoso, o una mezcla de disolventes miscibles entre sí (USP, 2015). Las preparaciones de las soluciones inyectables suelen constar de:

- Principio activo
- Vehículo (s) o disolvente (s)
- Sustancias auxiliares o excipientes (en caso de requerirlo)

Las soluciones destinadas a la administración parenteral, al igual que otras formas parenterales, deben ser estériles, y biocompatibles con el sitio de administración. Es decir, deben considerarse factores como son: tonicidad, pH, pirogenicidad, partículas extrañas y compatibilidad fisicoquímica, entre otros (Jato, 2001).

### 5.5.2. Vehículos

El vehículo es una sustancia líquida inerte que se emplea en formulaciones farmacéuticas líquidas para diluir el complejo total hasta llegar a un volumen o peso determinado. El vehículo principal para la fabricación de preparados inyectables es el agua, por su puesto esto es debido a su característica de elemento fisiológico y su constante dieléctrica elevada lo que permite la disolución de electrolitos. Sin embargo, para ciertos casos particulares, puede ser necesario utilizar otros disolventes para la administración de activos de baja solubilidad y activos inestables en medios acuosos por esta razón existen los vehículos acuosos y los no acuosos (Jato, 2001).

#### 5.5.2.1. Vehículos acuosos

El agua para preparaciones inyectables (agua p.p.i) es un producto destinado a la preparación de medicamentos vía parenteral en los que el vehículo es acuoso, y a la dilución o disolución de sustancias o preparaciones de administración parenteral en el

momento de empleo, se le llama agua esterilizada para preparaciones inyectables (Jato, 2001). Existen otros tipos de agua para inyección contempladas en algunas farmacopeas, tales como el agua bacteriostática (agua esteril p.p.i., con agentes conservantes) y soluciones de electrolitos en agua p.p.i., las cuales son destinadas a preparaciones para infusión (Jato, 2001).

El agua destinada a preparaciones de inyectables debe reunir condiciones particulares, es decir, el agua estéril para inyectables, tal como lo dice su nombre, no debe contener microorganismos. Así mismo el agua p.p.i. tampoco debe contener pirógenos y aunque estos puedan ser eliminados de las soluciones obtenidas, es preferible evitar su presencia desde que inicie la preparación (Monroy, 2003).

El agua p.p.i. puede ser obtenida por destilación u otra tecnología que demuestre la eliminación de sustancias químicas, microorganismos y endotoxinas, esto puede ser partiendo de agua potable o agua purificada sometiéndola de igual manera a un proceso de destilación (FEUM, 2018).

#### **5.5.2.2. Vehículos no acuosos**

Para la selección de un vehículo no acuoso se debe tener en cuenta varios aspectos, tales como que no resulte tóxico, no sea irritante y no exista ningún efecto adverso sobre algún componente de la formulación. También se deben considerar ciertas propiedades de los vehículos no acuosos entre ellos están:

- Solubilidad y miscibilidad con el agua: de acuerdo a estas propiedades los vehículos no acuosos se clasifican en dos grupos, hidrosolubles y liposolubles. La característica de solubilidad en agua tiene influencia en la difusión y sobre la velocidad de acción del activo (Jato, 2001).
- Viscosidad: algunos disolventes no acuosos son muy viscosos, provocan que la inyección sea más dolorosa y alente la difusión del activo. Aunque esto último mencionado puede presentar una ventaja siempre y cuando se desee una acción prolongada del medicamento (Jato, 2001).
- Pureza: una ventaja que ofrecen los disolventes no acuosos es ser menos contaminables por microorganismos que el agua. Sin embargo, en los productos de síntesis es necesario comprobar la ausencia de productos derivados del

método obtención, que pueden ser tóxicos. Para mezclas de isómeros o de polímeros de composiciones más complejas, hay que realizar una revisión de normas límites de las farmacopeas (límites de viscosidad, densidad, índices diversos etc.) (Jato, 2001).

#### 5.5.2.2.1. Vehículos no acuosos miscibles en agua

Entre los vehículos no acuosos miscibles en agua destacan los siguientes:

- Etanol: permite mejorar la solubilidad de diversos fármacos y también conservar los preparados debido a que ejerce una acción bactericida. Una ventaja que ofrece es que a pequeñas dosis no es tóxico; sin embargo, entre las desventajas es que las preparaciones inyectables con etanol son dolorosas por ello es recomendable no emplear concentraciones superiores al 20 o 25 % (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001). No obstante, el porcentaje de etanol empleado en formulaciones parenterales ha sido muy variado, pues existen soluciones inyectables que contienen desde 4 % de etanol hasta un 40 % y 70 %, de acuerdo a lo reportado por la FDA en su base de datos para la búsqueda de ingredientes inactivos aprobados para productos farmacéuticos (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001).
- Propilenglicol (PG): es un líquido viscoso, incoloro, inodoro y un poco más denso que el agua. Además es higroscópico, miscible con el agua, etanol y con ciertos solventes orgánicos. Se puede emplear en concentraciones que abarcan 10-60 % como disolvente de principios activos que son insolubles o inestables en solución acuosa, posee una acción bactericida parecida al etanol, siendo una gran ventaja de sus propiedades. Así mismo, entre otras ventajas, son bien absorbidos y con baja toxicidad, se pueden emplear en preparaciones destinadas a las vías subcutáneas e intramusculares (aunque se inyectaran de manera lenta) (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001).
- Polietilenglicol (PEG): son polímeros de condensación del óxido de etileno y agua representados por su fórmula general  $\text{HOCH}_2\text{-(CH}_2\text{-O-CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_2\text{OH}$ . Permiten aumentar la solubilidad y la estabilidad de diferentes

activos. Para el caso de preparaciones inyectables se emplean los PEG líquidos de peso molecular inferior a 600. El PEG más utilizado es el PEG 300, sin embargo también suelen emplearse PEG 200, PEG 400 y PEG 600, hasta concentraciones de 50 % (Jato, 2001); existen formulaciones con PEG400 reportadas que lo han empleado hasta 60 % (Gupta & Brazeau, 1999). Los PEG presentan ciertas incompatibilidades, de las que destacan es la inhibición del poder antimicrobiano de los parabenos y la disminución de la actividad de algunos antibióticos como la penicilina (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001).

- Glicerol: también conocido como “glicerina”. El glicerol tiene un elevado poder disolvente y permite la disolución de ácidos (minerales y orgánicos), de sales y azúcares. Al ser inyectado presenta irritación, por lo que no es recomendable usarlo arriba del 5 % para aquellos preparados destinados a la vía intravenosa y el 30 % para el caso de vía intramuscular.
- Otros vehículos acuosos miscibles con el agua: otros vehículos acuosos empleados son el lactato de etilo, alcohol benzílico, el butilenglicol, el glicofurool y la dimetilformamida (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001).

#### 5.5.2.2. Vehículos no acuosos liposolubles

Entre los grupos de vehículos no acuosos destacan los siguientes:

- Aceites: son de origen vegetal, se emplean para aquellas formulaciones inyectables en las cuales los principios activos son liposolubles. Los más utilizados son el aceite de oliva, el de soja, el de algodón y el de sésamo. De manera general deben de ser lípidos, neutros y no estar oxidados. Así mismo deben cumplir con ciertos requisitos químicos para cada aceite en las farmacopeas, entre ellos está índice de acidez, de saponificación, de iodo, y de peróxidos. Los aceites tienen la gran ventaja de no ser tóxicos, pero al ser mayormente viscosos que los disolventes aumentan el dolor causado por la inyección. Los aceites se emplean comúnmente para preparaciones inyectables destinadas a la vía intramuscular y vía subcutánea (Jato, 2001).

- Oleato de etilo: es un líquido aceitoso amarillento y con una viscosidad menor a la de los aceites vegetales. A temperaturas bajas no congela con facilidad como los aceites vegetales y, desde el punto de vista biológico, es mejor tolerado que los aceites. Presente un inconveniente y es el oxidarse de manera fácil, por ello se recomienda su esterilización en presencia de gas inerte (Jato, 2001).
- Otros vehículos liposolubles: destacan el Miglyol 812<sup>®</sup>, el benzoato de benzilo y algunos hidrocarburos, como el aceite de vaselina (Jato, 2001).

### 5.5.3. Amortiguadores de pH

Estos excipientes cumplen la finalidad de establecer o bien aproximar el pH del medio inyectable a un valor fisiológico o para aumentar la estabilidad del principio activo. Como reguladores de pH o Buffers, se utilizan soluciones diluidas de ácidos o bases inorgánicas y soluciones reguladoras a base de fosfatos, citratos o y acetatos y se seleccionan de acuerdo al intervalo de pH deseado, concentración y el efecto sobre las formulación (Gupta & Brazeau, 1999; Monroy, 2003; Lozano, 2012).

### 5.5.4. Agentes isotónicos

Las soluciones inyectables deben cumplir la propiedad de ser isotónicas, el cual es un factor relevante a considerar en una formulación que será destinada a la administración parenteral (Hernández, 2005).

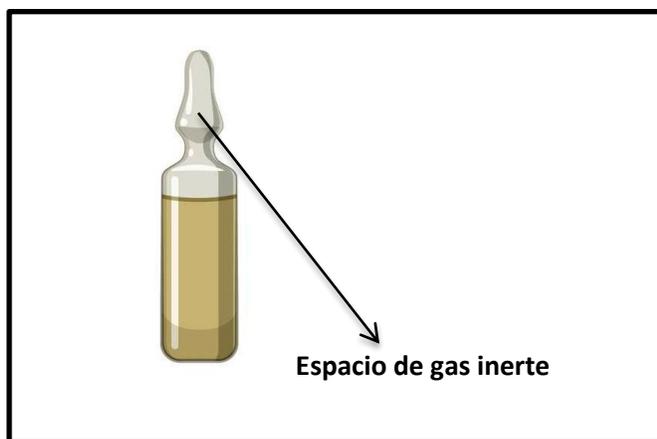
Es requerido que la formulación posea una tonicidad similar a la de los fluidos tisulares presentes en el sitio de administración debido a que si la tonicidad es menor a la de los fluidos, las células de los tejidos absorberán líquidos extracelulares intentando reestablecer el equilibrio lo que puede llegar a causar el rompimiento celular. Por otro lado, si la tonicidad es mayor, las células expulsarán líquido intracelular produciendo un encogimiento de la célula (Hernández, 2005).

Existen agentes isotonzantes que permiten ajustar la isotonicidad de las soluciones y reducir el daño celular ya comentado; entre los más empleados son el cloruro de sodio (NaCl), cloruro potásico (KCl) y la glucosa o dextrosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) (Lozano, 2012).

### 5.5.5. Antioxidantes

Desde un punto de vista químico, la oxidación es la pérdida de electrones desde un átomo o molécula que son aceptados por otro átomo o molécula receptor. Este proceso, conocido como “autooxidación”, está mediado por radicales libres y es responsable de algunos cambios observados en muchas preparaciones farmacéuticas. La autooxidación es espontánea bajo influencia inicial del oxígeno atmosférico, aunque otros factores como la temperatura, la luz y la presencia de elementos metálicos puede catalizar la reacción. El proceso de autooxidación es destructor para muchos principios activos, como los aldehídos, los fenoles, los azúcares, los alcaloides y los aceites o grasas insaturadas. Para la prevención del proceso de oxidación y aumentar la estabilidad del preparado se hace uso de antioxidantes que son capaces de reaccionar con uno o más componentes de la reacción en cadena y retrasar su proceso, en pocas palabras los antioxidantes se añaden a las formulaciones parenterales con la finalidad de proteger el principio activo de la oxidación (Lozano, 2012).

También para algunos casos se puede proteger el preparado trabajando en atmósfera inerte y desplazando el aire que está en contacto con el producto mediante saturación de la preparación con nitrógeno o  $\text{CO}_2$  (Lozano, 2012) como ejemplo de este método se muestra la figura 3 de una ampolleta.



**Figura 3.** Ejemplo de un envase saturado de gas inerte para el desplazamiento de oxígeno.

Los antioxidantes pueden ser clasificados en dos grupos principales: el primer grupo son los antioxidantes primarios, o bien, rompedores de la reacción en cadena. Estos actúan

cediendo electrones que son más fácilmente aceptados por el oxígeno o los radicales libres que los del principio activo (ejemplo: tocoferoles y los fenólicos como el butilhidroxianisol (BHA), el butilhidroxitolueno (BHT) y los galatos). El segundo grupo, antioxidantes secundarios, reducen la velocidad de iniciación de la autooxidación por quelación de iones metálicos (agentes quelantes) o mediante un proceso secuestrante del oxígeno (ejemplo: ácido ascórbico y sus derivados, y los sulfitos (Lozano, 2012).

Para la elección del antioxidante en una formulación, va depender de diferentes factores como son la dosis, frecuencia y vía de administración, también se debe considerar las propiedades físicas y químicas en los otros componentes de la formulación y tipo de envase (Monroy, 2003).

#### **5.5.6. Antimicrobianos**

Aunque ya se sabe que los inyectables deben cumplir el requisito de esterilidad hasta el momento de ser empleados, existen situaciones donde puede ser necesario añadir agentes conservantes que ayuden a impedir el desarrollo de microorganismos y que sean capaces de “autoesterilizarse” si tuviera lugar una contaminación. Las condiciones son las siguientes: cuando la preparación ha sido esterilizada antes de su acondicionamiento en el envase definitivo, cuando la preparación ha sido elaborada en condiciones asépticas, sin posterior esterilización y cuando se trate de preparaciones inyectables multidosas. El añadir un agente antimicrobiano a los preparados inyectables es con el objetivo de garantizar la seguridad y estabilidad microbiológica del producto, y siempre se empleará la mínima cantidad que permita cumplir con este objetivo (Jato, 2001). La elección del antimicrobiano ideal ha de cumplir una serie de requisitos como: poseer un amplio espectro de actividad, ser estable y efectivo en un amplio intervalo de pH, ser compatible con otros ingredientes de la formulación y sus envases, no debe afectar las propiedades tanto físicas como químicas del parenteral, poseer un coeficiente de reparto que asegure una concentración efectiva del conservante en la fase acuosa, inactivar los microorganismos lo más rápido posible para evitar adaptación microbiológica y ser seguro en su uso: no tóxico, no irritante y no sensibilizante (Jato, 2001; Monroy, 2003).

Se debe toma en cuenta diversos factores que pueden afectar la eficacia de los conservantes antimicrobianos, como la concentración, la temperatura, el coeficiente de reparto y, sobre todo, el pH del medio. El pH del medio puede afectar la estabilidad del

conservante y modificar la actividad de los conservantes con grupos ionizables en sus moléculas; incluye posible interacción entre los conservantes y otros componentes de la formulación o los envases, así como en el coeficiente de reparto de la molécula antimicrobiana en un sistema multifásico. Por ejemplo, la actividad de los conservantes con grupos ionizables en su molécula suele residir en la forma no ionizada e ionizada de la molécula será diferente y, lógicamente, también su actividad (Lozano, 2012).

## **5.6. Atributos de calidad que debe de tener una solución inyectable.**

Las preparaciones inyectables, debido a que están destinadas a atravesar las barreras protectoras que constituyen la piel y las mucosas, deben responder a un cierto número de exigencias o requerimientos de calidad. Los inyectables deben de estar lo más semejante posible a las condiciones fisiológicas de la sangre y de los tejidos. Sí mayor es la adaptación, mejor serán tolerados por el organismo (Jato, 2001). Por ello, las soluciones inyectables deberán estar libres de partículas extrañas, pH igual o cercano al fisiológico, isotonicidad, esterilidad y libre de pirógenos.

### **5.6.1. Libre de partículas extrañas**

Es la usencia de partículas en suspensión detectables por control óptico. Este concepto aplica únicamente, y de manera lógica, a los preparados de inyectables tipo solución. De acuerdo a los requerimientos de la farmacopea, las soluciones inyectables, examinadas en condiciones apropiadas de visibilidad, son límpidas y deben estar prácticamente libres de partículas (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001)

Las partículas que pueden encontrarse en suspensión dentro de un prepararon inyectable que es de tipo solución pueden tener diversos orígenes, ya sea aportadas por los mismos recipientes, las materias primas, se pueden introducir durante el proceso de elaboración y llenado de la solución, aparecer durante el almacenamiento del producto debido a degradaciones o posibles interacciones entre los distintos componentes de la formulación, o bien durante la manipulación anterior a la utilización del inyectable (Jato, 2001).

Entre las partículas más comunes son:

- Partículas de vidrio: éstas pueden ser originadas durante el proceso de fabricación de la ampolla, durante su apertura, por degradación química, etc.

- Partículas o residuos de carbonización: estas pueden ser producidas durante la operación de esterilización o en el precintado de la ampolla.
- Partículas de polvo introducidas durante el proceso de fabricación o tras la apertura de la ampolla o recipiente.
- Partículas de naturaleza muy diversa: Caucho, materiales plásticos, caolín, talco, entre otros.
- Microorganismos
- Precipitados a causa de modificaciones del producto.

### 5.6.2. pH

El pH juega un papel muy importante en el proceso de fabricación de los inyectables, esto debido a que puede condicionar la tolerancia biológica de la preparación, la estabilidad y actividad del activo.

Se sabe que el pH de la sangre, de la linfa y del líquido cefalorraquídeo abarca los valores entre 7.35 y 7.40. Sin embargo, la sangre y los tejidos poseen un poder tampón y pueden tolerar bien los inyectables con valores de pH no cercanos al fisiológico, pero a decir verdad, la administración de los inyectables con pH muy alejados de la neutralidad puede causar dolor, inflamaciones, lesiones en los tejidos y endotelios (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001).

Por otra parte, hay que considerar un aspecto importante y ese es la estabilidad del activo, ya que el pH puede tener gran influencia. Existen diversos activos que no son estables en condiciones de pH cercanos al fisiológico o la neutralidad. Debido a ello al momento de desarrollar una formulación parenteral es preferible optar por elegir un pH que tolerado por el organismo y que pueda asegurar la estabilidad del activo (Lozano, 2012; Jato, 2001).

Una estrategia que permite ajustar el pH de una solución es a través de la adición de un ácido o de una base (preparaciones no tamponadas) o bien, mediante el empleo de una solución reguladora de pH (preparaciones tamponadas) (Jato, 2001).

Para la selección de una solución reguladora de pH para inyectables, es necesario considerar lo siguiente:

- Obtener un pH que garantice la estabilidad del activo.
- Capacidad y poder amortiguador de la solución reguladora.

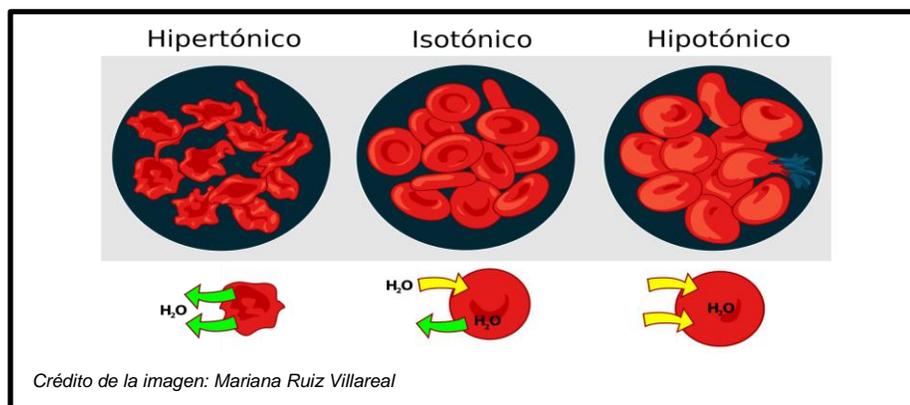
- No producir efectos tóxicos en el organismo.
- No ser incompatible con otros componentes de la preparación.
- Estar formada por constituyentes fácilmente metabolizables.

Entre las soluciones reguladoras más empleadas son las mezclas de fosfatos monosódico y disódico. Estas mezclas permiten amortiguar zonas de pH que son entre 5.4 y 8, y su poder regulador es máximo a un pH 6.8. Sin embargo también existen otras soluciones como son mezclas de:

- Ácido cítrico/citrato trisódico (pH 3-6).
- Ácido acético/acetato sódico (pH 3.6-5.6).
- Bicarbonato sódico/carbonato (pH 9.2- 10.7) (Jato, 2001).

### 5.6.3. Isotonicidad

Aquellas soluciones que tienen la misma presión osmótica que los fluidos biológicos se llaman “soluciones isotónicas”. Las preparaciones parenterales o inyectables deben tener la misma presión osmótica que los fluidos tisulares. Esta característica de tener una presión osmótica cercana a la del plasma sanguíneo va enfocada particularmente hacia soluciones intravenosas. Si la solución es hipotónica, el eritrocito admite agua plasmática en su interior para poder compensar ese desequilibrio osmótico, provocando un fenómeno llamado hemólisis (ruptura de la célula). Si por el contrario la solución es hipertónica, el eritrocito pierde agua es decir, sale líquido del interior de la célula al exterior y se produce con ello la plasmólisis; un ejemplo de tonicidad en los sistemas vivos son los eritrocitos (figura 4) (Jato, 2001; Lozano, 2012).



**Figura 4.** Tonicidad en eritrocitos.

#### 5.6.4. Esterilidad

La esterilidad es un requisito relevante para todos los inyectables. Es por ello que las preparaciones parenterales se deben elaborar mediante procedimientos que aseguren su esterilidad y que evite de manera potencial la presencia de contaminantes y de pirógenos, así como crecimiento de microorganismos.

Cual sea el método de esterilización, se deben tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Tener un control riguroso de las condiciones de trabajo.
- El nivel de contaminación microbiana de materias primas, equipos y material empleado debe ser mínimo antes de la esterilización.
- Tener un control de la presencia de microorganismos en la materia prima.
- Tener procesos de esterilización validados o bien, validarlos.

Existen diferentes métodos de esterilización y estos son:

- Esterilización por calor: en este método los factores que pueden llegar a influir son la temperatura empleada, el tiempo de tratamiento, el medio en que se encuentren, el pH de la formulación, la especie microbiana y la cantidad inicial de gérmenes. A su vez existen dos tipos dentro de este método:
  - *Esterilización por calor seco*: los aparatos más utilizados son estufas y túneles de aire circulante. Las condiciones a manejar son 80°C/ 30 min y 170°C/ 1 h. Este método se emplea para esterilizar materiales de vidrio como son ampollas, viales, frascos, entre otros.
  - *Esterilización por calor húmedo*: este método es más eficaz que el seco. El aparato más empleado es el autoclave y las condiciones a manejar son 115°C/ 3 min, 120°C/ 20 min, y 135°C/3 min.
- Esterilización por óxido de etileno: el óxido de etileno es letal para los microorganismos, reacciona con las moléculas proteicas bloqueando con ello su metabolismo celular. El óxido de etileno es un gas inflamable, y por tanto no se usa puro, sino mezclado con dióxido de carbono. La esterilización se realiza empleando cámaras estancas, y puede trabajarse tanto a presión atmosférica como en vacío. Este gas se puede emplear también para esterilizar productos en

polvo, siempre que no reacciones con el óxido de etileno (Jato, 2001; Lozano, 2012).

- Esterilización por radiaciones ionizantes: este método se trata de radiaciones que ionizan y excitan a la molécula, dando lugar a reacciones químicas que producen efectos letales a los microorganismos. Son muy eficaces a temperatura ambiente, lo cual es una ventaja, sin embargo es un método caro, además, puede modificar las propiedades organolépticas del producto. Este método emplea dos tipos de radiaciones: electromagnéticas y corpusculares. Las primeras son producidas por elementos radiactivos, siendo  $\text{Co}^{60}$  y  $\text{Cs}^{137}$ . Las corpusculares, por otro lado, son haces de electrones acelerados por aceleradores electrostáticos, son de menor energía, poseen carga lo que les permite una buena orientación hacia el material a esterilizar (Jato, 2001; Lozano, 2012).
- Filtración esterilizante: es un proceso que permite separar de manera física los microorganismos de la solución, haciéndola pasar a través de un filtro. Existen dos tipos de filtros: filtros de profundidad y filtros de membrana. Para el primer caso, los microorganismos son separados por adsorción o por atracción electrostática pero el inconveniente es que pueden ceder fibras o partículas al líquido filtrado. Por otro lado las membranas filtrantes son, en general, finas. Para este caso los microorganismos son retenidos porque los filtros funcionan como tamices que los retienen. Para la esterilización esterilizante se emplean membranas de tamaño de poro de  $0.22 \mu\text{m}$  (Jato, 2001; Lozano, 2012).

La ventaja que ofrece este método esterilizante es que se utiliza para las soluciones inyectables que no toleran la acción del calor. Debido a esto aquellos productos que son sometidos a él no están aún en su envase definitivo (Jato, 2001).

#### 5.6.5. Libre de pirógenos

Los pirógenos son sustancias que, al ser administradas por vía parenteral, producen síntomas como fiebre acompañada de escalofríos, disneas, aceleración del pulso, cefaleas, mialgias y en cuadros intensos puede llegar a producir la muerte. Entre los pirógenos se encuentran sustancias tanto endógenas como exógenas, de naturaleza

biológica, química y mineral. En el primer caso están las hormonas tiroideas, las citoquinas y la adrenalina. Ahora bien por otro lado las exógenas se describen principios activos como son anfotericina B, la atropina, la vancomicina, adyuvantes (EDTA), partículas de sílice y otros procedentes de microorganismos como bacterias, virus y levaduras (Gupta & Brazeau, 1999; Jato, 2001).

Los pirógenos suelen ser termoestables y resisten la esterilización por autoclave; pasan a través de la mayoría de los filtros aunque pueden ser retenidos por filtros de profundidad y por sustancias adsorbentes.

Las fuentes de pirógenos en la solución inyectable pueden evitarse considerando lo siguiente:

- Vehículo: para eliminarlos del agua se debe llevar un tratamiento como por ejemplo la destilación.
- Materia prima: siempre y cuando el producto tolere temperaturas elevadas este se puede someter a 250°C/ 45 min o más tiempo a temperaturas un poco más bajas.
- Envase: el recipiente generalmente es de vidrio y lo mejor es emplear procedimiento agresivos, con ácidos y bases, y luego enjuagarlos con agua apirógena, o bien ser sometidos a temperaturas elevadas durante mucho tiempo.

Ahora bien, para la eliminación de pirógenos, pero los más conocidos y empleados es el método por filtración, por adsorción (con carbón activado) y otros (Sustancias oxidante como hipoclorito y agua oxigenada) (Lozano, 2012).

## 5.7. Potencial hemolítico de cosolventes

Los cosolventes se usan comúnmente en formulaciones parenterales para incrementar la solubilidad de fármacos con baja solubilidad. Cuando se usan cosolventes existe el riesgo de hemólisis en los eritrocitos a lo que conlleva la liberación de hemoglobina y otros componentes celulares al torrente sanguíneo, en parenterales V.I (Gupta & Brazeau, 1999).

El aumento de hemoglobina en plasma está asociado con muchas afecciones médicas no deseadas entre ellas, la disfunción renal, irritación vascular, anemia, flebitis, ictericia y en algunos casos la muerte (Ketan Amin, 2012). Por esta razón el potencial hemolítico de un cosolvente a administrar por vía parenteral, debe determinarse antes de su administración (Krzyzaniak & Yalkowsky, 1998).

Es preferible utilizar inyectables que son totalmente biocompatibles con los fluidos corporales, pero la incorporación de cosolventes dentro de las formulaciones parenterales durante mucho tiempo se ha reconocido que tienen el potencial de destruir eritrocitos, al igual que adicionar solo agua a la formulación (Pramod K. & Brazeau, 1999). Estos cosolventes tienen la habilidad para hemolizar células por acción osmótica o por destrucción de la membrana. Investigadores han demostrado que la composición de las formas de dosificación parenteral influye directamente en la hemólisis de los eritrocitos.

Easterly and Husa 1954, Thomasson and Husa 1958, Winters and Husa, Ku and Cadwallader 1975; fueron algunos de los primeros investigadores en exponer que la composición de las formas de dosificación parenteral influyen directamente en la hemólisis de los eritrocitos. Estos autores también demostraron que el efecto sobre los eritrocitos depende no solamente de la concentración del cosolvente sino también de la habilidad de penetrar o destruir la membrana celular (Gupta & Brazeau, 1999).

Krzyzaniak et al. 1997 realizaron una evaluación sobre el potencial hemolítico por cosolventes usando EtOH, glicerol, PG y PEG's. Determinaron un potencial hemolítico de los cosolventes en el siguiente orden: glicerina>PG>PEG 300> EtOH, aunque no hubo diferencia entre PEG 300 y EtOH en tiempos de contacto. Para todos los sistemas de cosolventes probados, el grado de hemólisis se vio aumentado en función de la composición del cosolvente así como del tiempo de contacto (Krzyzaniak, Alvarez Núñez, Raymond, & Yalkowsky, 1997; Krzyzaniak & Yalkowsky, 1998).

### **5.8. Enfoques para incrementar solubilidad en fármacos poco solubles**

En comparación con el gran número de medicamentos destinados a la administración oral, las formulaciones parenterales constituyen una proporción más limitada de los productos comercializados debido a la baja solubilidad de algunos fármacos, pues esto complica significativamente el desarrollo de formulaciones para vía parenteral ya que, en casi todos los casos, se requieren formulaciones de soluciones simples (Williams et al., 2013). Es así que al no disponer de una forma de sal más soluble del fármaco insoluble, se puede optar por otras estrategias que permitan aumentar la solubilidad del fármaco como es el empleo de aditivos como los cosolventes miscibles en agua, agentes acomplejantes (como son los derivados de ciclodextrina) y agentes activos de superficie. Si ninguno de estos aditivos funciona, entonces otra estrategia implica una formulación de

una forma de dosificación más compleja, como una emulsión o liposomas; en la tabla 4 se muestra el listado de las estrategias para aumentar la solubilidad de fármacos (Gupta & Brazeau, 1999). No obstante, de las estrategias más empleadas que permiten aumentar la solubilidad de fármacos, para la obtención de parenterales, está el uso de cosolventes. Los cosolventes comúnmente usados para promover la solubilidad en formulaciones parenterales son: etanol, propilenglicol (PG), polietilenglicol de bajo peso molecular (PEG 300 o 400) y dimetilacetamida (DMA) (Williams et al., 2013). Ver ejemplos de formulaciones con cosolventes en la tabla 5.

**Tabla 4.** Enfoques para incrementa la solubilidad.

- Formación de sal
- Ajuste de pH
- Uso de cosolventes
- Uso de agentes activos de superficie
- Uso de agentes de complejación
- Microemulsión
- Liposomas
- Micelas

**Tabla 5.** Ejemplos de productos parenterales comercializados que hacen uso de cosolventes.

Nombre general	Nombre comercial	Fabricante	Vía de administración	Cosolventes
Digoxin	Lanoxin®	Burroughs Wellcome	IM, IV	40% PG, 10% EtOH, pH 6.8
Trimetoprim-sulfametoxazol	Septra®	Glaxo Wellcome	IV	40% PG, 10% EtOH, 0.3% dietanolamina, 1% BA
Diazepam	Valium®	Roche	IM, IV	40% PG, 10% EtOH, 1.5% BA
Lorazepam	Activan®	Wyeth-Ayerst	IV	41% PG, 9% PEG 400, 2% BA
Pentobarbital	Nembutal®	Abbot	IV	40%PG, 10% EtOH, pH 9.5
Miconazol	Monistat®	Janssen	IV	11.5% Cremophor®EL
Multivitaminas	M.V.I. ®-12	Astra	IV	30% PG, 1.6% Tween80®, 0.028% Tween 20®
Clordiazepóxido HCl	Librium®	Roche	IM	20% PG, 1.5% BA

(Gupta & Brazeau, 1999)

6. PLAN EXPERIMENTAL

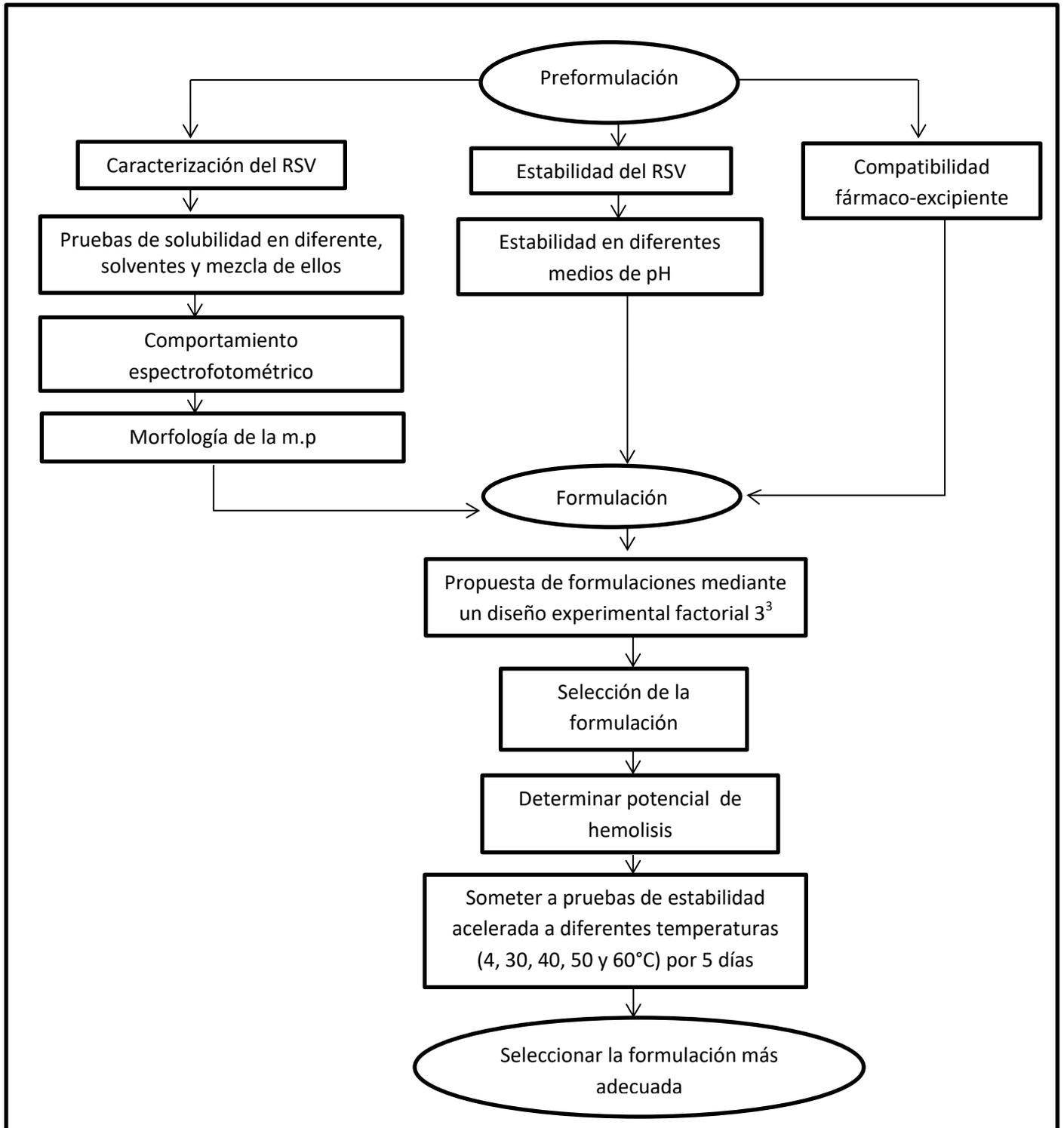
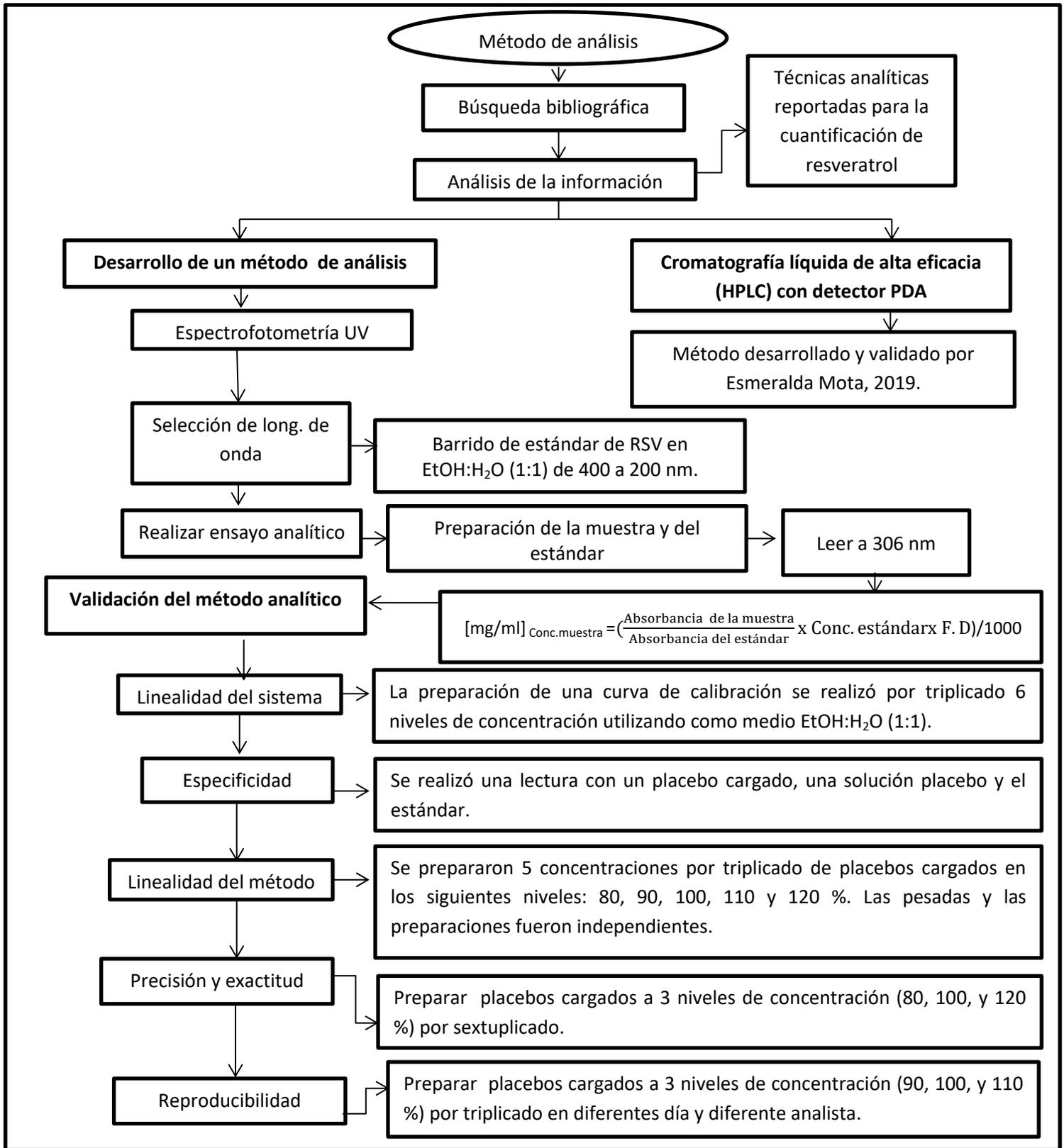


Figura 5. Diagrama metodológico para desarrollar la formulación de RSV.



**Figura 6.** Diagrama metodológico para desarrollar y validar el método para cuantificar RSV.

## 7. MATERIALES

### Reactivos y materias primas

- Resveratrol al 99 % de pureza, marca Sigma, Lote SLBV8562
- Resveratrol materia prima al 50 % de pureza, marca ALEPHQUIM<sup>®</sup>, Lote CH2-A-7092224, fecha de fabricación: Enero 2017, Caducidad: Mayo 2020
- Resveratrol al 95.2 % de pureza (marca desconocida)
- Agua tipo I de resistividad 18.2M $\Omega$ . cm a 25°C, Milli Q, equipo marca Millipore<sup>®</sup>
- Formiato de amonio al 99 % de pureza, marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>
- Acetonitrilo grado HPLC al 99.9 % de pureza, marca Fermont<sup>®</sup>
- Ácido fórmico grado grado RA al 89.2% de pureza, marca Tecsiquim<sup>®</sup>
- Metanol grado ACS al 99.9 % de pureza, marca Fermont<sup>®</sup>
- Etanol grado ACS al 99.9 % de pureza, marca Fermont<sup>®</sup>
- Hidróxido de sodio escamas, al 98.4 % de pureza, marca J.T Baker<sup>®</sup>
- Buffer de ácido clorhídrico pH 2
- Buffer de fosfatos pH 5.8
- Buffer de fosfatos pH 7
- Buffer de fosfatos pH 8
- Propilenglicol
- Polietilenglicol 400

### Material

- Piseta de plástico
- Espátula
- Barra magnética
- Vaso de precipitados de 500 mL
- Vaso de precipitados de 50 mL
- Vaso de precipitados de 10 mL
- Pipetas volumétricas de 0.5 mL, 1 mL y 5 mL
- Matraz volumétrico de 25 mL

- Matraz volumétrico de 20 mL
- Matraz volumétrico de 10 mL
- Micropipeta Labsystems
- Tubos de ensaye 15 mL
- Tubos con EDTA

## 8. EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Espectrofotómetro UV/Vis modelo Cary 100 Conc. Varian
- HPCL Waters™ 996 PDA detector, modelo código 996, bomba cuaternaria Waters 616 Pump, modelo código 616; Sistema controlados de entrega de multisolvente Waters 600 controller, modelo código 6CE; Automuestrador Waters 717 plus autosamples, modelo código 717P colocar tipo de bomba y de inyector modelo. Software Empowers 2.0.
- Columna Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm, Irlanda) No. De serie: W23331X020
- Balanza analítica OHAUS modelo AP250D
- Microscopio electrónico de barrido modelo JSM-6010LA, JEOL
- Baño de ultrasonido Elmasonic s40H. Elma®
- Agitador magnético
- Potenciómetro Seven Multi, marca Mettler Toledo GmbH, modelo Seven-Multi, número de serie 1227257138.

## 9. METODOS

### 9.1. Estudios de pre-formulación

#### 9.1.1. Comportamiento espectrofotométrico del resveratrol

Se preparó una solución estándar del resveratrol marca Sigma, Lote SLBV8562; a una concentración de 4.2 µg/mL, empleando como medio una mezcla de Etanol:Agua (1:1) y se realizó un barrido de 200 a 400 nm en un Espectrofotómetro UV/Vis modelo Cary 100 Conc. Varian.

#### 9.1.2. Solubilidad

La solubilidad del resveratrol se evaluó de manera cualitativa y para ello se pesaron de manera independiente nueve muestras de 500 mg de resveratrol m.p, marca ALEPHQUIM<sup>®</sup>, Lote CH2-A-7092224; posteriormente con ayuda de una espátula pequeña se fueron agregando pequeñas cantidades de RSV m.p en un volumen de 10 mL de los siguientes medios mientras se encontraban en agitación magnética y a temperatura ambiente:

- Agua
- Propilenglicol
- Polietilenglicol 400
- Etanol
- Polietilenglicol 400:Etanol:Agua (60:10:30)
- Propilenglicol:Etanol:Agua (60:10:30)
- Propilenglicol:Polietilenglicol 400 (50:50)
- Propilenglicol:Etanol (50:50)
- Etanol:Agua (50:50)

Mientras se agregaba poco a poco las cantidades de RSV m.p en los diferentes medios, se fue observando hasta que momento el medio ya no disolvió más el RSV y se dejó de

agregar. El resto de la materia prima que se pesó en un principio se volvió a pesar y se determinó la cantidad disuelta de resveratrol con la siguiente formula:

$$\text{mg disueltos de RSV/mL} = \frac{\text{Peso inicial del RSV m. p (mg)} - \text{Peso final del RSV m. p (mg)}}{\text{volumen del solvente(mL)}}$$

### 9.1.3. Morfología

El análisis morfológico del resveratrol m.p y estándar fue a través del microscopio electrónico de barrido (modelo JSM-6010LA, JEOL) con un voltaje de aceleración de 15 kV. Las muestras se colocaron en cinta adhesiva de doble cara sobre soportes de aluminio para obtener una capa uniforme de partículas, las cuales se revistieron con oro usando un metalizador por pulverización (modelo Desk V, Denton Vacuum) con una corriente de 7 miliamperios y una presión de 50 millitorr durante 300 segundos.

Se obtuvieron las micrografías y se realizó la comparación morfológica del resveratrol m.p y estándar.

### 9.1.4. Estabilidad de la materia prima de resveratrol en diferentes medios de pH

Para determinar la estabilidad del resveratrol en condiciones ácidas, neutras y básicas se seleccionaron cuatro medios de pH 2.0, 5.8, 7.0, 8.0 y un medio básico formada de una solución de NaOH 1N. La selección de los diferentes medios de pH fue basándose en algunos estudios de estabilidad del resveratrol ya realizados en función del pH donde usan valores de pH 2 hasta pH 10 a diferentes temperaturas (López-Nicolás & García-Carmona, 2008; Robinson, Mock, & Liang Dong, 2017; Zupancic et al., 2015), sin embargo para el presente estudio la temperatura fue constante resguardando las muestras a temperatura ambiente y cubiertas de la luz ambiental durante 12 días haciendo el análisis de estas el día 0, día 3 y el día 12 utilizando un espectrofotómetro UV/Vis modelo Cary 100 Conc. Varian y HPCL Waters™ 996 PDA detector, modelo código 996, bomba cuaternaria Waters 616 Pump, modelo código 616; Sistema

controlados de entrega de multisolvente Waters 600 controller, modelo código 6CE; Automuestrador Waters 717 plus, modelo código 717P colocar tipo de bomba y de inyector modelo. Software Empowers 2.0.

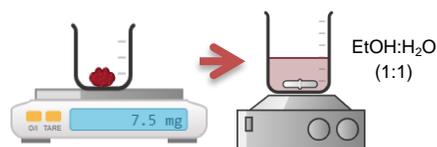
Para la obtención de los medios de pH se prepararon soluciones amortiguadoras de ácido clorhídrico pH 2.0, fosfatos pH 5.8, 7.0 y 8.0; y un medio alcalino de una solución de NaOH 1N; todo lo anterior fue preparado de acuerdo con las pautas de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP).

**Tabla 6.** Resumen de condiciones de análisis de estabilidad en diferentes medios de pH.

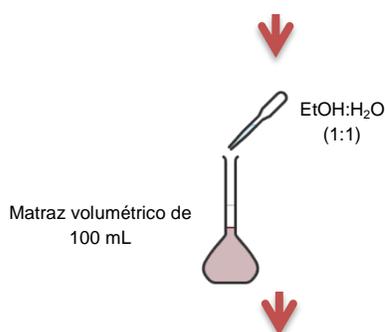
Medios	Temperatura	Tiempo de estudio	Tiempos de análisis	Técnicas de análisis
Solución amortiguadora de ácido clorhídrico pH 2.0 Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.8, 7.0 y 8.0 Solución de NaOH 1N	Ambiente	12 días	Día 0 Día 3 Día 12	Espectrofotómetro UV/Vis modelo Cary 100 Conc. Varian a una longitud de 360 nm.  HPCL Waters™ 996 PDA detector; las condiciones cromatográficas se pueden consultar en anexos en el apartado 14.5.

La preparación de las muestras se realizó con el siguiente procedimiento:

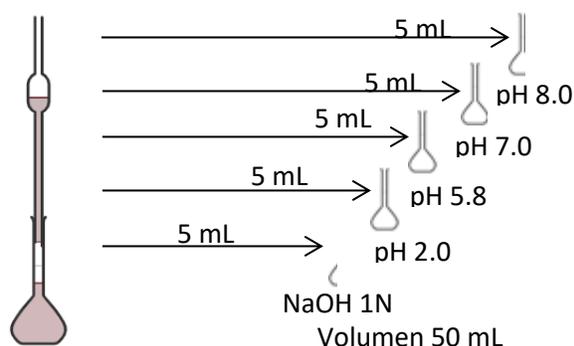
1. Se pesaron 7.5 mg de resveratrol m.p en un vaso de precipitado de 50 mL; se vertió 30 mL de una mezcla de Etanol:Agua (1:1) al vaso que contenida el RSV y se sometió a agitación magnética hasta solubilizar completamente.



2. Se transfirió la solución anterior a una matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen de 100 mL con Etanol:Agua (1:1).



3. De la solución anterior se tomaron alícuotas de 5 mL de la solución y se llevó a volumen de 50 mL empleando soluciones amortiguadoras de ácido clorhídrico pH 2.0, fosfatos pH 5.8, 7.0 y 8.0; y un medio alcalino de una solución de NaOH 1N.



4. Las muestras fueron analizadas, junto con una solución estándar de resveratrol (7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) por cromatografía y espectrofotometría el día 0, día 3 y día 12 para evaluar la señal analítica.

### 9.1.5. Compatibilidad fármaco-excipientes

Se realizó una prueba de compatibilidad del resveratrol con los cosolventes a usar en la formulación (PG, PEG400 y etanol), disolviendo el resveratrol en mezclas de ellos. Para el análisis se emplearon técnicas como espectrofotometría y cromatografía con la finalidad de evaluar que la respuesta analítica del resveratrol no presentara un

comportamiento atípico al combinarse con los excipientes. Para el análisis de las muestras se realizó el siguiente procedimiento:

1. Se pesaron 105 mg de resveratrol m.p y se disolvieron en 10 mL de una mezcla de PEG 400 60 %:Etanol 20 %:Agua 20 % y otra mezcla de PG 60 %:Etanol 30 %: Agua 10 % en un vaso de precipitado de 50 mL; luego en un matraz volumétrico se llevó a volumen de 25 mL con el mismo medio correspondiente.
2. Posteriormente se tomó una alícuota de 0.5 mL, de la solución obtenida en el paso 1., Correspondientes a cada muestra y se colocó en otro matraz volumétrico llevando a volumen de 25 mL con Etanol:Agua (1:1).
3. Finalmente se tomó otra alícuota de 1 mL, de la solución obtenida en el paso 2., y se colocó en otro matraz llevando a volumen de 20 mL con Etanol:Agua (1:1).
4. Se preparó también una solución estándar (4.2  $\mu\text{g/mL}$ ); se analizaron las muestras y la solución estándar por HPLC y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes (condiciones cromatográficas en anexos apartado 14.5.), también se analizaron en un espectrofotómetro realizando un barrido de 400 a 200 nm.

## 9.2. Estudios de formulación

### 9.2.1. Diseño experimental para obtener una solución óptima de resveratrol

Para seleccionar una solución inyectable óptima de resveratrol se estableció un diseño de experimentos cuyo tamaño de lote fue de 10 mL cada experimento; con el cual se buscó encontrar una solución que fuera físicamente estable, es decir, translúcida y que no presente partículas insolubles o sedimentos.

Se planteó un diseño factorial  $3^3$ , con tres factores, cada uno con tres niveles. Los factores que se probaron fueron tres cosolventes: propilenglicol (PG), polietilenglicol (PEG 400) y etanol (EtOH) a tres niveles cada uno (Tabla 7) manteniendo la cantidad de resveratrol constante, los resultados de las variables de respuesta se reportaron en la matriz del diseño de la Tabla 8.

Tabla 7. Diseño experimental 3<sup>3</sup>.

Factores (unidades)	Código	Niveles		
		-1	0	1
Propilenglicol (p/p%)	PG	0	30	60
Polietilenglicol (p/p%)	PEG 400	0	30	60
Etanol (p/p%)	EtOH	10	20	30

Tabla 8. Matriz del diseño experimental.

No. Ensayo de formulación	Factores			Respuestas		
				UV/Vis	HPLC	pH Iny
	PG	PEG 400	EtOH	Contenido de RSV (%)	Contenido de RSV (%)	
F1	1	1	-1			
F2	-1	1	-1			
F3	-1	0	0			
F4	-1	1	1			
F5	-1	1	0			
F6	-1	-1	0			
F7	-1	-1	1			
F8	-1	-1	-1			
F9	-1	0	-1			
F10	-1	0	1			
F11	0	-1	-1			
F12	0	-1	1			
F13	0	1	0			
F14	0	0	0			
F15	0	0	-1			
F16	0	1	1			
F17	0	1	-1			
F18	0	0	1			
F19	0	-1	0			
F20	1	0	1			
F21	1	1	1			
F22	1	0	-1			
F23	1	-1	1			
F24	1	-1	-1			
F25	1	0	0			
F26	1	-1	0			
F27	1	1	0			

Las variables de respuesta evaluadas fueron el pH de la formulación y el contenido de resveratrol en porcentaje determinado por la técnica de espectrofotometría y cromatografía de líquidos de alta resolución. El programa empleado para el análisis de los datos fue el software Statgraphics Centurion XV versión 15.2.05

El tratamiento de los ensayos se describe en el punto 14.6 en anexos.

### 9.3. Potencial hemolítico

La prueba del potencial hemolítico fue realizado de acuerdo al método desarrollado por Castillo, 2008 (Castillo, 2008).

1. Se obtuvo sangre periférica humana y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos.
2. Una vez centrifugadas las muestras se removi6 el plasma y posteriormente se lav6 el paquete globular con buffer de S6rensen pH 7.4 y se volvi6 a centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos.
3. Se realiz6 un lavado del paquete globular 3 veces con buffer S6rensen pH 7.4 y despu6s de cada lavado se centrifug6 a 2500 rpm por 10 minutos.
4. Despu6s de la centrifugaci6n se transfirieron 10 mL de paquete globular a un tubo de ensaye.
5. Se agreg6 15 mL de buffer S6rensen pH 7.4 y se mezcl6 por inversi6n cuidando no formar burbujas.
6. Se prepararon los sistemas como se indica a continuaci6n:

▪ Control positivo	▪ Control negativo	Muestra problema
Colocar 5 mL de sangre reconstituida y agregar 0.5 mL de Extran MA02 (neuro concentrado).	Colocar 5 mL de sangre reconstituida y agregar 0.5 mL de buffer de S6rensen.	Colocar 5 mL de sangre reconstituida y agregar 0.5 mL de cada formulaci6n respectivamente con la muestra.

7. Los tres sistemas se mezclaron por inversión 3 veces y se colocaron los tubos en baño maría a 37°C durante 10 minutos. Transcurridos los 10 minutos, los tubos se sometieron nuevamente a centrifugación a 2500 rpm por 10 minutos.

8. Después de la centrifugación se separó el sobrenadante del paquete globular y se tomaron 100 µL de la muestra y se transfirieron a un tubo de ensaye limpio al cual se le agregó posteriormente 4.9 mL de buffer Sörensen para obtener un volumen final de 5 mL. De igual manera se realizó este tratamiento para el control positivo y el control negativo.

9. Las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro en el visible a 541 nm y se calculó el porcentaje de hemólisis para cada formulación con la siguiente formula:

$$\% \text{hemólisis} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra} - \text{Absorbancia del control (-)}}{\text{Absorbancia del control (+)}} \times 100$$

#### 9.4. Estudio de estabilidad

El estudio de estabilidad acelerada se realizó con la finalidad de seleccionar la mejor formulación. Para dicho estudio se emplearon las formulaciones óptimas obtenidas en la etapa de formulación y se propusieron dos envases de uso para inyectables y llevar a cabo la estabilidad en ellos. Los envases seleccionados fueron en frascos viales transparentes y ámbar cuyo material de vidrio por el cual están hechos es desconocido.

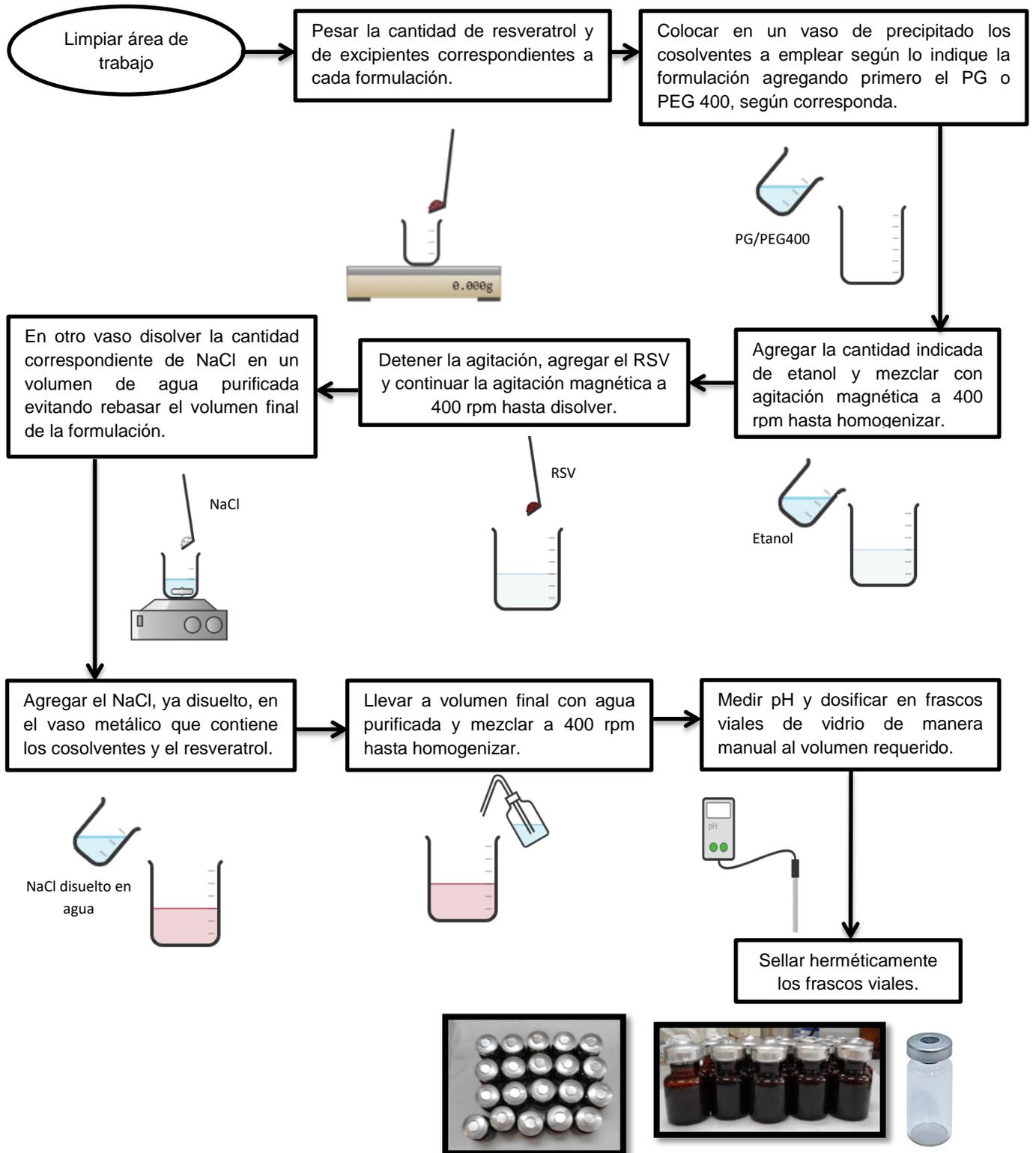
Para realizar el estudio de estabilidad se trabajó con el siguiente procedimiento:

1. Se preparó 1 lote de 500 mL de cada formulación seleccionada para estabilidad.
2. Se realizó una primera lectura al lote de cada formulación y para ello se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución parenteral, se colocó en un matraz volumétrico de 25 mL llevando posteriormente a volumen con Etanol:Agua (1:1), de esta solución se tomó otra alícuota de 1 mL, se colocó en un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con

Etanol:Agua (1:1). Se leyó la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 306 nm.

3. El lote correspondiente a cada formulación se dosificó manualmente en 20 frascos viales de vidrio y 20 frascos ámbar de vidrio colocando en cada uno 10 mL y 4 mL de la solución parenteral respectivamente para cada recipiente.
4. Una vez dosificada la solución parenteral en los diferentes recipientes y correspondiente a la formulación, se sometieron a estabilidad en cinco diferentes temperaturas (4, 30, 40, 50 y 60°C) colocando en cada temperatura 4 frascos viales de vidrio y 4 frascos ámbar de vidrio de cada formulación.
5. Se realizó el muestreo cada 24 horas por 5 días. El tratamiento de la muestra fue la misma descrita en el punto 2.
6. Se aplicó la ecuación de Arrhenius para estimar su fecha de caducidad.

### 9.5. Propuesta de procedimiento de fabricación

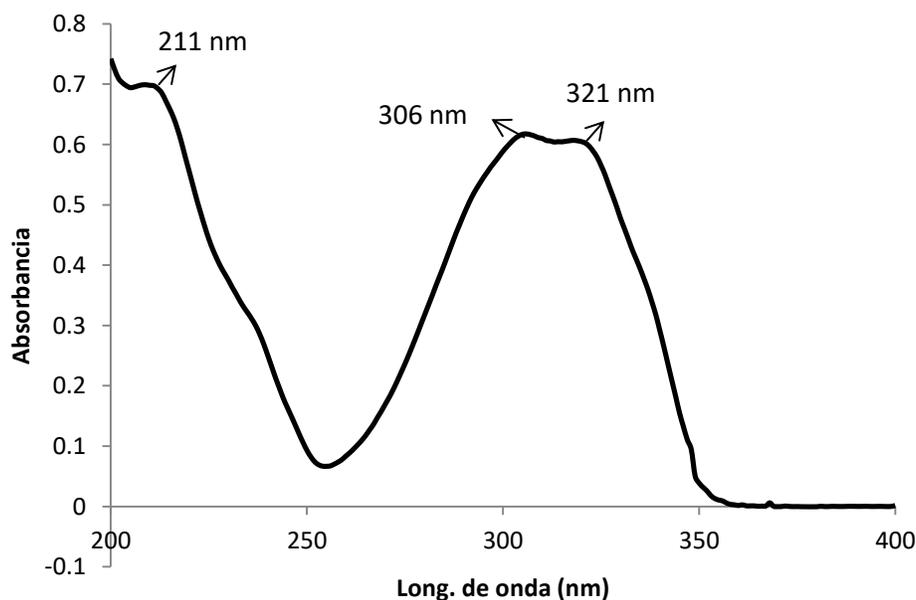


## 10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 10.1. Estudios de pre-formulación

#### 10.1.1. Comportamiento espectrofotométrico

Los resultados obtenidos en el barrido espectrofotométrico del resveratrol de una solución estándar a 4.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en medio de disolución EtOH: Agua (1:1) se muestran en la Figura 7, donde se puede observar su comportamiento espectral en el cual se aprecian tres puntos máximos de absorción a las longitudes de onda de 211, 306 y 321 nm, sin embargo se eligió la longitud de onda a 306 nm debido a que hay menor ruido con respecto a la longitud de onda de 211 nm y además existe mayor absorbancia en comparación a la longitud de onda de 321 nm. La longitud de onda de 306 nm y el comportamiento obtenido coincide con lo reportado (Zupancic et al., 2015).



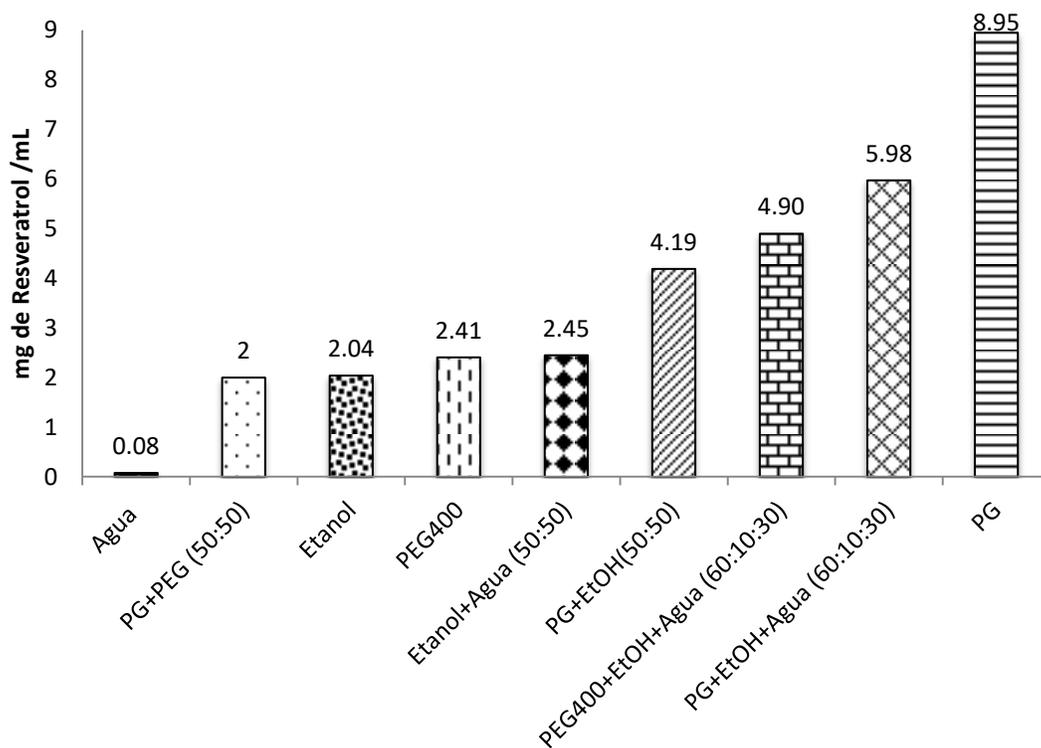
**Figura 7.** Barrido de estándar de resveratrol para determinar comportamiento espectrofotométrico.

### 10.1.2. Solubilidad

La solubilidad se refiere a la cantidad máxima de una sustancia a disolver en un solvente específico a una temperatura determinada y que se mantiene en solución sin recristalizar o precipitar (Hernández, 2005). Esta es una propiedad importante a determinar para activos que van a ser formulados en solución, como es el caso del RSV en el presente trabajo, pues aquellos deben encontrarse en concentraciones por debajo de su punto de saturación de modo que se esté asegurando que la solución se mantendrá estable (Hernández, 2005).

Cuando un activo presenta baja solubilidad en agua existen métodos para mejorar la solubilidad, de este modo para el presente estudio se seleccionó el método de adición de cosolventes y por lo tanto se realizaron pruebas de solubilidad del RSV en cosolventes.

Las pruebas de solubilidad para el resveratrol mp en los diferentes sistemas de cosolventes se muestran en el Figura 8 indicando los miligramos de RSV disueltos por mililitro de cosolvente puro y mezclas de ellos. Con la finalidad de determinar el sistema adecuado que permitiera obtener el RSV en solución, se realizaron pruebas de solubilidad del RSV en agua, PEG 400, PG y EtOH. Los cosolventes empleados para las pruebas solubilidad ya se han utilizado ampliamente para formulaciones parenterales que presentan casos donde el fármaco es de baja solubilidad (Lamas et al., 2006) y por ello fueron seleccionados para el desarrollo de la formulación.



**Figura 8.** Solubilidad del resveratrol en diferentes solventes.

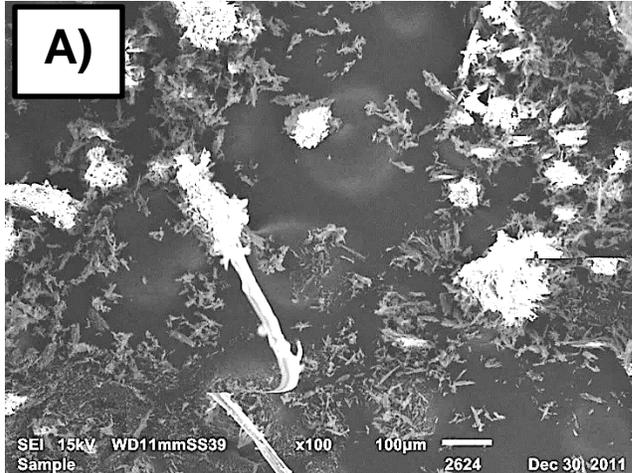
En la Figura 8, puede observarse que los cosolventes puros en los que el RSV presenta mayor solubilidad son el PG y PEG 400, obteniendo una solubilidad del 8.95 mg/mL y 2.41 mg/mL respectivamente. En los sistemas de mezclas de cosolventes, la Figura 8 muestra que los sistemas de mezclas que permitieron mayor solubilidad del RSV fueron PEG400:EtOH:Agua (60:10:30), PG+EtOH:agua (60:10:30), obteniendo una solubilidad del 4.90 mg/mL y 5.98 mg/mL para cada caso. En cada muestra la agitación fue magnética manteniéndola constante desde el momento en que se empezó a agregar el activo hasta que se observó que no se disolvió más, una vez detenida la agitación se determinó la cantidad disuelta de resveratrol.

De acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS) el resveratrol está en la lista de clasificación II, es decir, baja solubilidad y alta permeabilidad. Una solución

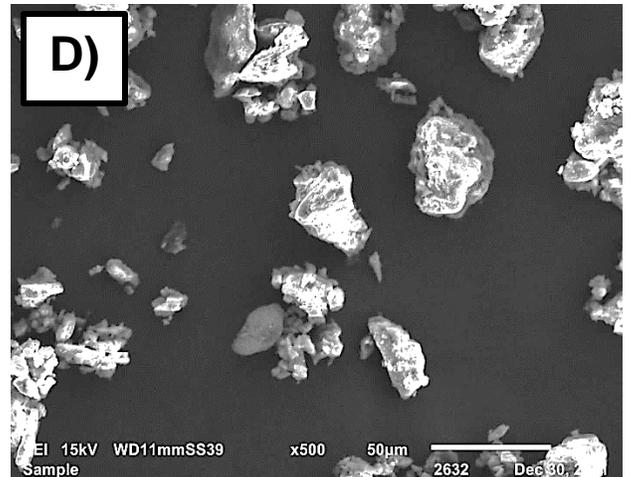
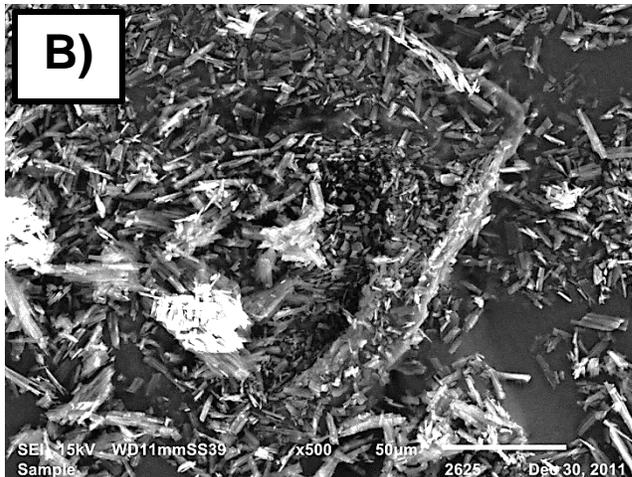
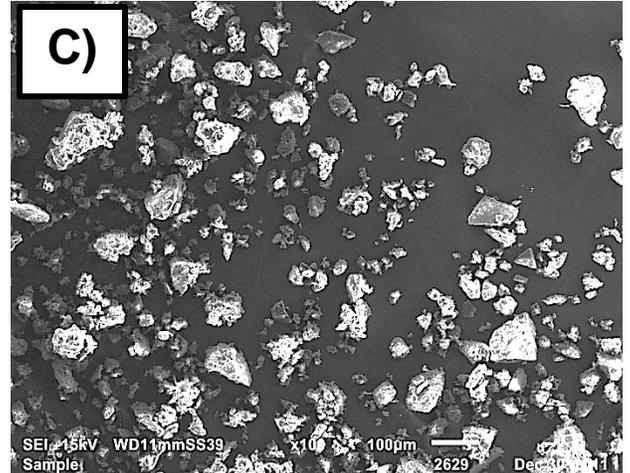
acuosa no es una opción debido a las limitaciones que presenta ya que se obtuvo una solubilidad de 0.08 mg/mL en agua como se muestra en la Figura 8.

### 10.1.3. Morfología

Estándar de RSV



Materia prima



**Figura 9.** Morfología del resveratrol.

Para la caracterización morfológica del resveratrol estándar y materia prima, se hizo un barrido en microscopio electrónico. Tal y como se muestra en la Figura 9 el estándar difiere del hábito cristalino que presenta la materia prima de RSV, se observó que el estándar tenía forma de pequeñas agujas y en materia prima este posee un hábito cristalino en forma de gránulos los cuales en el cuadro C), que se encuentra a X100, se observan dispersos y no aglomerados como en el cuadro A) con el estándar.

#### 10.1.4. Estabilidad del resveratrol en diferentes medios de pH

Se realizó la prueba de estabilidad de resveratrol a diferentes pH's con la finalidad de poder seleccionar un pH adecuado que permita conservar de mejor manera el activo y poder mantener esas condiciones en las formulaciones a plantear en la etapa de formulación. Para esto el RSV fue sometido durante 12 días en medios de pH 2.0, 5.8, 7.0, 8.0, y en una solución de NaOH 1N muestreando en el día 0, día 3 y día 12. Se evaluó la degradación del RSV por UV/VIS y HPLC empleando un método indicativo de estabilidad desarrollado y validado (Mota Lugo, 2019).

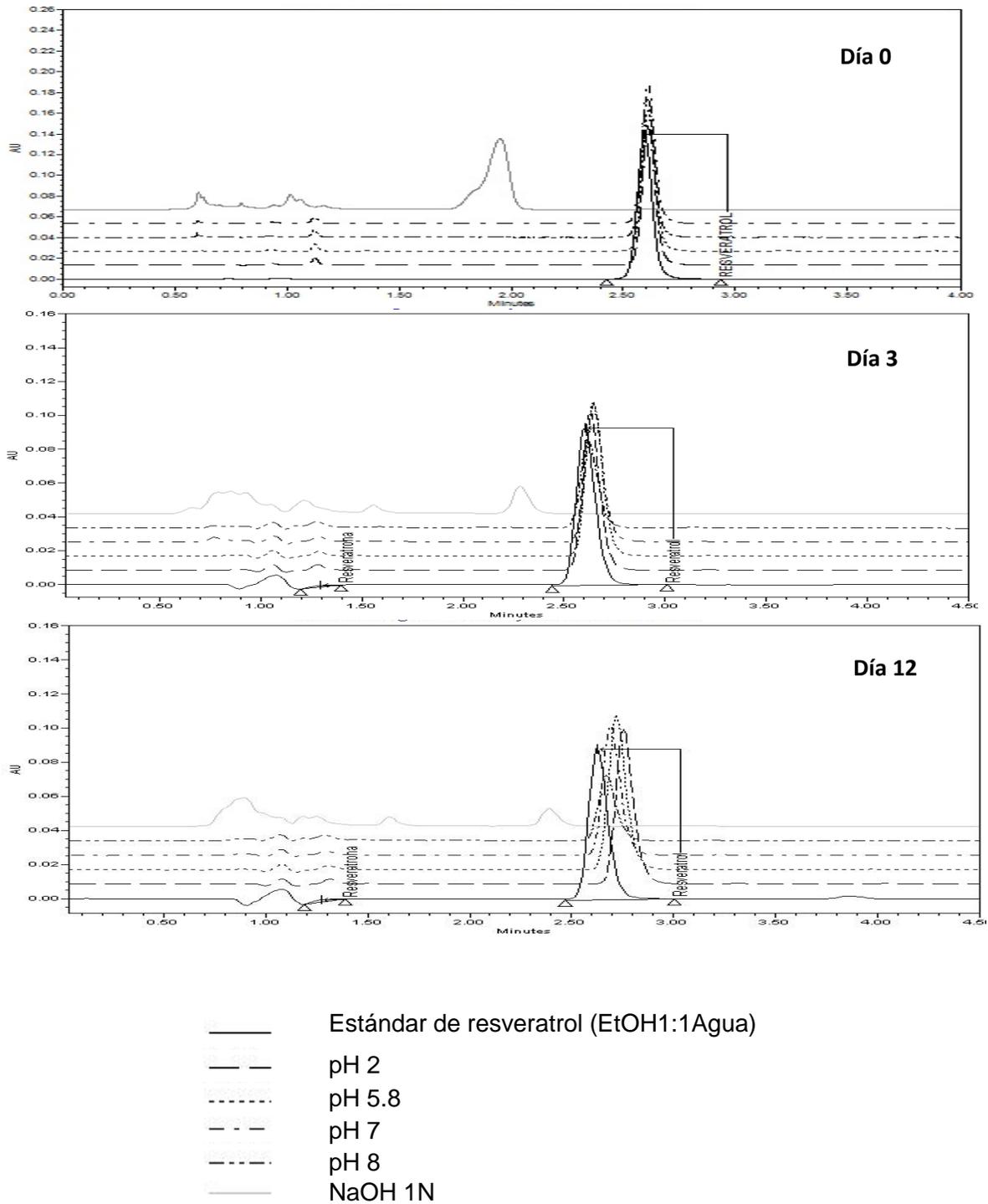
Los resultados sobre la estabilidad del resveratrol en diferentes pH's se muestran en la Figura 10 y Figura 11. En relación a la Figura 10 se observó que en el día 0 el resveratrol presenta degradación en la solución de NaOH 1N, en el cromatograma no se observa un pico de respuesta correspondiente al RSV, pero sí hubo presencia de otros picos de respuesta no asociados al RSV lo que puede indicar que estos sean posibles productos de degradación. Así mismo la degradación del RSV en la solución de NaOH 1N también es evidente en los espectros UV/VIS, mostrados en la Figura 11, ya que muestran un comportamiento diferente que no pertenece al RSV además de un cambio en su longitud de onda máxima donde se presenta el máximo de absorción del resveratrol pasando de 306 nm a 345 nm. En cuanto a la estabilidad del RSV en pH 2.0, 5.8, 7.0 y 8.0 en el día 0 tanto en la Figura 10 como en la Figura 11 muestran, para el primer caso, un pico de respuesta del RSV sin disminución del área y, para el segundo caso, un comportamiento espectral correspondiente al RSV, lo que indica que el día 0 el RSV no presentó degradación en medios de pH 2.0, 5.8, 7.0 y 8.0.

En el día 3 se observa que la estabilidad del RSV se mantiene en pH 2.0, 5.8, 7.0 y 8.0, pues existe la presencia de los picos de respuesta del resveratrol en el cromatograma sin disminución de su área, y por ello no se muestran productos de degradación en comparación como fue el caso en el medio de NaOH 1N desde el día 0. Para el caso del espectro UV/VIS se muestran con un comportamiento estable en los pH's bajos y no hay disminución de las absorbancias lo que indica que el resveratrol no se está degradando en estos medios.

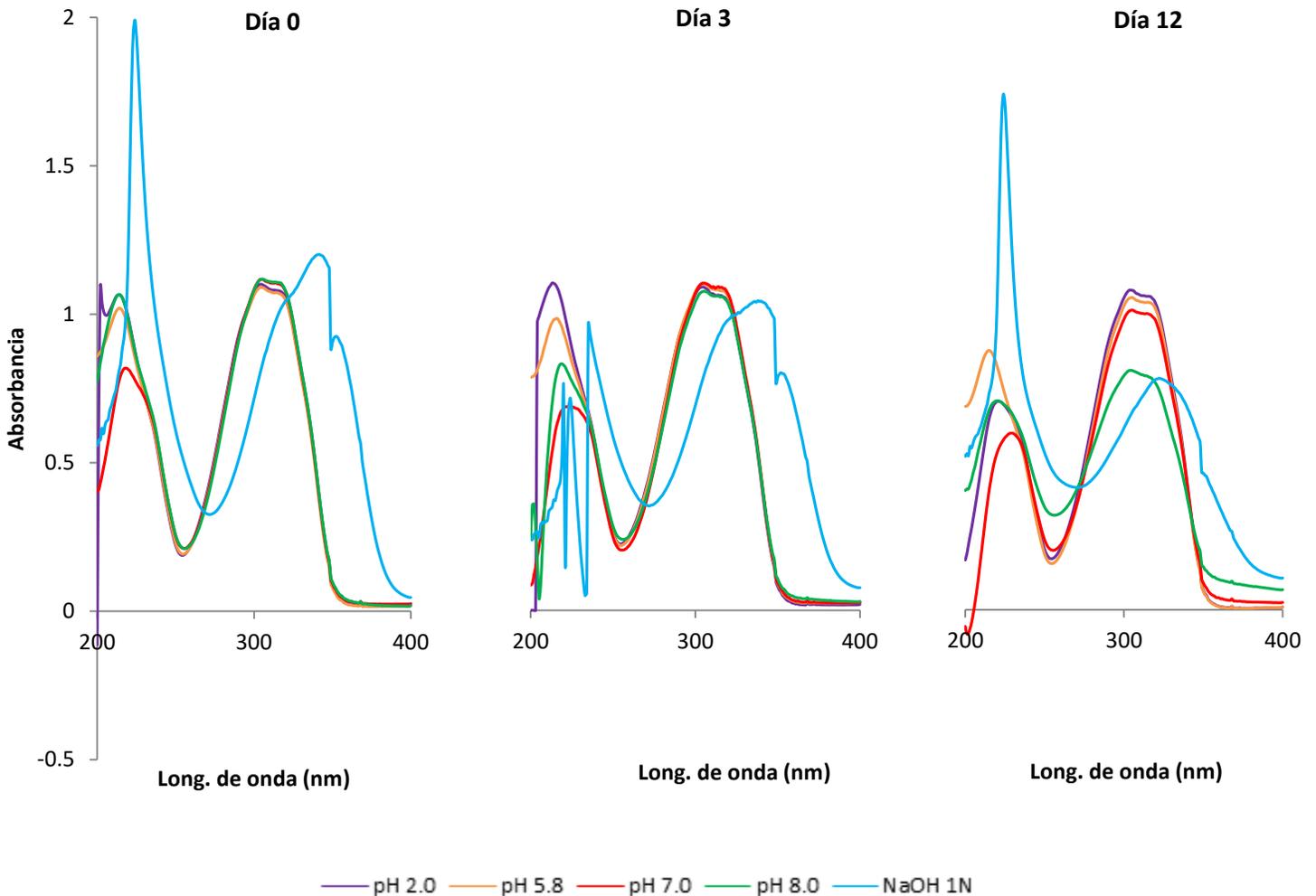
Para los resultados obtenidos del RSV en el día 12 se puede observar, en cuanto al espectro UV/VIS (Figura 11), la degradación del resveratrol en pH 7.0 y 8.0 las

absorbancias empiezan a disminuir, y aunque no se observa en el cromatograma (Figura 10) un posible producto de degradación este puede estar presente con un área de pico aun no tan evidente.

Estudios han demostrado que el resveratrol presenta mayor estabilidad en pH ácidos que en medios alcalinos, se ha evidenciado que su degradación comienza a partir de pH 6.8 pero es lenta y de pH 8-10 la degradación es más rápida (Robinson et al., 2017; Zupancic et al., 2015) como fue en el caso del día 0 en la solución de NaOH 1N que es un medio muy alcalino y por tanto el RSV presentó una rápida degradación.

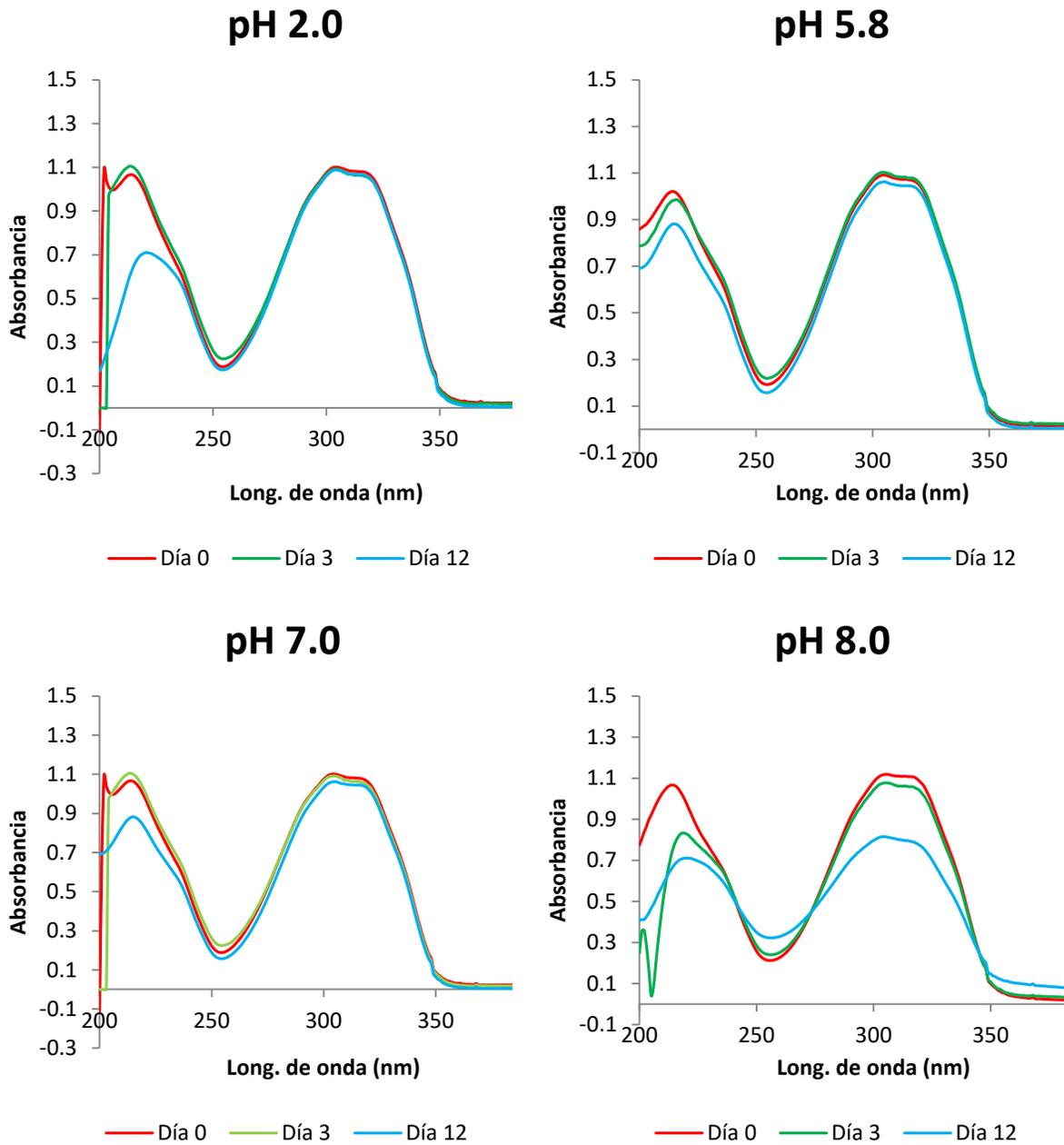


**Figura 10.** Comparación de cromatogramas de RSV mostrando su estabilidad en diferentes pH's en los diferentes días.



**Figura 11.** Comparación de espectros de RSV mostrando su estabilidad en diferentes pH's en los diferentes días.

Los resultados de estabilidad del RSV, basándose en los cromatogramas obtenidos y espectros UV/VIS, se establece que el RSV muestra mayor estabilidad a pH 2.0 al no presentar una disminución de la absorbancia (Figura 11) pero tampoco en el área del pico de respuesta, seguido del pH 5.8 y 7.0 donde la disminución de RSV es a penas notoria al día 12 de evaluación en comparación con el medio de pH 8.0 donde la degradación es evidente al día 12 pero se observó desde el día 3 con la disminución de la absorbancia (Figura 11). Por lo tanto el RSV presentará mejor estabilidad en medios ácidos que en medios alcalinos.



**Figura 12.** Degradación del resveratrol en pH 2.0, 5.8, 7.0 y 8.0.

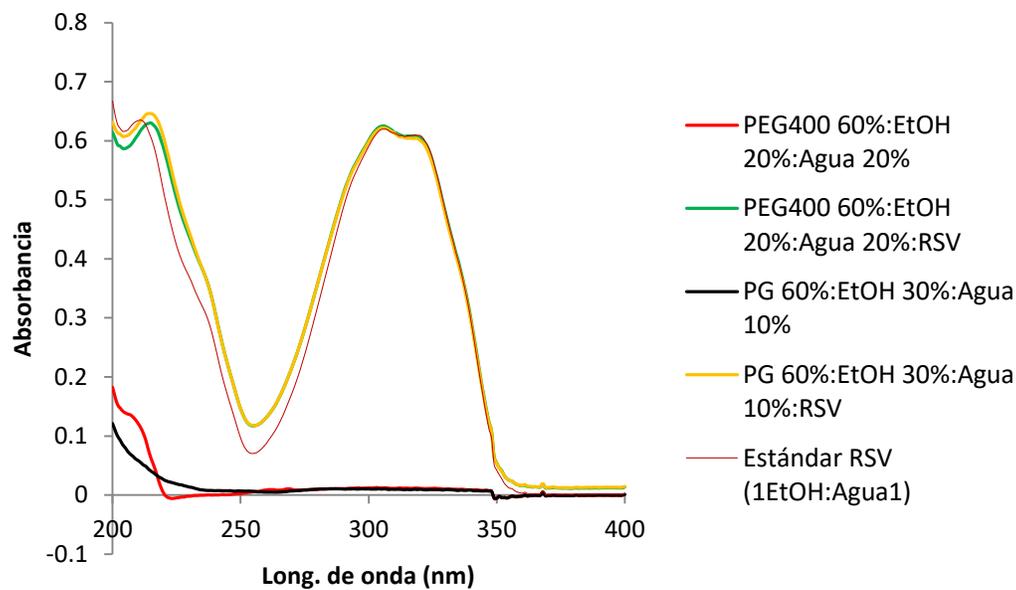
### 10.1.5. Compatibilidad fármaco-excipientes

Los resultados de compatibilidad del RSV con los solventes seleccionados se muestran en el Figura 13 y Figura 14, donde se observó el comportamiento de espectro UV/VIS y a su vez se evaluó por HPLC para presenciar posible incompatibilidad química. Los porcentajes seleccionados a los cuales se mezclaron los cosolventes fueron seleccionados de acuerdo a los recomendados por el libro de excipientes farmacéuticos (Rowe, Sheskey, Cook, & Quinn, 2013) y la base de datos de la FDA para ingredientes inactivos aprobados para productos farmacéuticos.

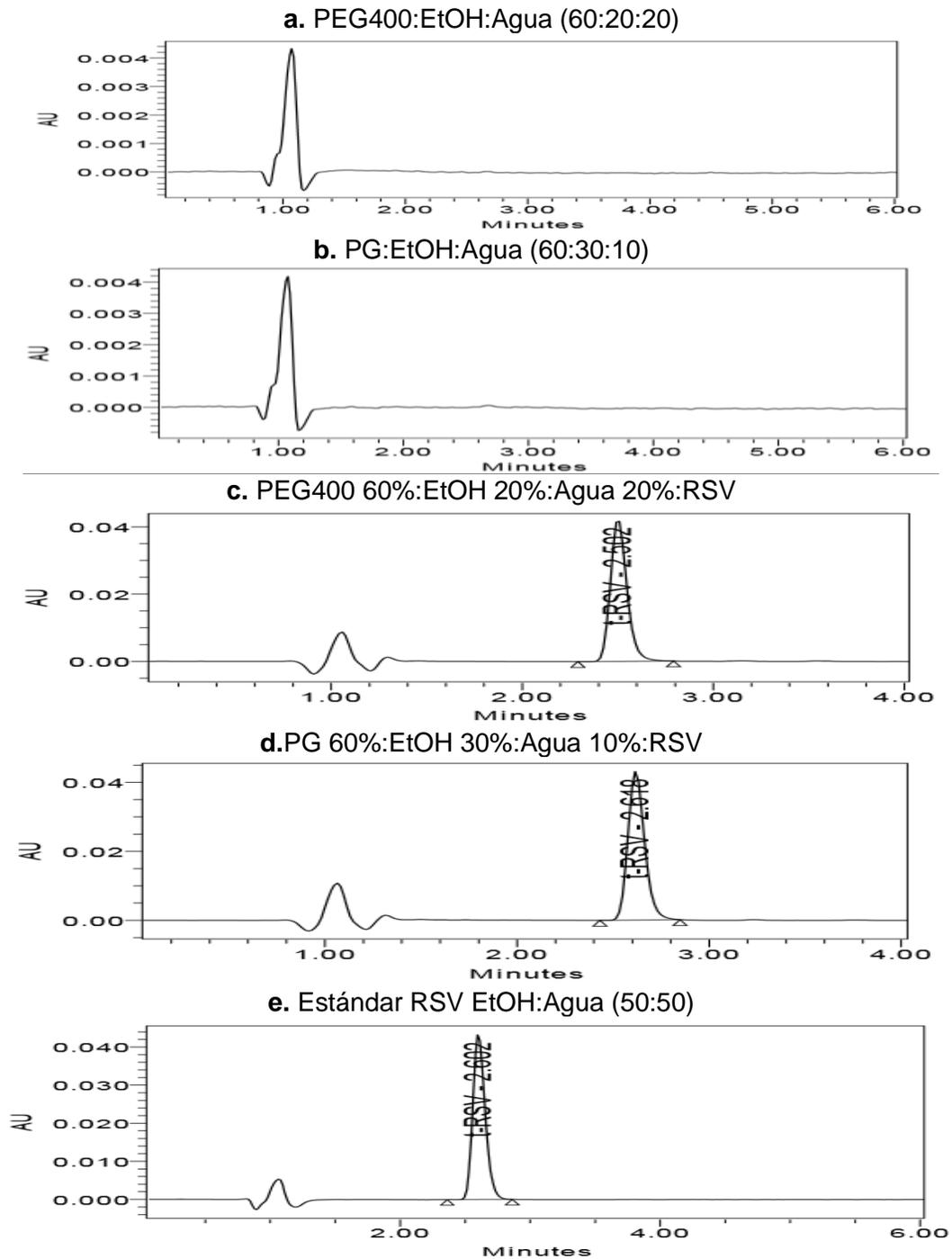
Para la determinación de compatibilidad se prepararon placebos, soluciones de RSV a una concentración de 4.2 µg/mL en las mezclas de solventes y una solución estándar de referencia de RSV a la misma concentración de la muestra. Todo lo anterior con la finalidad de evaluar cambios en la respuesta analítica que no estuvieran asociados con el RSV por posible incompatibilidad, es decir, sí hubiera un cambio en el comportamiento espectral, para el caso de la técnica espectrofotométrica, o bien una disminución en la respuesta analítica, entonces habría una incompatibilidad por una posible interacción fármaco-excipiente; de la misma manera se vería reflejado esto al realizar un análisis por HPLC con la ausencia o la disminución del área del pico de respuesta.

Los cosolventes evaluados en mezcla fueron: PEG 400, PG y EtOH con los cuales fue compatible el RSV químicamente al observar los espectros UV/VIS no existe un comportamiento atípico en la respuesta analítica en comparación con un estándar de referencia lo cual se confirma al analizar las muestras por cromatografía ya que el cromatograma muestra los picos de respuesta sin cambios en el área y la aparición de otro picos atribuibles a posibles productos de degradación (Figura 14). También se observó que los placebos preparados con las mezclas de solventes no dan respuesta analítica en el UV/VIS y tampoco en cromatografía debido a que son compuestos que no tienen grupos cromóforos.

La selección de excipientes es importante en el diseño de un producto farmacéutico de calidad. Los excipientes y su concentración en una formulación se seleccionan basándose no solo en su funcionalidad sino también en la compatibilidad con el fármaco (Narang & Boddu, 2015). De modo que una incompatibilidad se puede definir como una interacción farmacológica indeseable con uno o más componentes de una formulación que produce cambios en las propiedades físicas, químicas, microbiológicas o terapéuticas de la forma de dosificación (Narang & Boddu, 2015; Narang, Rao, & Raghavan, 2009) por ende se realizó esta prueba de manera indicativa en el presente trabajo.



**Figura 13.** Espectro de mezclas de solventes con RSV para determinar compatibilidad fármaco- excipientes.



**Figura 14.** Cromatogramas de mezclas de solventes con RSV para determinar compatibilidad fármaco- excipientes.

## 10.2. Estudios de formulación

### 10.2.1. Propuesta de formulaciones

Para seleccionar los componentes de la formulación del inyectable con RSV se aplicó un diseño factorial  $3^3$  y se establecieron las formulaciones mostradas en la Tabla 9 basándose en los resultados de la etapa de preformulación dadas las condiciones de solubilidad, estabilidad en pH y compatibilidad fármaco-excipiente.

La Tabla 9 muestra los factores evaluados de manera codificada y sus respuestas medidas a través de la técnica de espectrofotometría UV/Vis y Cromatografía (HPLC).

La dosis empleada propuesta del activo fue basada en las utilizadas de estudios de RSV en modelo animal.

La matriz de 27 formulaciones planteadas por el diseño factorial  $3^3$  además de evaluar las respuestas mostradas en la Tabla 8 para seleccionar la mejor formulación, se determinó de manera cualitativa observando los tubos después de centrifugarlos con la finalidad de evaluar en cuál de ellas el RSV presentaba mejor estabilidad física evidenciando su sedimentación lo cual se vería también reflejado en la determinación del contenido químico en la formulación.

En las respuestas del diseño de experimentos se evaluó el pH en la solución inyectable para determinar si era necesario agregar algún amortiguador de pH esto partiendo del criterio de que la formulación más sencilla es la más adecuada siempre y cuando esta cumpla con estabilidad y la compatibilidad fármaco- excipiente.

**Tabla 9.** Diseño experimental codificado de soluciones inyectables de RSV y resultados de la medición de las respuestas.

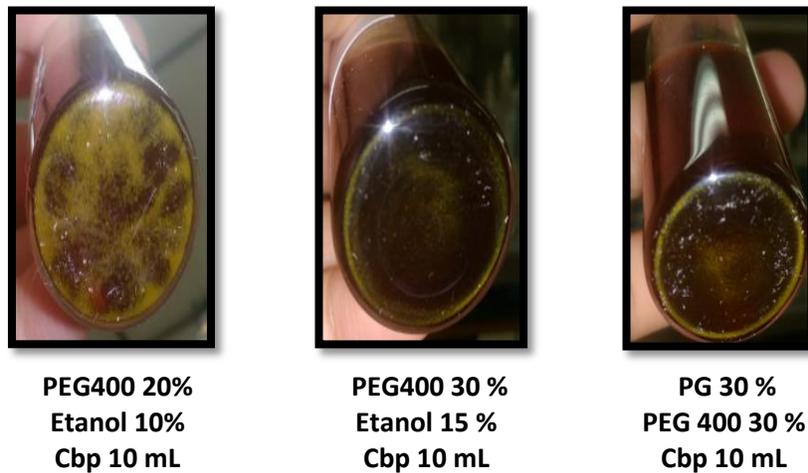
No. Ensayo de formulación	Factores			Respuestas		
				UV/Vis	HPLC	pH Iny**
	PG	PEG 400	EtOH	Contenido de RSV (%)*	Contenido de RSV (%)*	
F1	1	1	-1	90.0	89.0	6
F2	-1	1	-1	102.4	100.8	6.6
F3	-1	0	0	74.4	80.1	6.6
F4	-1	1	1	98.6	93.5	6.7
F5	-1	1	0	99.8	102.2	6.7
F6	-1	-1	0	32.1	37.5	6.5
F7	-1	-1	1	94.7	99.8	6
F8	-1	-1	-1	61.2	10.4	6.4
F9	-1	0	-1	87.3	95.2	5.8
F10	-1	0	1	97.8	92.3	5.4
F11	0	-1	-1	97.8	93.1	6.3
F12	0	-1	1	91.7	97.8	6.7
F13	0	1	0	91.6	98.3	6.4
F14	0	0	0	80.3	97.0	6.5
F15	0	0	-1	93.5	99.1	6.7
F16	0	1	1	85.6	92.5	6.8
F17	0	1	-1	86.5	93.1	6.5
F18	0	0	1	92.1	98.8	6.6
F19	0	-1	0	95.0	89.8	6.9
F20	1	0	1	88.7	95.7	6.5
F21	1	1	1	90.8	98.2	6.7
F22	1	0	-1	92.3	93.6	7.4
F23	1	-1	1	99.8	102.4	6.4
F24	1	-1	-1	88.7	90.7	6.8
F25	1	0	0	87.6	92.8	6.4
F26	1	-1	0	97.7	89.6	6.8
F27	1	1	0	92.7	95.4	6.6

\*Para determinación de contenido de RSV en la solución se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de RSV (\%)} = \text{Cantidad determinada de RSV (g)} \times \left( \frac{100}{\text{Cantidad agregada de RSV (g)}} \right)$$

\*\* pH Iny: Valor de pH en la solución inyectable.

En cuanto a la materia prima de resveratrol se usaron de dos tipos de materia prima, se empleó RSV grado farmacéutico con una pureza de 95.2 % y RSV grado alimenticio con una pureza del 50 % la primera fue empleada para realizar las formulaciones del diseño de experimentos y la segunda para los estudios previos al diseño experimental, las formulaciones se muestran en la Figura 15 y no presentaron buena estabilidad física debido a que el activo comenzó a sedimentar después de un reposo de 24 horas y por ende quedaron descartadas.



**Figura 15.** Formulaciones iniciales con RSV 50 %.

Como se mencionó en un principio se hizo una sencilla evaluación visual después de la centrifugación de las formulaciones, planteadas por el diseño de experimentos, con la finalidad de observar la presencia de sedimento o bien partículas insolubles (Figura 16).



**Figura 16.** Formulaciones del diseño de experimentos con RSV 95.2 %.

*En la figura se muestran las formulaciones que presentaron sedimentación de manera evidente después de la centrifugación lo cual tiene relación con la determinación del contenido de resveratrol en la solución inyectable.*

Como se observa en la Figura 16 las formulaciones en las que fue más evidente la sedimentación después de la centrifugación fue formulación 6 y 8, por ello en la Tabla 9 se muestran ambas formulaciones con porcentajes bajos en contenido de RSV.

A continuación se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para estimar el efecto de los factores sobre las respuestas evaluadas. Se simplificó el modelo excluyendo interacciones de los factores que no eran significativos con la finalidad de mejorar la R-cuadrada y la R-cuadrada ajustada.

**Tabla 10.** Análisis de Varianza para contenido de RSV (%) determinado por UV/Vis.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razó-F	Valor-P
A:PG	354.49	1	354.49	17.10	<b>0.0257</b>
B:PEG 400	349.096	1	349.096	16.84	<b>0.0262</b>
AB	1309.8	1	1309.8	63.20	<b>0.0042</b>
BC	148.403	1	148.403	7.16	0.0753
CC	345.598	1	345.598	16.68	<b>0.0265</b>
Falta de ajuste	2614.43	1 8	145.246	7.01	0.0670
Error puro	62.1741	3	20.7247		
Total (corr.)	5183.99	2 6			

R-cuadrada = 48.3679 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 36.0746 por ciento

C: corresponde al cosolvente etanol (EtOH).

**Tabla 11.** Análisis de Varianza para contenido de RSV (%) determinado por HPLC.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:PG	1021.07	1	1021.07	5.24	<b>0.0325</b>
B:PEG 400	1284.06	1	1284.06	6.59	<b>0.0179</b>
AB	1846.36	1	1846.36	9.48	<b>0.0057</b>
BC	907.932	1	907.932	4.66	<b>0.0425</b>
ABC	1108.26	1	1108.26	5.69	<b>0.0265</b>
Error total	4089.19	21	194.724		
Total (corr.)	10256.9	26			

R-cuadrada = 60.1322 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 50.6398 por ciento

C: corresponde al cosolvente etanol (EtOH).

**Tabla 12.** Análisis de Varianza para pH Iny.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:PG	0.235111	1	0.235111	2.97	0.1010
AB	0.27	1	0.27	3.41	0.0803
BC	0.1875	1	0.1875	2.37	0.1402
AAC	0.468167	1	0.468167	5.92	<b>0.0251</b>
ABB	0.587778	1	0.587778	7.43	<b>0.0134</b>
ACC	0.233611	1	0.233611	2.95	0.1020
BBC	0.368167	1	0.368167	4.65	<b>0.0440</b>
Error total	1.50341	19	0.0791267		
Total (corr.)	3.75852	26			

R-cuadrada = 60.0 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 45.2632 por ciento

C: corresponde al cosolvente etanol (EtOH).

La Tabla 10, 11 y 12 de ANOVA muestran los análisis de varianza para contenido de RSV (%) determinado por UV/Vis, contenido de RSV (%) determinado por HPLC y pH los cuales nos presentan niveles de significancia (valor-P) de cada efecto. Para el caso mostrado en la Tabla 9, cuatro efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son los factores (A, B, AB y CC) que provocan variación en la respuesta respectiva con una probabilidad mayor a 95.0 %  $[(1-P)*100]$ . En esta misma tabla presenta una R-cuadrada de 48.3679 %, este porcentaje representa la variabilidad de la respuesta contenido de RSV (%) determinado por UV/Vis que es explicada por el modelo determinado:

$$\text{RSV por UV/Vis} = 83.5 + 4.4A + 4.4B - 10.4AB - 3.5BC + 7.6C^2$$

La Tabla 11 muestra el análisis de varianza para la variable de respuesta contenido de RSV (%) determinado por HPLC en el cual se observa que los factores PG (A), PEG 400 (B), AB, BC y ABC tienen un valor-P menor a 0.05, es decir que todos afectan significativamente a la variación de dicha respuesta.

La Tabla 11 muestra que cinco efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que tienen un efecto significativo con un nivel de confianza del 95.0%, es decir, todos los factores y las interacciones AB, BC y ABC tienen un efecto sobre contenido de RSV (%) determinado por HPLC. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo se ajusta a los

datos obtenidos explicando el 60.1322% de la variabilidad en contenido de RSV (%) determinado por HPLC y una R-cuadrada ajustada de 50.6398%. La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

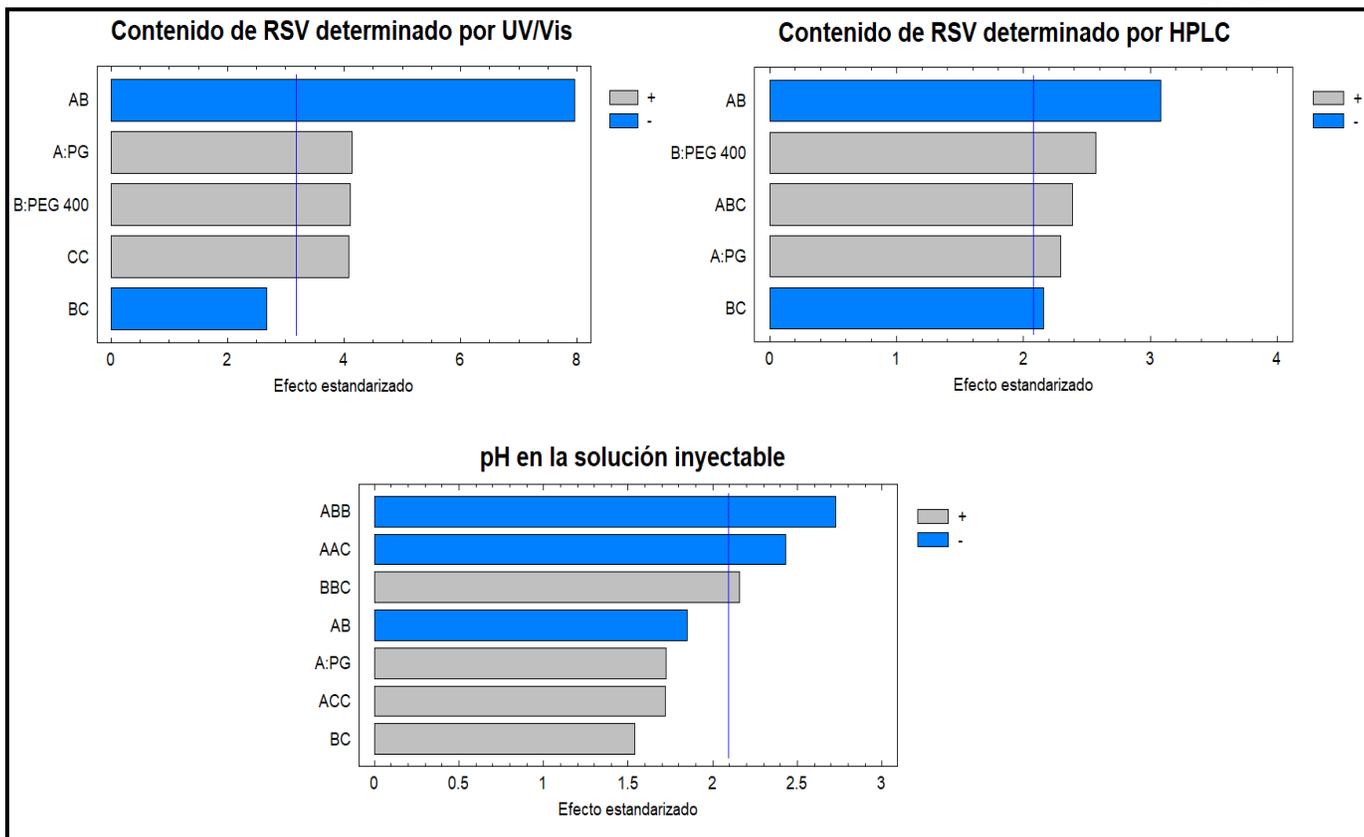
$$\text{RSV por HPLC} = 89.5 + 7.5A + 8.4B - 12.4AB - 8.7BC + 11.8ABC$$

En la Tabla 12 se observan tres interacciones AAC, ABB y BBC tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativos con un efecto sobre pH Iny, sin embargo el factor A y la interacción AB y BC no muestra un efecto significativo. El modelo ajustado explica el 60 % de la variabilidad de pH Iny, de acuerdo a lo indicado por la R-cuadrada y el valor obtenido de la R-cuadrada justada fue de 45.2632 % obteniendo la ecuación del modelo ajustado siguiente:

$$\text{pH Iny} = 6.5 + 0.3A - 0.2AB + 0.1BC - 0.4AB + 0.2AC^2$$

La R-cuadrada se empleó para determinar si el modelo se ajusta a los datos obtenidos de las respuestas, mientras mayor sea el valor de la R-cuadrada, mejor se ajustan los datos al modelo.

De manera gráfica los efectos sobre contenido de RSV (%) determinado por HPLC, determinado por UV/Vis y pH Iny se muestran en la Figura 17 con el Diagrama de Pareto Estandarizado. Los efectos se visualizan trazados en orden decreciente de importancia representando los efectos divididos entre su error estándar. Los efectos que superan la línea crítica son significativos.



**Figura 17.** Diagramas de pareto estandarizado.

En la Figura 17 se observa que la interacción AB (PG y PEG400) tiene el mayor impacto sobre contenido de RSV (%) determinado por UV/Vis, esta interacción muestra un efecto negativo sobre la respuesta, es decir, que al agregar RSV únicamente en una mezcla de AB este no se solubilizará completamente causando una posible inestabilidad física de la formulación provocando sedimentación del activo. También la interacción BC muestra un efecto negativo sobre la respuesta sin embargo dicho factor no es crítico.

Ahora bien el factor A, B y la interacción CC también muestran ser factores críticos sobre el resveratrol disuelto teniendo un efecto positivo, lo que indica que en los cosolventes puros como A y B el resveratrol mostrará una buena solubilidad del resveratrol.

Para el caso de contenido de RSV (%) determinado por HPLC; también se demostró que la interacción AB tiene mayor impacto sobre el contenido de RSV (%) determinado por HPLC con un efecto negativo sobre la respuesta. Así mismo la interacción BC muestra un

efecto negativo sobre la respuesta, sin embargo aquí la técnica de cromatografía empleada indica que dicha interacción es crítica.

Por la técnica de cromatografía también se demostró que el factor A, B y la interacción CC también muestran ser factores críticos sobre el resveratrol disuelto teniendo un efecto positivo.

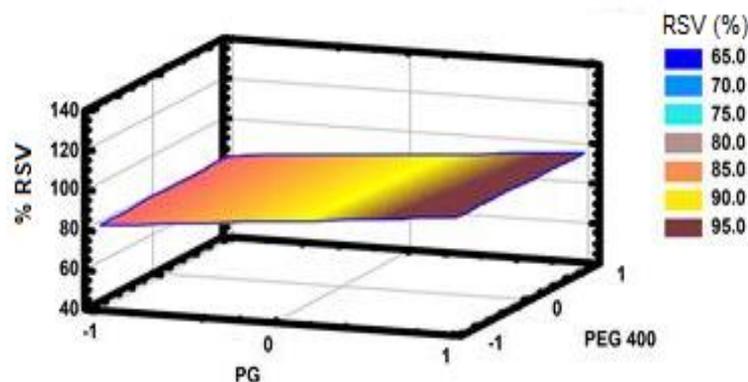
La Figura 17 en pH de la solución inyectable, indica que tres interacciones son críticas, ABB tiene un efecto negativo al igual que AAC, y por otro lado BBC tiene un efecto positivo. Es decir para los primeros tres casos la interacción ABB y AAC tienen un efecto sobre los valores de pH tendiendo a la disminución del pH en el inyectable. Por el contrario la interacción BBC tiene un efecto positivo sobre el pH de la formulación.

Se observaron cuatro factores no críticos, la interacción AB tiene un efecto negativo, seguido del factor A, ACC y BC que tienen un efecto positivo.

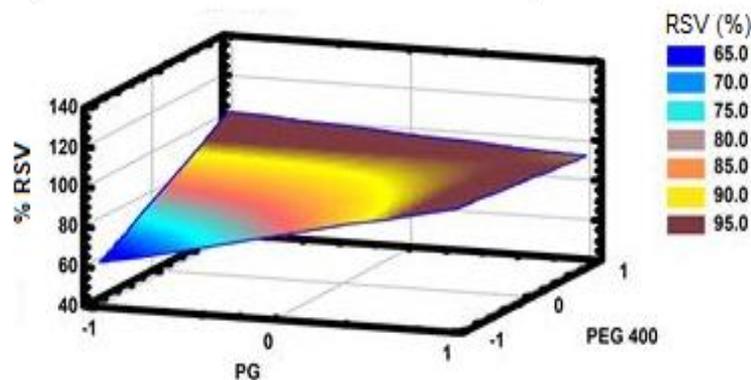
Hay que considerar que el polietilenglicol (PEG) en solución acuosa presenta valores de pH 5-7, el etanol y el propilenglicol (PG) cercano a pH 7; por lo que en las soluciones preparadas con estos cosolventes el pH del medio puede estar entre esos valores considerando también a la concentración que estén, sin embargo estos valores pueden ser modificados al agregar otro tipo de excipientes a la formulación que influyan sobre el pH y al ocurrir esto se debe considerar agregar un agente amortiguador ya que el pH debe ser el adecuado al pH fisiológico pero principalmente valores que permitan la estabilidad del activo.

## Contenido de RSV (%) determinado por HPLC

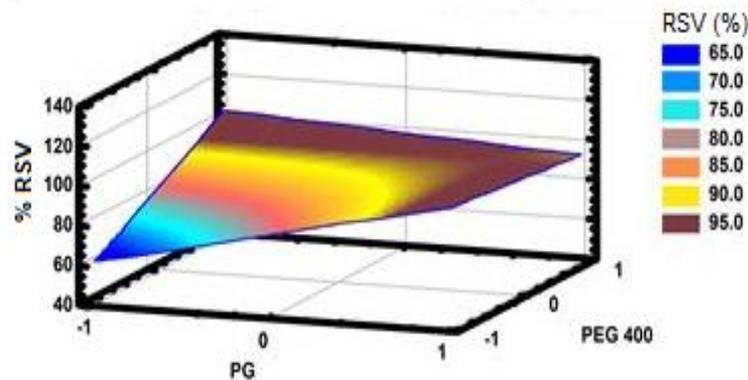
Comportamiento de mezclas con Etanol 30 % (nivel coficado=1)



Comportamiento de mezclas con Etanol 20 % (nivel coficado=0)



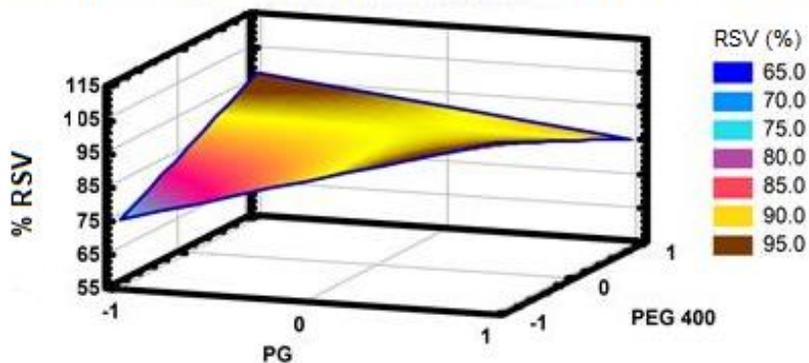
Comportamiento de mezclas con Etanol 10 % (nivel coficado=-1)



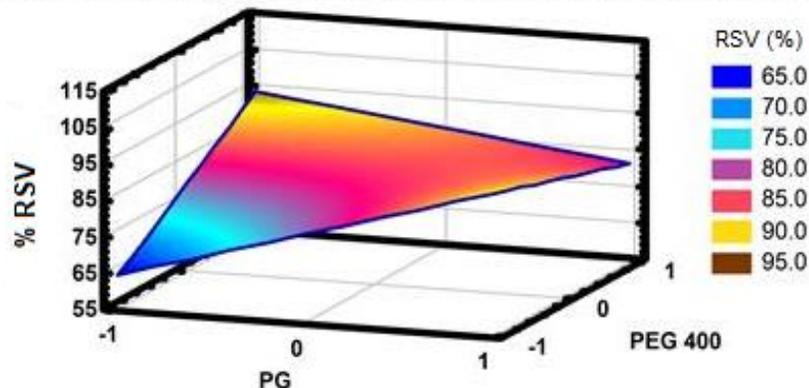
**Figura 18.** Diagrama de superficie de respuesta para la determinación de resveratrol determinado por HPLC en la solución inyectable.

## Contenido de RSV (%) determinado por UV/Vis

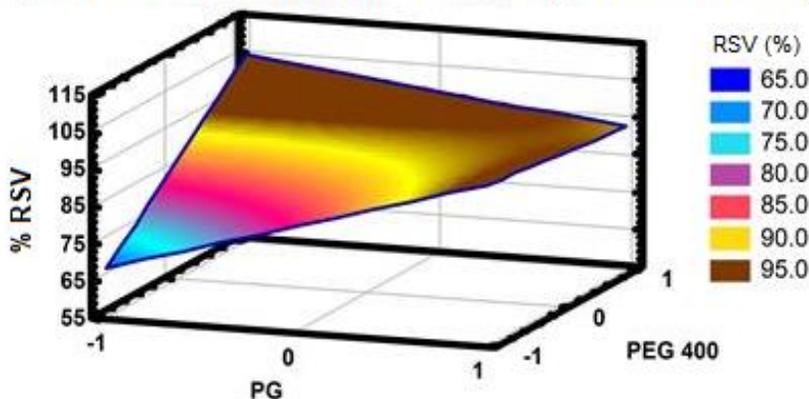
Comportamiento de mezclas con Etanol 30 % (nivel codificado=1)



Comportamiento de mezclas con Etanol 20 % (nivel codificado=0)



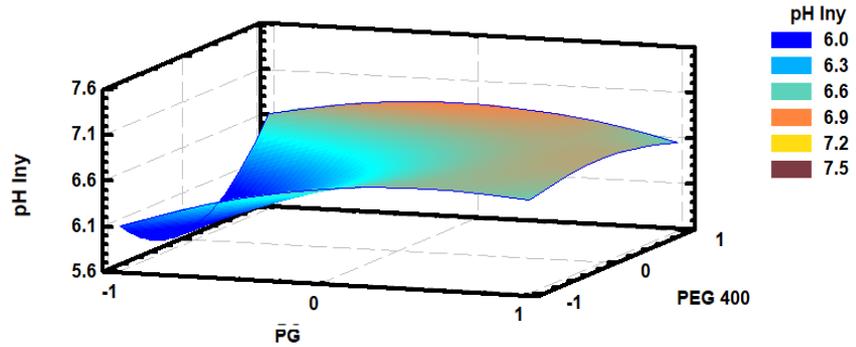
Comportamiento de mezclas con Etanol 10 % (nivel codificado=-1)



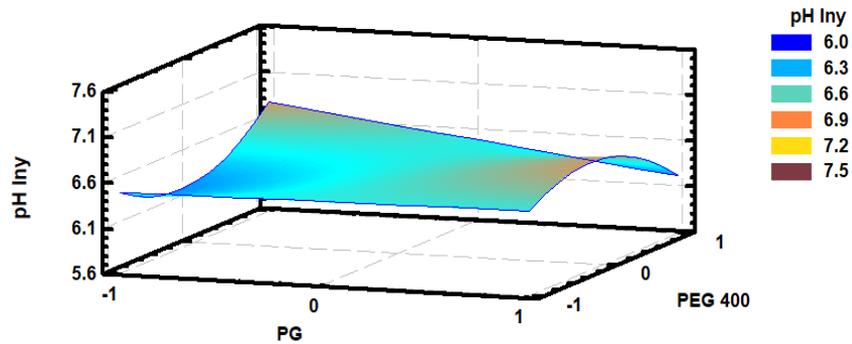
**Figura 19.** Diagrama de superficie de respuesta para la determinación de resveratrol determinado por espectrofotometría UV/Vis en la solución inyectable.

# pH en la solución inyectable de RSV

Comportamiento con mezclas de Etanol 30 % (nivel codificado=1)



Comportamiento con mezclas de Etanol 20 % (nivel codificado=0)



Comportamiento con mezclas de Etanol 10 % (nivel codificado=-1)

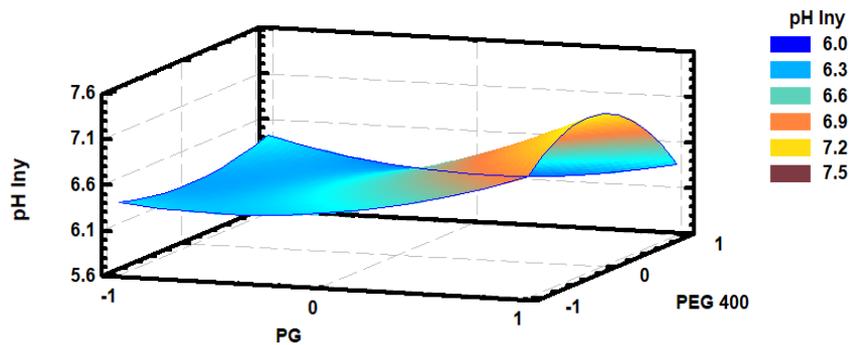


Figura 20. Diagrama de superficie de respuesta para la determinación de pH en la solución inyectable.

En las Figuras 18, 19 y 20 se presentan las superficies de respuesta determinadas para contenido de resveratrol por HPLC, contenido de resveratrol por UV/Vis y para el pH de la solución inyectable de resveratrol.

La Figura 18 y 19 donde se determinó el contenido de resveratrol por HPLC y espectrofotometría UV/Vis respectivamente, se puede observar que para el caso de la mezcla de PEG400 y PG con etanol al 30 % (nivel codificado=0) pareciera que para tener mayor contenido de resveratrol en la formulación se debe considerar usar el nivel alto de PEG400 y PG que es el 60 % en ambos casos. El comportamiento del gráfico con etanol 20 % (nivel codificado=0) muestra ascendencia en el nivel alto de PEG400 y nivel bajo de PG (0 %) para obtener una mejor respuesta. Por otro lado en el nivel bajo del etanol (nivel codificado= -1) muestra que para obtener una respuesta optima se debe manejar el nivel alto del PEG400 y el nivel bajo del PG.

De manera general se puede mencionar que la mezcla de PEG400 con etanol da mejor respuesta en el contenido químico, sin embargo se tiene que emplear el PEG400 en un nivel alto, esto coincide con lo obtenido en el diagrama de Pareto en la Figura 17 pues el factor de PEG400 tiene un efecto crítico sobre el contenido de resveratrol en la solución con un efecto positivo, es decir, aumenta su solubilidad y por lo tanto el contenido de activo en solución, sin embargo se debe proceder a optimizar la formulación para seleccionar las cantidades apropiadas.

Para el caso del pH los resultados obtenidos en el diagrama de superficie de respuesta para la determinación de pH en la solución inyectable se muestra en la Figura 20 donde se observa que en los tres niveles de etanol cuando este se mezcla con niveles altos o centrales de PEG400 y PG el pH de la solución aumenta ligeramente aunque se observó que este no excede valores de pH 7 sino que se encuentra dentro del rango de pH que estos cosolventes poseen por su características química.

Al evaluar el pH final en las formulaciones estas tenían pH entre 5 y 7 en donde el RSV se encuentra estable de acuerdo a los estudios de preformulación y además está cercano al pH fisiológico (pH 7.4) por lo que no fue necesario agregar un buffer.

Se realizó la determinación de las cantidades óptimas de PEG400, PG y etanol mostradas en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Cantidades óptimas de los cosolventes a emplear para la formulación parenteral de RSV.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
PG	-1.0	1.0	1.0
PEG 400	-1.0	1.0	-1.0
EtOH	-1.0	1.0	1.0

La Tabla 13 muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza la cantidad disuelta de resveratrol y donde la solución inyectable se mantuvo libre de partículas insolubles, indicando que la formulación óptima es la F23, se seleccionaron dos formulaciones más, la F2 y F5, cuya respuesta evaluada fue también de las más altas, las 3 formulaciones fueron seleccionadas para ser sometidas a un estudio exploratorio de estabilidad acelerada.

Haciendo énfasis en los cosolventes empleados, el PEG 400, PG y el EtOH son incorporados a la formulación ya que tienen la finalidad de mejorar la solubilidad del RSV en agua. Tanto el PG como el PEG 400 ofrecen no solo la gran ventaja de aumentar la solubilidad del activo sino que también fungen como estabilizantes del principio activo y además, para el primer caso, puede presentar acción bactericida similar al etanol este último mencionado es agregado a la formulación no solo con la finalidad de aumentar la solubilidad del RSV sino que también para mejorar la estabilidad química del PG. Otro criterio importante a considerar en las formulaciones parenterales, es la isotonicidad por ende en las formulaciones F2, F5 y F23 seleccionadas (Tabla 14) se les añade también cloruro de sodio con la finalidad igualar la presión osmótica al momento de su administración parenteral.

Una solución es isotónica con la célula cuando al estar en contacto con ésta, la célula no pierde o gana agua y no presenta ningún otro cambio. Por ello la isotonicidad se determinó por el método de equivalentes de cloruro de sodio. Este método está basado en que la sangre y otros fluidos biológicos, poseen una presión osmótica igual a una solución al 0.9 % de NaCl. Un equivalente de cloruro de sodio es el peso de NaCl que produce el mismo efecto osmótico que un gramo de la sustancia en solución.

Para el cálculo se consideró la cantidad agregada de activo y mediante el método utilizado y así determinar los gramos de NaCl faltantes para isotonizar las soluciones.

Con los estudios de preformulación y formulación a través del diseño de experimentos, las formulaciones finales seleccionadas para estudios de estabilidad acelerada son la que se muestran en la Tabla 14. Únicamente por fines de investigación, la materia prima a usar para los estudios de estabilidad acelerada será la de RSV 50 % grado alimenticio, esto debido los costos, pues la materia prima de RSV de 95.2 % grado farmacéutico es de un costo elevado.

**Tabla 14.** Formulaciones seleccionadas.

Formulación	%					Agua purificada c.b.p
	Resveratrol	PG	PEG 400	Etanol	NaCl	
<b>2</b>	0.35		60	10	0.8	10 ml
<b>5</b>	0.35		60	20	0.8	10 ml
<b>23</b>	0.35	60		30	0.8	10 ml

### 10.3. Pruebas de hemolisis

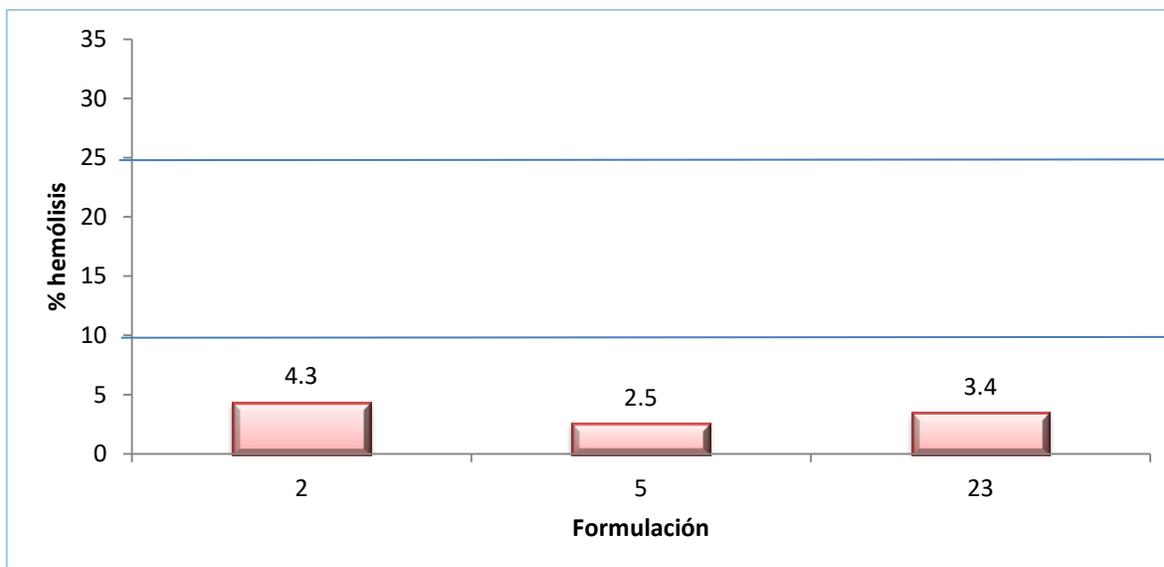
Como ya se mencionó en el punto 10.2.1 Propuesta de formulaciones, las formulas parenterales deben cumplir el criterio de ser soluciones isotónicas, esto es importante ya que si estas llegan a producir hemolisis puede llegar a causar problemas en los pacientes. En la Figura 21 se puede apreciar de manera visual y porcentual la prueba de hemólisis para las fórmulas seleccionadas de acuerdo a su estabilidad física. Podemos observar que las formulaciones obtuvieron un potencial hemolítico en el siguiente orden: F2>F23>F5 produciendo una hemolisis de 4.3 %, 3.4 % y 2.5 % respectivamente.

Por estudios es bien conocido que los PEG's y el PG pueden llegar a causar hemolisis si se emplean a altas concentraciones, a diferencia del EtOH que no produce ese efecto (Ketan Amin, 2012; Krzyzaniak et al., 1997), sin embargo la adición de sales como el NaCl ayudan a disminuir el potencial hemolítico, por ello se puede deducir que si las formulaciones no tuvieran el agente isotonzante, en este caso el NaCl, seguramente estos porcentajes de hemolisis serían elevados ya que se manejaron concentraciones altas de estos cosolventes.

Basándose en los valores de referencia dados en una guía de hemólisis (Ketan Amin, 2012) que, considera que las formulaciones con valor de hemólisis <10 % no son hemolíticas, mientras que valores > 25 % tienen riesgo de hemólisis, los porcentajes obtenidos de cada formulación en la Figura 21 mostraron por lo tanto que no hay riesgo de hemólisis pues están por debajo del 10 % tal y como muestra el Figura 22 .

Formulación	2	5	23	Control
<b>Imagen</b>				
<b>Muestras diluidas</b>				
<b>Potencial hemolítico (%)</b>	4.3	2.5	3.4	

**Figura 21.** Resultados del potencial hemolítico de las formulaciones seleccionadas.



**Figura 22.** Evaluación del potencial hemolítico.

*Las líneas azules indican el porcentaje límite en los cuales las formulaciones ya presentan un riesgo de hemólisis. Se considera que las formulaciones con valor de hemólisis <10 % no son hemolíticas, mientras que valores > 25 % tienen riesgo de hemólisis y son consideradas hemolíticas.*

#### 10.4. Desarrollo y validación de un método espectrofotométrico para la determinación de resveratrol en la formulación parenteral.

Se realizó un ensayo analítico sencillo con las muestras de formulaciones cuantificando su contenido químico, el tratamiento de las muestras fue a través de diluciones usando como medio mezclas de EtOH:Agua (50:50) y se leyeron a la longitud de onda de 306 nm junto con un estándar de referencia del RSV.

Las concentraciones de las muestras se estimaron a partir de la absorbancia obtenida relacionándola con la concentración del estándar (4.2 µg/ml) y su absorbancia, siguiendo la fórmula:

$$[\text{mg/ml}]_{\text{Conc.muestra}} = \left( \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{Conc. estándar} \times \text{F. D} \right) / 1000$$

La validación del método analítico se realizó basándose a lo establecido en la Guía de Validación del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos así como también

en la ICH. Los parámetros de validación evaluados fueron linealidad del sistema, Especificidad, linealidad del método, precisión, exactitud y reproducibilidad.

#### 10.4.1. Linealidad del sistema

Para la linealidad del sistema se preparó una curva de calibración de RSV con 6 niveles de concentración en un rango de 0.525-16.8  $\mu\text{g/mL}$  por triplicado. Los resultados de las concentraciones de la curva de calibración se muestran en la Tabla 15.

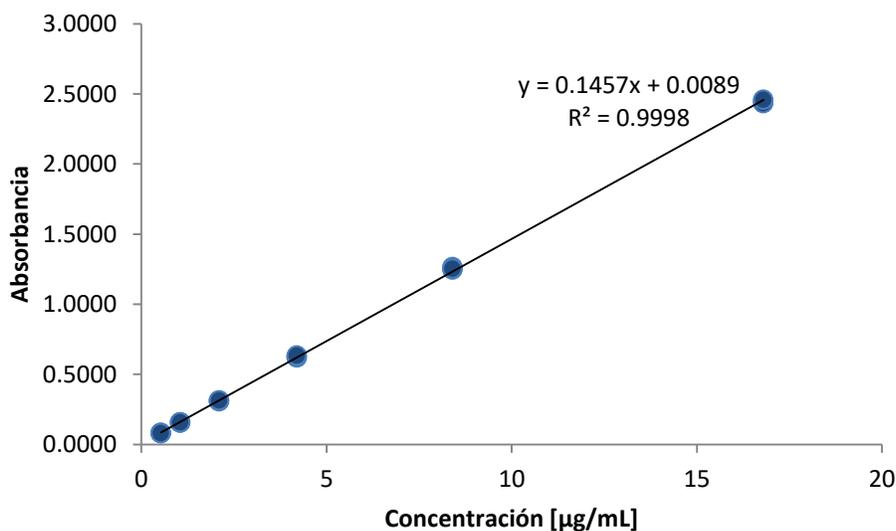
**Tabla 15.** Datos de concentraciones de la curva de calibración de resveratrol para evaluar linealidad del sistema.

Número de sistema	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	Absorbancia	Abs/Conce (A/C)
1	0.525	0.0810	0.1543
		0.0800	0.1524
		0.0800	0.1524
2	1.05	0.1570	0.1495
		0.1540	0.1467
		0.1560	0.1486
3	2.1	0.3120	0.1486
		0.3070	0.1462
		0.3130	0.1490
4	4.2	0.6220	0.1481
		0.6200	0.1476
		0.6340	0.1510
5	8.4	1.2450	0.1482
		1.2650	0.1506
		1.2530	0.1492
6	16.8	2.4460	0.1456
		2.4320	0.1448
		2.4580	0.1463

En el Figura 23 muestra que en la respuesta analítica del RSV existe un cambio directamente proporcional a la concentración. La Tabla 16 demuestra los parámetros estadísticos que se obtuvo en el análisis de la regresión, se observó que los resultados cumplen con los criterios de aceptación establecidos.

**Tabla 16.** Parámetros obtenidos de la regresión de la curva de calibración de resveratrol para evaluar linealidad del sistema.

Parámetros estadístico	Valor obtenido	Criterios de aceptación	Observación
$r^2$	0.9998	$R^2 \geq 0.98$	Cumple
Pendiente (m)	0.1457	-	-
Intercepto (b)	0.0089	-	-
CV%	1.7151	CV% < 2 %	Cumple
IC ( $\beta_1$ )	LI= 0.1445 LS= 0.1468	IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero	Cumple
IC ( $\beta_0$ )	LI = -0.0003 LS= 0.0180	IC( $\beta_0$ ) debe incluir el cero	Cumple



**Figura 23.** Curva de calibración del resveratrol para determinar linealidad del sistema.

Con la finalidad de demostrar una relación lineal entre la concentración del RSV y su respuesta analítica, se realizó un análisis de varianza como se muestra en la Tabla 17, y se establecieron las siguientes hipótesis:

$H_0$ : No hay relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica del RSV

$H_1$ : Sí Hay relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica del RSV

Para los criterios de aceptación de las hipótesis se establece lo siguiente:

Si  $F_{cal} < F_{\alpha=0.05;gl(1/16)}$  no se rechaza  $H_0$

Si  $F_{cal} > F_{\alpha=0.05;gl(1/16)}$  se rechaza  $H_0$

**Tabla 17.** Análisis de varianza para determinar la linealidad del sistema con un nivel de significancia del 95%.

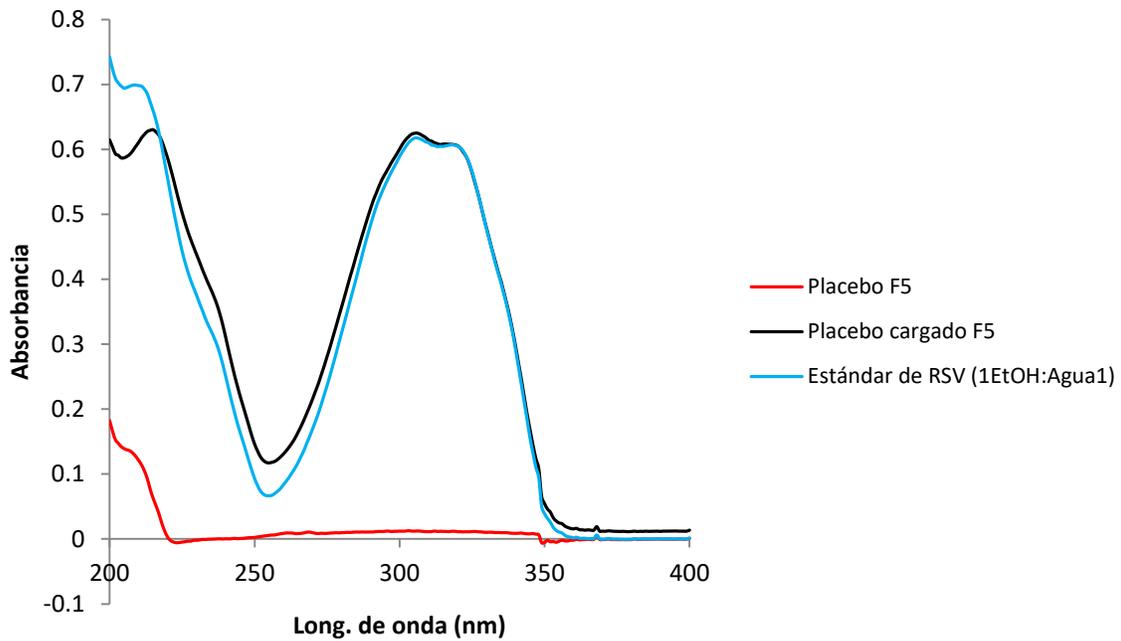
ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	$F_{\alpha=0.05;gl(1/16)}$
Regresión	1	12.34509	12.34509	71402.2335	1.2463E-30	4.4940
Residuos	16	0.002766	0.00017			
<b>Total</b>	17	12.34785				

De acuerdo con las hipótesis planteadas y los resultados que se obtuvieron, se rechaza  $H_0$  debido a que  $F_{cal} = 71402.2335 > F_{\alpha=0.05;gl(1/16)} = 4.4940$  y por lo tanto sí existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica del RSV.

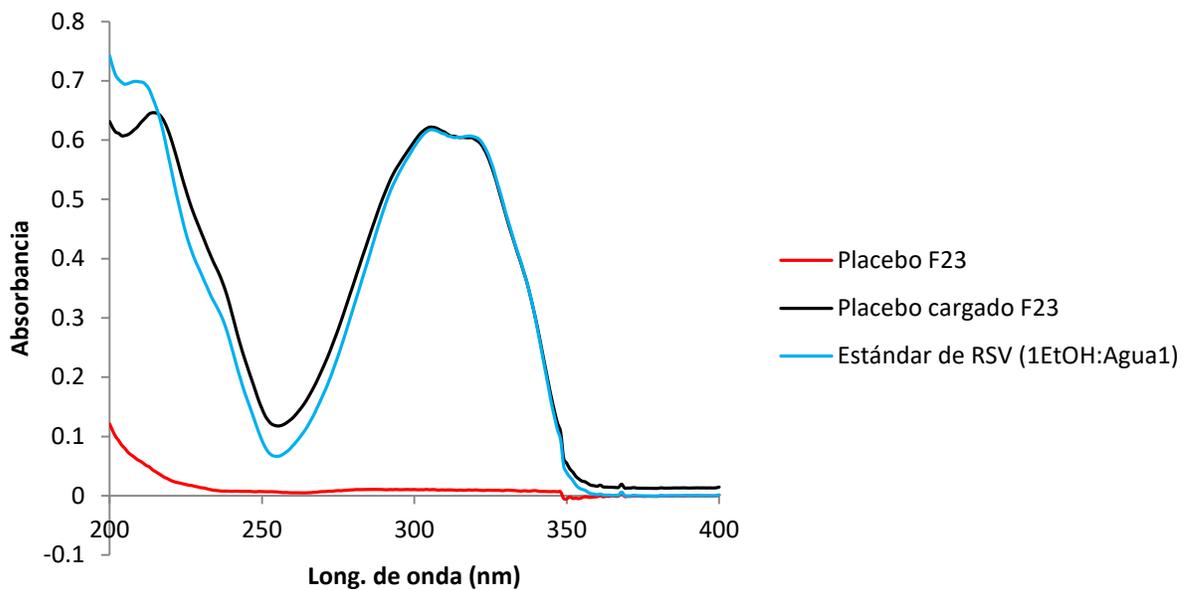
#### 10.4.2. Especificidad

La especificidad permite evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de otros componentes como son los excipientes en una formulación, es decir, permite confirmar que la señal analítica corresponde únicamente al analito de interés. Para determinar este parámetro, se analizó una solución estándar de 4.2  $\mu\text{g/mL}$  de RSV, placebo cargado a la misma concentración del estándar de referencia y una solución placebo. Las soluciones empleadas fueron solamente la F5 y la F23 debido que de las tres formulaciones que se seleccionaron en la etapa de formulación, entre ellas solo cambiaba el tipo de cosolvente principal, PEG 400 para formulación F2 y F5, PG para F23. Los resultados obtenidos se observan en el Figura 24 y 25 donde muestran que los componentes de las formulaciones

no presentan interferencia con la señal dada del RSV, y por lo tanto el método es específico para poder determinar contenido de RSV en las soluciones parenterales.



**Figura 24.** Especificidad con formulación 5.



**Figura 25.** Especificidad con formulación 23.

### 10.4.3. Linealidad del método

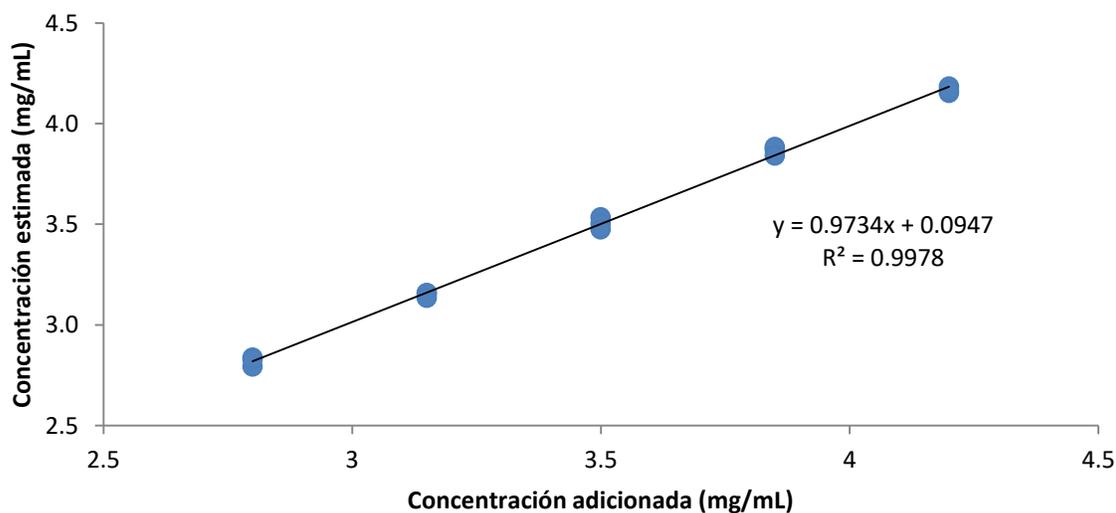
Para la evaluación de la linealidad del método se prepararon 6 niveles de concentración de placebos cargados en un intervalo de 2.8-4.2 mg (80 al 100 %) de resveratrol/mL, cada nivel se realizó por triplicado. La Tabla 18 muestra los resultados del porcentaje de recuperación del RSV. La prueba de linealidad del método nos demuestra que hay una relación directamente proporcional entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada del analito (Resveratrol).

En la Tabla 18 se muestran los resultados de la concentración adicionada vs recuperada los cuales se analizaron para determinar si los valores cumplían con los criterios de aceptación mostrados en la Tabla 19 en donde se muestra que si se cumple con los criterios para este parámetro.

En el Figura 26 se observa un comportamiento lineal y que los resultados son cercanos a la cantidad de analito conocida.

**Tabla 18.** Datos de concentración adicionada vs concentración recuperada para determinar linealidad del método a partir de placebos cargados.

% de RSV	[mg adicionados de resveratrol/mL]	absorbancia	[mg recuperados de resveratrol/mL]	% Recuperado de RSV	conc.Est/conc.adic
80	2.8	0.4160	2.79	99.79	0.9979
		0.4224	2.84	101.36	1.0136
		0.4213	2.83	101.09	1.0109
90	3.15	0.4690	3.16	100.25	1.0025
		0.4689	3.16	100.23	1.0023
		0.4657	3.14	99.53	0.9953
100	3.5	0.5240	3.54	101.01	1.0101
		0.5192	3.50	100.07	1.0007
		0.5152	3.47	99.28	0.9928
110	3.85	0.5730	3.87	100.56	1.0056
		0.5748	3.88	100.88	1.0088
		0.5685	3.84	99.76	0.9976
120	4.2	0.6185	4.18	99.62	0.9962
		0.6139	4.15	98.87	0.9887
		0.6155	4.16	99.13	0.9913
<b>Promedio</b>				100.0949	1.0009
<b>Desvest</b>				0.7633	0.0076
<b>C.V %</b>				0.7626	0.7626



**Figura 26.** Concentración adicionada vs concentración estimada para determinar linealidad del método.

**Tabla 19.** Datos de los parámetros obtenidos para determinar linealidad del método.

Parámetros estadístico	Valor obtenido	Criterios de aceptación	Observación
$r^2$	0.9978	$R^2 \geq 0.98$	Cumple
CV%	0.76261	CV% < 2 %	Cumple
IC ( $\beta_1$ )	LI= 0.9461 LS=1.0005	IC( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad	Cumple
IC( $\beta_0$ )	LI= -0.0014 LS= 0.1907	IC( $\beta_0$ ) debe incluir el cero	Cumple

Con el fin de corroborar la linealidad entre la concentración del RSV y la respuesta analítica, se aplicó el análisis de varianza mostrado en la Tabla 20, y se establecieron las siguientes hipótesis:

**H<sub>0</sub>:** No hay relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración estimada

**H<sub>1</sub>:** Sí hay relación lineal entre la concentración adicionada y la concentración estimada

Teniendo en cuenta los criterios de aceptación:

Si  $F_{cal} < F_{\alpha=0.05;g(1/13)}$  no se rechaza  $H_0$

Si  $F_{cal} > F_{\alpha=0.05;g(1/13)}$  se rechaza  $H_0$

Podemos decir los valores obtenidos de  $F_{cal} = 5982.4892 > F_{\alpha=0.05;g(1/13)} = 4.6672$  y por lo tanto se rechaza  $H_0$ , lo que quiere decir que si hay relación lineal entre la concentración adicionada.

**Tabla 20.** Análisis de varianza para determinar la linealidad del método con un nivel de significancia del 95%.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	$F_{\alpha=0.05;g(1/13)}$
Regresión	1	3.4818	3.4818	5982.4892	1.0565E-18	4.6672
Residuos	13	0.0076	0.0006			
Total	14	3.4894				

#### 10.4.4. Precisión y exactitud

La precisión va permitir demostrar que el método tiene la capacidad de dar respuestas muy parecidas entre sí, es decir que hay concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea. La exactitud corresponde a la concordancia entre un valor obtenido empleando el método y el valor de referencia. Para determinar ambos parámetros de validación se analizaron tres niveles de concentración que son del 80, 100 y 120 % de concentración por sextuplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Datos de concentración adicionada vs concentración estimada para determinar precisión y exactitud del método a partir de placebos cargados.

		<b>Adicionada</b>		<b>Estimada</b>	
<b>%</b>	<b>[mg de RSV/ml]</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>[mg de RSV/ml]</b>	<b>% Recobro</b>	
<b>80</b>	2.8	0.416	2.79	99.78	
		0.4224	2.83	101.35	
		0.4213	2.83	101.08	
		0.4181	2.80	100.30	
		0.4196	2.81	100.67	
		0.4246	2.85	101.89	
<b>100</b>	3.5	0.524	3.53	101.00	
		0.5192	3.50	100.06	
		0.5152	3.47	99.28	
		0.522	3.52	100.61	
		0.5226	3.52	100.73	
		0.523	3.52	100.81	
<b>120</b>	4.2	0.6185	4.18	99.61	
		0.6139	4.15	98.86	
		0.6155	4.16	99.12	
		0.6212	4.20	100.05	
		0.6227	4.21	100.30	
		0.6181	4.18	99.55	
				<b>Promedio</b>	100.28
				<b>Desvest</b>	0.816
				<b>C.V%</b>	0.8146

La Tabla 22 demuestra que los datos estadísticos calculados para determinar precisión del método cumple con el criterio de aceptación ya que en el porcentaje del coeficiente de variación se obtuvo < 2% lo que indica que la dispersión de los datos es aceptable y por lo

tanto se considera preciso. En cuanto a la exactitud del método este se evaluó respecto a los porcentajes de recobro y el criterio de aceptación del intervalo de confianza que establece que debe contener el 100 % y el valor obtenido es del 99.88-100.69 % por lo tanto se cumple con la exactitud del método.

**Tabla 22.** Datos de regresión para determinar precisión y exactitud del método.

Parámetros estadístico	Valor obtenido	Criterios de aceptación	Observación
CV%	0.8146	CV% < 2 %	Cumple
IC( $\mu$ )	LI= 99.88 LS= 100.69	IC( $\mu$ ) debe incluir el 100%	Cumple

#### 10.4.5. Reproducibilidad

La reproducibilidad se determinó en base a la precisión intermedia del método analítico expresada como, la concordancia relativa obtenida entre determinaciones independientes realizadas en un mismo laboratorio, por diferentes analistas, en distintos días. Este parámetro se evaluó empleando concentraciones de 90, 100 y 110 % de placebos cargados, preparados en dos días diferentes y por dos analistas diferentes. En la Tabla 23 se muestran los resultados de los porcentajes de recobro por cada analista en diferente día. El análisis estadístico que se realizó para determinar si existían diferencias significativas entre los resultados que obtenía cada analista en diferente día, se hizo un análisis de varianza estableciendo como factores el analista y el día.

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico mostrado en la Tabla 23, el valor obtenido del CV % es < 3 %, cumpliendo con ello la reproducibilidad como lo establecido para métodos espectrofotométricos en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.

**Tabla 23.** Cantidad estimada de Resveratrol a partir de placebos cargados para evaluar reproducibilidad del método (Precisión intermedia del método).

Resveratrol Adicionado	Analista	Día	Absorbancia	Resveratrol Recuperado	Media	S	CV
%				%			
90	1	1	0.4694	98.11	99.26	1.09	1.10
90	1	1	0.4731	98.89			
90	1	1	0.4743	99.14			
100	1	1	0.5383	101.26			
100	1	1	0.5324	100.15			
100	1	1	0.5209	97.99			
110	1	1	0.582	99.53			
110	1	1	0.5746	98.27			
110	1	1	0.5847	99.99			
90	2	1	0.4768	99.66			
90	2	1	0.4734	98.95			
90	2	1	0.4758	99.45			
100	2	1	0.5292	99.55			
100	2	1	0.5275	99.23			
100	2	1	0.5295	99.61			
110	2	1	0.6059	103.62			
110	2	1	0.5676	97.07			
110	2	1	0.5699	97.46			
90	1	2	0.4857	102.18			
90	1	2	0.4683	98.52			
90	1	2	0.4784	100.64			
100	1	2	0.5141	97.34			
100	1	2	0.526	99.59			
100	1	2	0.5219	98.81			
110	1	2	0.576	99.14			
110	1	2	0.5759	99.13			
110	1	2	0.5873	101.09			
90	2	2	0.4696	98.79			
90	2	2	0.4739	99.69			
90	2	2	0.4706	99			
100	2	2	0.5058	95.77			
100	2	2	0.5176	98			
100	2	2	0.5142	97.36			
110	2	2	0.5602	96.42			
110	2	2	0.5806	99.93			
110	2	2	0.575	98.97			
			<b>Promedio</b>	99.12			
			<b>Desv.</b>	1.52			
			<b>CV%</b>	<b>1.54</b>			

## 10.5. Estudios de estabilidad

Para realizar la estabilidad acelerada de las formulaciones 2, 5 y 23 se preparó un lote por formulación, se dosificaron en frascos viales vidrio ámbar y vidrio transparentes sellado herméticamente y fueron sometidos a condiciones de temperatura de 4°C, 30°C, 40°C, 50°C y 60°C durante un periodo de 5 días. El análisis de las muestras se llevó a cabo cada 24 horas a través del método analítico espectrofotométrico desarrollado y validado. Los resultados de las evaluaciones del porcentaje de resveratrol en las diferentes formulaciones sometidas a estabilidad en vidrio ámbar y vidrio transparente, se muestran en la Tabla 24 y 25 respectivamente, en donde se observa que la formulación 5 y 23 mostraron mejor estabilidad tanto en envase de vidrio ámbar como en el de vidrio transparente debido a que se obtiene mayor porcentaje de resveratrol en comparación con la formulación 2 cual mostró menor porcentaje de resveratrol durante el periodo de estabilidad. De acuerdo a estas evaluaciones se realizó una comparación de las líneas de regresión para cada formulación analizando el logaritmo del porcentaje de resveratrol en función del tiempo (horas) considerando una cinética de primer orden.

Para la formulación 2 y 5 que contenían PEG400:EtOH en una mezcla 60:10 y 60:20 respectivamente, se obtuvieron esquemas de regresión lineal mostrados en el Figura 27 y los resultados de regresión lineal de la formulación 23 que contenía PG:EtOH en una proporción 60:30 (Figura 27). Se puede observar que en la formulación 2, respecto a la formulación 5 y 23, el porcentaje de resveratrol muestra una mayor degradación tanto en envase de vidrio ámbar como en vidrio transparente a los 4 °C a partir de las 24 horas de haber comenzado el estudio de estabilidad, y de hecho fue la que menos estabilidad presentó mostrando un comportamiento similar a la formulación 23 en donde también comienza a existir una degradación del resveratrol a temperatura de 4°C a partir de las 24 horas en ambos envases aunque se observó mayor velocidad de degradación en envase de vidrio ámbar.

También se puede observar que la formulación que presentó mayor estabilidad entre todas fue F5, ya que la degradación se comenzó a observar en temperatura de 30°C hasta las 96 horas de estudio, sin embargo esta degradación fue más evidente en envase de vidrio ámbar que en vidrio transparente aunque no de manera significativa. La formulación F23 partir de 50°C en envase de vidrio transparente ya comienza a verse

mayor degradación a las 96 horas, sin embargo en envase de vidrio ámbar la velocidad de degradación a las 96 horas es todavía mayor a 50°C.

Con los datos de las pendientes obtenidas para cada formulación a diferente temperatura y envase mostrados en la Tabla 26 y 27, se aplicó la ecuación de Arrhenius con la finalidad de predecir el tiempo en el cual el resveratrol tiene una degradación del 10 % ( $t_{90}$ ) en las diferentes formulaciones. Se puede observar en la Tabla 27 que la formulación 2 el  $t_{90}$  fue bajo en las cinco temperaturas evaluadas sin embargo a 60°C presentó menor tiempo de estabilidad obteniendo una  $t_{90}$  181.49 horas (7.56 días) en envase de vidrio transparente y 159.88 horas (6.6 días) en vidrio ámbar. En la formulación 5 la temperatura en la que se mostró mejor estabilidad del resveratrol fue a 4°C para ambos tipos de envases ya que no presentó degradación durante el tiempo evaluado y por tanto no se aplicó la ecuación de Arrhenius. Sin embargo esta formulación presentó menor  $t_{90}$  en temperatura de 60°C obteniendo 636.58 horas (26.5 días) y 433.24 horas (18 días) en vidrio transparente y vidrio ámbar correspondientemente, mostrando mejor estabilidad en envase de vidrio transparente.

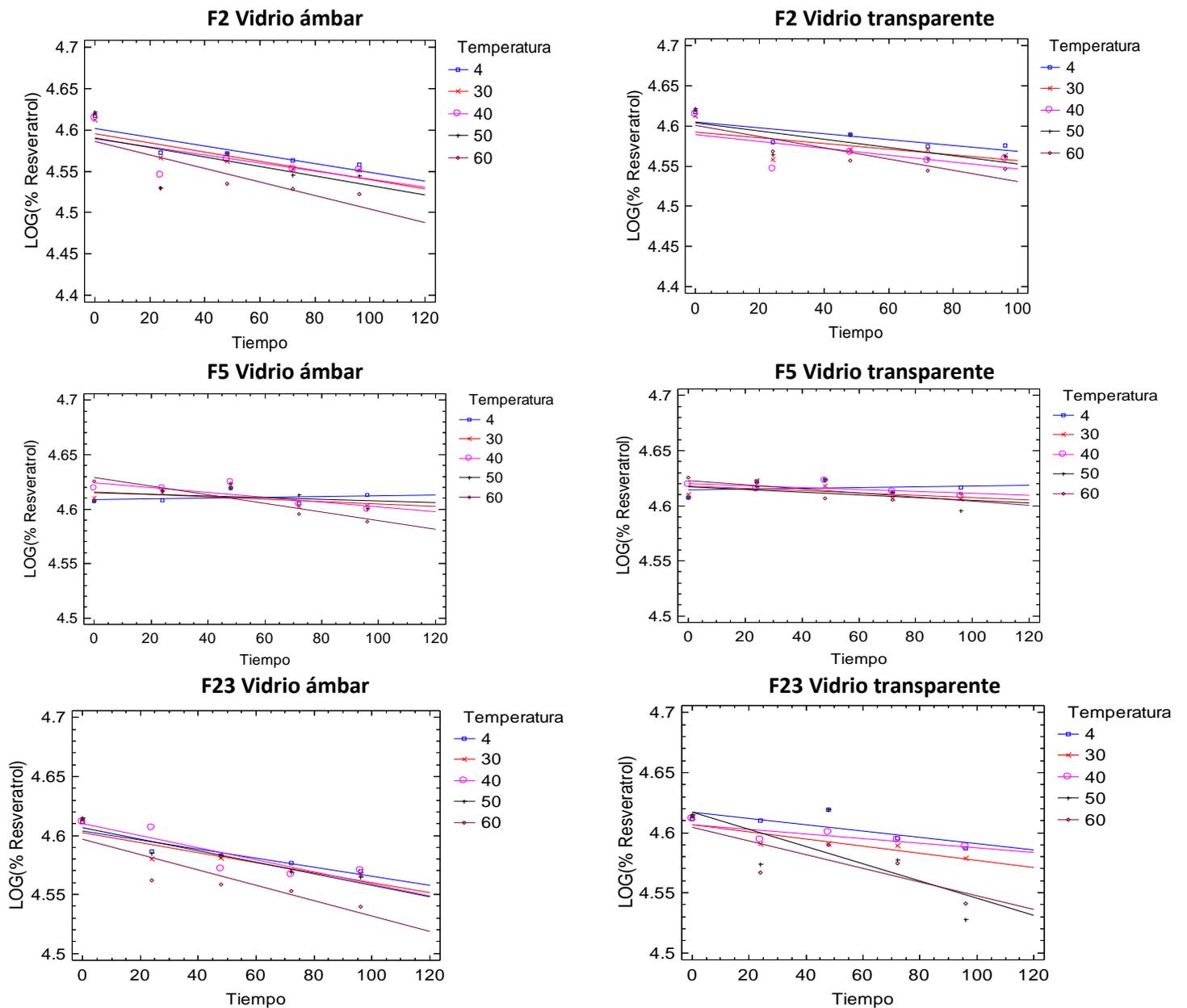
La formulación 23 mostró mejor estabilidad a 4°C en envase de vidrio transparente teniendo una  $t_{90}$  de 486.74 horas (20.28 días) y se observó que a partir de 30°C los valores de % Resveratrol son muy bajos presentando menor estabilidad a temperatura de 60°C con una  $t_{90}$  de 208.46 horas (8.69 días). En envase de vidrio ámbar se obtuvo una  $t_{90}$  a 4°C menor que en envase de vidrio transparente, 286.36 horas (11.93 días) siendo su valor más alto y 180.8 horas (7.54 días) su valor más bajo a 60°C. Razón por la cual se observaron mejores resultados de estabilidad de las formulaciones en envase vial de vidrio transparente que en vidrio ámbar sometidos a las diferentes temperaturas esperando que la mejor estabilidad fuera en envase de vidrio ámbar, puede ser atribuido al diferente tipo de material por el cual estén conformados los envases recordando que la farmacopea clasifica los diferentes envases de vidrio por su composición (FEUM, 2018), siendo ese un factor que no se controló durante el estudio de estabilidad acelerada puesto que se desconoce la composición de los envases utilizados considerando que estos están en contacto con el fármaco y tienen como función proporcionar protección contra la luz, la humedad, contaminantes y oxígeno, entre otros.

**Tabla 24.** Resultados de las evaluaciones de % resveratrol en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio ámbar.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	% resveratrol en vidrio ámbar		
		F2	F5	F23
4	0	101.24	100.19	100.61
	24	96.76	100.30	98.12
	48	96.64	101.42	97.78
	72	95.85	100.01	97.18
	96	95.40	100.79	96.52
30	0	100.69	100.50	100.78
	24	96.15	100.98	97.53
	48	95.74	101.73	97.57
	72	94.87	99.72	96.55
	96	94.82	99.81	96.24
40	0	100.96	101.38	100.64
	24	94.21	101.40	100.16
	48	96.01	102.01	96.71
	72	94.92	99.92	96.23
	96	94.83	99.47	96.57
50	0	101.63	100.24	100.99
	24	92.73	101.12	98.01
	48	96.64	101.42	97.78
	72	94.17	100.76	96.42
	96	94.09	99.55	96.02
60	0	101.42	102.08	100.84
	24	92.71	101.18	95.77
	48	93.16	101.87	95.42
	72	92.60	99.06	94.90
	96	92.01	98.32	93.67

**Tabla 25.** Resultados de las evaluaciones de % resveratrol en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio transparente.

Temperatura (°C)	Temperatura (°C)	% resveratrol en vidrio transparente		
		F2	F5	F23
4	0	101.24	100.19	100.61
	24	97.53	101.73	100.49
	48	98.46	101.84	101.43
	72	97.00	100.69	99.02
	96	97.14	101.13	98.19
30	0	100.69	100.50	100.78
	24	95.42	101.76	98.55
	48	96.61	101.28	98.52
	72	96.56	100.12	98.38
	96	95.92	100.08	97.36
40	0	100.96	101.38	100.64
	24	94.32	101.00	98.87
	48	96.32	101.80	99.54
	72	95.24	100.75	98.90
	96	95.45	100.39	98.31
50	0	101.63	100.24	100.99
	24	96.02	101.23	96.90
	48	98.46	101.84	101.43
	72	95.43	100.71	97.26
	96	95.79	99.01	92.56
60	0	101.42	102.08	100.84
	24	96.35	101.58	96.21
	48	95.30	100.16	98.46
	72	94.06	100.04	96.97
	96	94.33	100.58	93.77



**Figura 27.** Comparación de líneas de regresión para las formulaciones F2, F5 y F23 en envase de vidrio.

**Tabla 26.** Aplicación de la ecuación de Arrhenius.

Formulación	Tipo de envase		Vidrio transparente			
	Temperatura	Pendiente	K	K estimada	t <sub>90</sub> (horas)	t <sub>90</sub>
F2	°C	Constante de velocidad de reacción (K)	pendiente*-1	Ecuación de Arrhenius	Cinética de primer orden (0.105/K)	Días
	4	-0.00037	0.00037	0.00032	327.90	13.66
	30	-0.00035	0.00035	0.00043	242.47	10.10
	40	-0.00043	0.00043	0.00048	218.80	9.12
	50	-0.00052	0.00052	0.00053	198.70	8.28
	60	-0.00070	0.00070	0.00058	181.49	7.56
	Tipo de envase		Vidrio ámbar			
	Temperatura	Pendiente	K	K estimada	t <sub>90</sub> (horas)	t <sub>90</sub>
	°C	Constante de velocidad de reacción (K)	pendiente*-1	Ecuación de Arrhenius	Cinética de primer orden (0.105/K)	Días
	4	-0.00053	0.00053	0.00049	214.22	8.93
	30	-0.00056	0.00056	0.00057	184.51	7.69
40	-0.00049	0.00049	0.00060	175.37	7.31	
50	-0.00058	0.00058	0.00063	167.20	6.97	
60	-0.00082	0.00082	0.00066	159.88	6.66	
F5	Tipo de envase		Vidrio transparente			
	Temperatura	Pendiente	K	K estimada	t <sub>90</sub> (horas)	t <sub>90</sub>
	°C	Constante de velocidad de reacción (K)	pendiente*-1	Ecuación de Arrhenius	Cinética de primer orden (0.105/K)	Días
	4	0.000035	-	-	-	-
	30	-0.000103	0.000103	0.000089	1183.62	49.32
	40	-0.000092	0.000092	0.000111	942.89	39.29
	50	-0.000124	0.000124	0.000136	772.83	32.20
	60	-0.000187	0.000187	0.000165	636.58	26.52
	Tipo de envase		Ámbar			
	Temperatura	Pendiente	K	K estimada	t <sub>90</sub> (horas)	t <sub>90</sub>
	°C	Constante de velocidad de reacción (K)	pendiente*-1	Ecuación de Arrhenius	Cinética de primer orden (0.105/K)	Días
4	0.000038	-	-	-	-	
30	-0.000110	0.00011	0.000107	978.22	40.76	
40	-0.000220	0.00022	0.000143	732.83	30.53	
50	-0.000072	0.00007	0.000188	558.90	23.29	
60	-0.000401	0.00040	0.000242	433.24	18.05	

**Tabla 27.** Aplicación de la Ecuación de Arrhenius.

Formulación	Tipo de envase		Vidrio transparente			
	Temperatura	Pendiente	K	K estimada	t <sub>90</sub> (horas)	t <sub>90</sub>
F23	°C	Constante de velocidad de reacción (K)	pendiente* 1	Ecuación de Arrhenius	Cinética de primer orden (0.105/K)	Días
	4	-0.00026	0.00026	0.00022	486.74	20.28
	30	-0.00029	0.00029	0.00033	315.79	13.16
	40	-0.00019	0.00019	0.00039	272.54	11.36
	50	-0.00071	0.00071	0.00044	237.37	9.89
	60	-0.00057	0.00057	0.00050	208.46	8.69
	Tipo de envase		Vidrio ámbar			
	Temperatura	Pendiente	K	K estimada	t <sub>90</sub> (horas)	t <sub>90</sub>
	°C	Constante de velocidad de reacción (K)	pendiente* 1	Ecuación de Arrhenius	Cinética de primer orden (0.105/K)	Días
	4	-0.00039	0.00039	0.00037	286.36	11.93
	30	-0.00043	0.00043	0.00046	226.52	9.44
	40	-0.00051	0.00051	0.00050	209.15	8.71
50	-0.00049	0.00049	0.00054	194.07	8.09	
60	-0.00065	0.00065	0.00058	180.88	7.54	

Con lo que respecta a la estabilidad de pH que tuvo cada formulación los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 28 para envase de vidrio transparente y en la Tabla 29 para vidrio ámbar. La estabilidad del resveratrol es mayor en medios ácidos de acuerdo a los estudios de preformulación realizados anteriormente; como se puede observar en las Tablas 28 y 29 el pH de cada formulación se encuentra en un pH entre 4 y 7.3 permitiendo que el resveratrol sea estable en la solución.

Podemos observar que el pH en las formulaciones no tiene un cambio al someterse a estabilidad en las diferentes temperaturas en ambos envases lo que demuestra que la formulación es estable en su pH a las diferentes condiciones de temperatura, sin embargo habría que valorar la materia prima empleada ya que como se mencionó en la etapa de formulación por costos se empleó la materia prima de RSV grado alimenticio con 50 % de pureza. También es recomendable realizar estudios más adentrados de estabilidad acelerada para determinar si la formulación puede mantener estable su pH sin la necesidad de agregar un agente amortiguador.

.

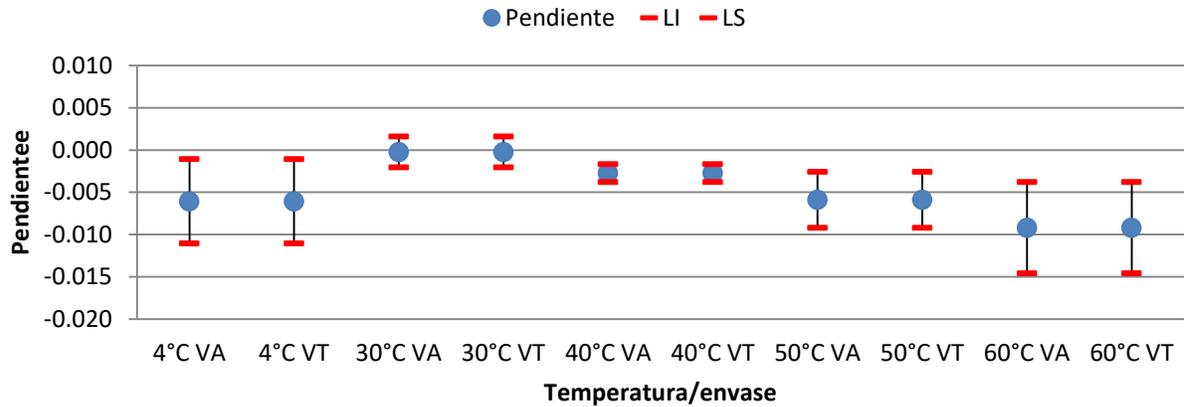
**Tabla 28.** Resultados de las evaluaciones de pH en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio transparente.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	pH en envase de vidrio transparente		
		F2	F5	F23
4	0	6.73	7.24	5.02
	24	6.46	7.01	5.34
	48	6.53	7.05	5.40
	72	6.53	7.05	5.41
	96	6.76	7.22	5.17
30	0	6.62	7.26	5.14
	24	6.53	7.03	5.35
	48	6.54	7.09	5.53
	72	6.55	7.10	5.41
	96	6.72	7.09	5.22
40	0	6.62	7.26	5.15
	24	6.48	7.03	5.32
	48	6.53	7.03	5.55
	72	6.39	7.03	5.25
	96	6.41	7.13	5.24
50	0	6.61	7.25	5.17
	24	6.32	7.02	5.50
	48	6.13	6.99	5.64
	72	5.99	6.97	5.46
	96	6.06	6.95	5.34
60	0	6.63	7.25	5.31
	24	6.04	6.75	5.56
	48	5.61	6.60	5.85
	72	5.80	6.63	5.36
	96	5.96	6.64	5.36

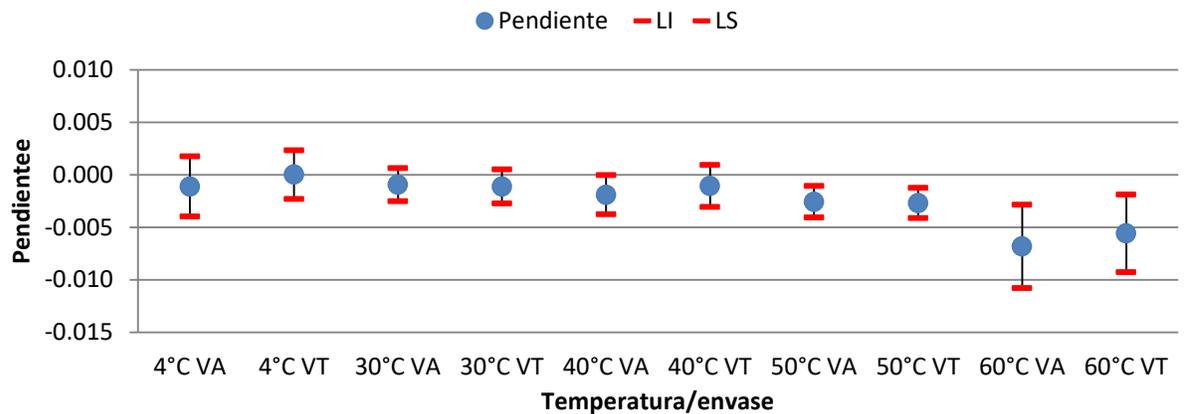
**Tabla 29.** Resultados de las evaluaciones de pH en las formulaciones durante el periodo de estabilidad en envase de vidrio ámbar.

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	pH en envase de vidrio ámbar		
		F2	F5	F23
4	0	6.73	7.24	5.02
	24	6.00	6.86	5.06
	48	6.00	7.06	5.12
	72	6.00	6.97	4.87
	96	6.00	7.05	4.87
30	0	6.62	7.26	5.14
	24	6.56	7.10	4.99
	48	6.63	7.04	5.03
	72	6.44	7.11	5.01
	96	6.65	7.14	5.09
40	0	6.62	7.26	5.15
	24	6.63	6.99	5.18
	48	6.44	7.01	5.18
	72	6.41	7.05	5.09
	96	6.40	7.00	4.99
50	0	6.61	7.25	5.17
	24	6.20	7.04	5.26
	48	6.05	6.98	5.37
	72	5.90	6.96	5.07
	96	6.05	6.98	5.18
60	0	6.63	7.25	5.31
	24	5.93	6.66	5.26
	48	5.62	6.56	5.40
	72	5.62	6.48	5.25
	96	5.68	6.52	5.10

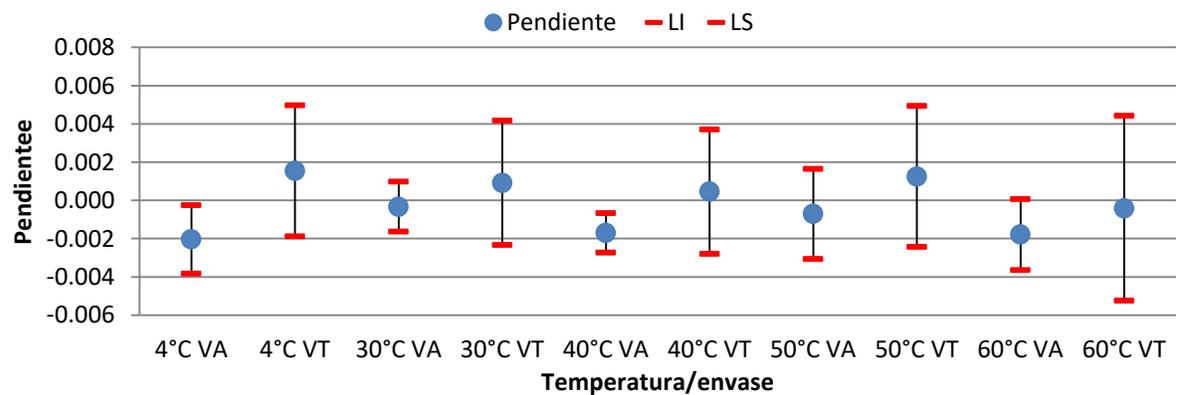
En las Figuras 28, 29, 30 se muestran los resultados sobre el comportamiento del pH de las formulaciones a través de los estudios estabilidad donde se comparan los intervalos de confianza al 75 % , en la figuras mostradas se puede reafirmar que el pH no tiende a aumentar o disminuir de manera significativa en el transcurso del tiempo a las diferentes temperaturas tanto en envase de vidrio transparente como en ámbar en las tres formulaciones y por lo tanto la formulación 2, 5 y 23 muestran estabilidad en su pH.



**Figura 28.** Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre el pH para formulación 2.

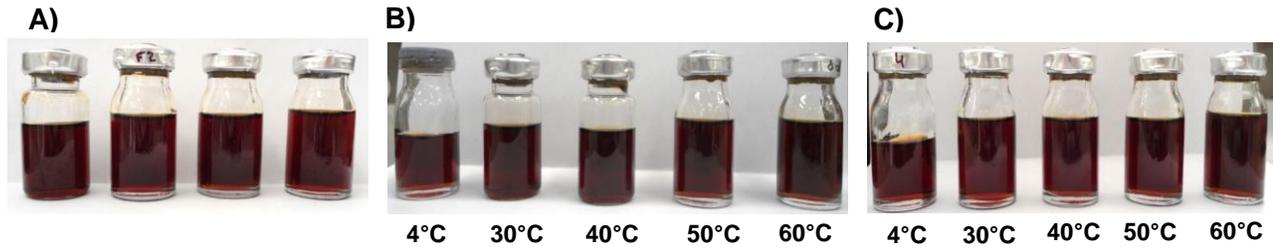


**Figura 29.** Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre el pH para formulación 5.

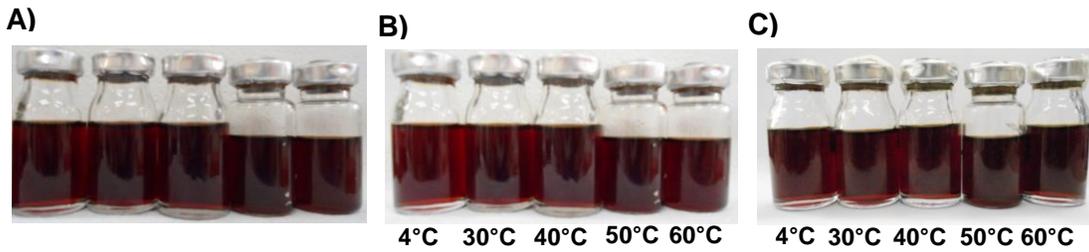


**Figura 30.** Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre el pH para formulación 23.

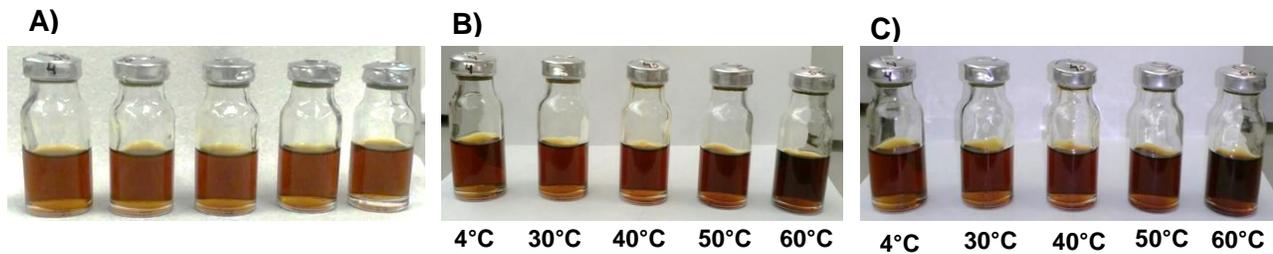
*Formulación 2*



*Formulación 5*



*Formulación 23*



A) 0 horas B) 24 horas C) 96 horas

**Figura 31.** Evaluación física de las formulaciones sometidas a estabilidad acelerada.

Se evaluaron los cambios de coloración en las formulaciones sometidas a estabilidad a las 0, 24 y 96 horas, los resultados de esta evaluación se muestran en la Figura 31. Para el caso de la formulación 23 dosificada en vidrio transparente se observó un cambio de coloración en la solución a temperatura de 50°C y 60°C a partir de las 24 horas pasando de un color ámbar de la solución a un color rojo oscuro en comparación con el lote general a las 0 horas. Así mismo la formulación 2 y 5 en las cuales la solución es de color rojo oscuro, se observó todavía más el oscurecimiento de esta a temperatura de 50°C y 60°C a partir de las 24 horas en comparación a la formulación recién elaborada dosificado en vidrio transparente.

Para la evaluación de cambios de coloración en la formulación 2 y 5 en envase vidrio ámbar estos no pudieron ser tan diferenciados ya que las soluciones aparentemente se veían del mismo color como al inicio. Sin embargo con la formulación 23 solo se observó cambio de coloración a 60°C después de las 24 horas pasando de un color ámbar a un color rojo oscuro, incluso también en envase de vidrio ámbar (Figura 32).

De manera general las formulaciones que presentaron cambio de coloración que puede estar asociado con la degradación del resveratrol en las temperaturas altas, es importante mencionar que no hay estudios o datos reportados sobre la degradación del resveratrol asociada a un cambio de coloración en particular pero puede ser relacionada como tal a la naturaleza de la propia materia prima que presenta 50% de pureza y por tanto esos cambios de coloración pueden también ser asociados a otros productos presentes que se estén degradando bajo las condiciones sometidas.



**Figura 32.** Cambio de color en la solución de la F23 en envase de vidrio ámbar a 60°C después de las 24 horas.

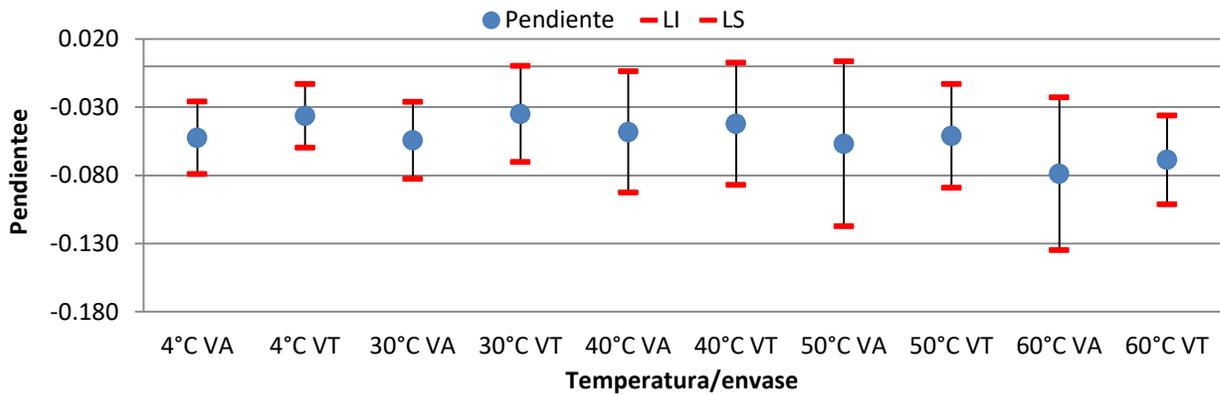
Con la finalidad de determinar si el emplear envase de vidrio transparente o ámbar tiene alguna diferencia o efecto sobre la estabilidad del resveratrol al ser sometida la formulación a diferentes temperaturas por determinado tiempo se realizó un análisis de comparación intervalos de confianza al 75 % mostrando los resultados a partir de la Figura 33, 34 y 35

En la Figura 33 se puede observar para el caso de la formulación 2 que, al comparar los intervalos de confianza obtenidos con las pendientes de cada envase a diferente temperatura, no se observa diferencias del efecto, del tipo de envase empleado, sobre la estabilidad del RSV, es decir almacenar la formulación 2 en envase de vidrio transparente o ámbar en no tiene influencia sobre la estabilidad del resveratrol sino que esta será atribuida por la formulación, las condiciones de temperatura a la cual es expuesta y el tiempo para este caso.

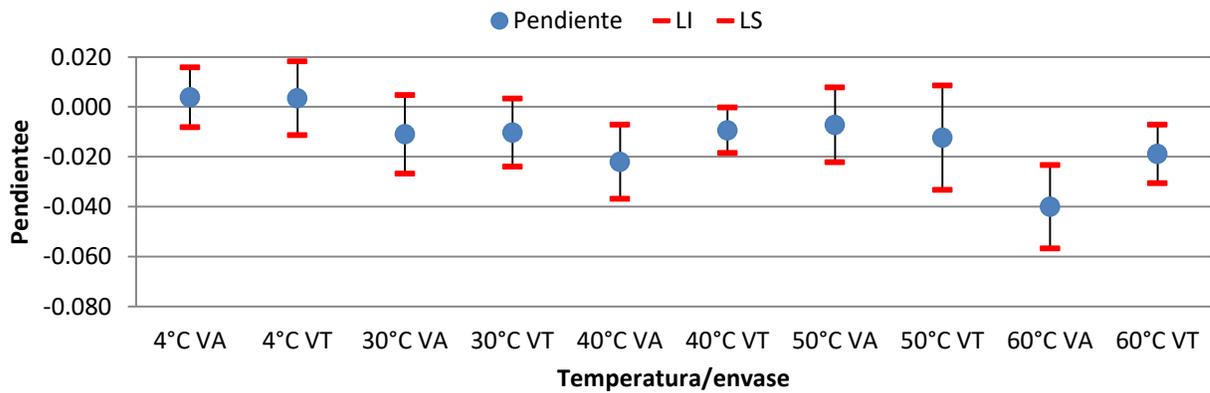
En la Figura 34 se puede observar para el caso de la formulación 5 que al comparar los intervalos de confianza, tampoco se observa un efecto del tipo de envase empleado sobre la estabilidad del resveratrol en la formulación atribuible a lo ya comentado para la F2.

En los resultados la Figura 35 correspondientes a la F23, se observan los mismos resultados como en la formulación 2 y 5 en cuanto a comparación de intervalos de confianza, es decir no va existir un efecto estadísticamente significativo del tipo de envase empleado sobre la estabilidad del resveratrol en la formulación cuando se almacena en vidrio o ámbar en las diferentes temperaturas, la degradación va ser dependiente de la composición de la formulación y de las condiciones de temperatura a la cual es almacenada, por tanto dosificar las formulaciones en envase de vidrio transparente o ámbar no va repercutir significativamente sobre la estabilidad de las formulaciones.

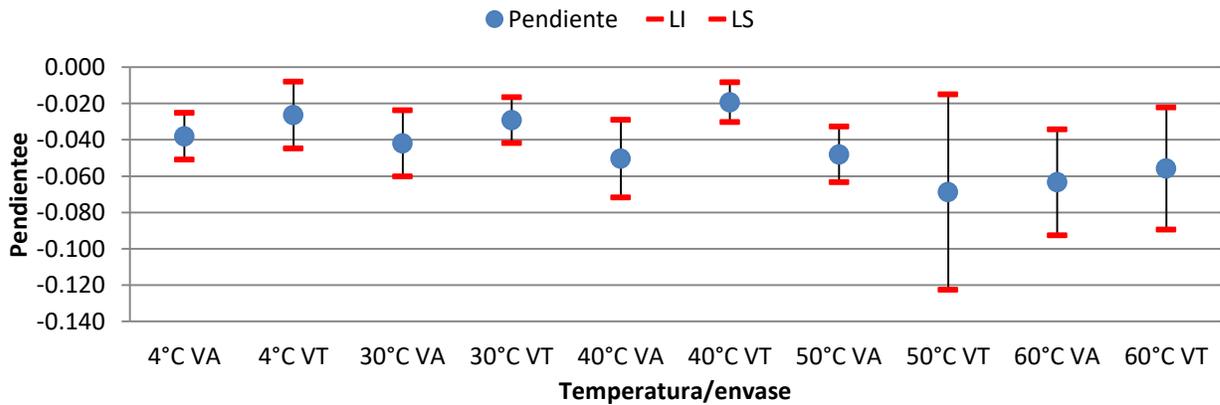
El estudio exploratorio de estabilidad acelerada realizado y los resultados obtenidos, son simplemente estimaciones sin embargo se recomienda hacer estudios de estabilidad a largo plazo apegándose a la normatividad con la finalidad de demostrar un tiempo de vida útil de 24 meses, de acuerdo a lo mencionado por la NOM -073.



**Figura 33.** Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre % resveratrol para formulación 2.



**Figura 34.** Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre % resveratrol para formulación 5.



**Figura 35.** Comparación de intervalos de confianza al 75 % de pendientes a diferentes temperaturas y envase sobre % resveratrol para formulación 23.

## 11. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una formulación de resveratrol en solución inyectable mediante el uso de cosolventes como el PEG400, PG, EtOH.
- Mediante estudios de preformulación se realizó la caracterización del resveratrol y excipientes para efectuar los estudios de formulación mediante un diseño de experimentos factorial  $3^3$  en donde se plantearon 27 formulaciones de las cuales solo 3 mostraron mejores resultados en las respuestas evaluadas de contenido químico, pH y estabilidad física; las formulaciones seleccionadas fueron la F2 (PEG 400 60%, Etanol 10 %), F5 (PEG 400 60 %, Etanol 20 %) y F23 (PG 60 %, Etanol 30 %).
- Las pruebas de hemólisis sobre las formulaciones 2, 5 y 23 mostraron que estas presentaban un bajo potencial hemolítico lo que indica que son formulaciones seguras de administrar principalmente para vía IV. Sin embargo cabe mencionar que de las 3 formulaciones la que presentó menor potencial hemolítico fue la formulación 5 con un 2.5 % de hemólisis.
- Se desarrolló y validó un método analítico por espectrofotometría UV/Vis para determinar el contenido del resveratrol en las formulaciones parenterales seleccionadas, basándose en la guía de validación de QFB'S cumpliendo con los parámetros de validación establecidos y requeridos para la prueba.
- Con las formulaciones seleccionadas se realizó un estudio exploratorio de estabilidad acelerada a diferente temperatura (4, 30, 40, 50 y 60 °C) y envase (vidrio y ámbar) en la cual con los datos obtenidos se aplicó la ecuación de Arrhenius para determinar los valores de  $t_{90}$  de cada formulación demostrando que las formulaciones presentan mayor estabilidad a temperatura de 4°C independientemente del envase en la cual hayan sido dosificadas así mismo, el pH en las formulaciones se mantuvo estable sin la necesidad de un amortiguador. La estabilidad de las formulaciones seleccionadas se presentó en el siguiente orden de manera ascendente:

F2 < F23 < F5

- Se determinó que la formulación 5 presentaba mejor estabilidad que la formulación 2 y 23 sin haber mostrado degradación a temperatura de 4°C durante 96 horas y teniendo una  $t_{90}$  de 1183.62 horas (49.32 días) a temperatura de 30°C, todo lo anterior a pesar de tener la formulación un pH entre 6 y 7.3.

## 12. PERSPECTIVAS

- Realizar replicas en los ensayos del diseño de experimentos planteado con la finalidad de obtener un análisis más amplio del efecto de los factores sobre las respuestas evaluadas.
- Para mejorar cuestiones de estabilidad del resveratrol en la formulación se recomienda emplear algún método para disminuir la propensión a la degradación oxidativa del activo-excipientes y realizar un estudio al respecto.
- Hacer estudios de estabilidad acelerada en condiciones controladas de temperatura y humedad apegadas a la NOM-073-SSA1-2005, así como también realizar estudios de estabilidad a largo plazo a fin de demostrar el tiempo de vida útil.
- Optimizar el proceso de fabricación de la solución inyectable agregando también una etapa de esterilización.
- Realizar un estudio en un modelo biológico para evaluar la eficacia terapéutica de la solución inyectable.

### 13. REFERENCIAS

1. Amri, A., Chaumeil, J. C., Sfar, S., & Charrueau, C. (2012). Administration of resveratrol: What formulation solutions to bioavailability limitations? *Journal of Controlled Release*, 158(2), 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.09.083>
2. Castillo, S. L. (2008). Optimización de un método in vitro para evaluar el potencial hemolítico de vehículos para inyectables. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
3. Chávez, P. L. S., Ocañas, L. G., Castañeda, C. T. B., Tamez de la O, E. J., & Verástegui, J. T. (2014). Tolerabilidad del resveratrol y efectos sobre parámetros bioquímicos sanguíneos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 45(4).
4. Coimbra, M., Isacchi, B., Van Bloois, L., Torano, J. S., Ket, A., Wu, X., Schiffelers, R. M. (2011). Improving solubility and chemical stability of natural compounds for medicinal use by incorporation into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(2), 433–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.056>
5. Das, S., Lin, H. S., Ho, P. C., & Ng, K. Y. (2008). The impact of aqueous solubility and dose on the pharmacokinetic profiles of resveratrol. *Pharmaceutical Research*, 25(11), 2593–2600. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9677-1>
6. Elshaer, M., Chen, Y., Wang, X. J., & Tang, X. (2018). Resveratrol : An overview of its anti-cancer mechanisms. 207(May), 340–349.
7. Farmacopea de los Estados Unidos de América : USP 38. Formulario nacional : NF 33. (2015). United States Pharmacopeial Convention. Retrieved from <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02025a&AN=lib.MX001001970004&lang=es&site=eds-live>
8. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2018). Secretaria de Salud.

9. Frozza, R. L., Bernardi, A., Paese, K., Hoppe, J. B., Da Silva, T., Battastini, A. M. O., Salbego, C. (2010). Characterization of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules and tissue distribution studies in rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 6(6), 694–703. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1161>
10. Gao, Z. B., & Hu, G. Y. (2005). Trans-resveratrol, a red wine ingredient, inhibits voltage-activated potassium currents in rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 1056(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.07.013>
11. Gupta, P. K., & Brazeau, G. A. (1999). *Injectable drug development*. EUA: Interpharm.
12. *Handbook of Pharmaceutical Excipients - 7th Edition*. (2013). *Pharmaceutical Development & Technology*, 18(2), 544. <https://doi.org/10.3109/10837450.2012.751408>
13. Hernández, E. (2005). *Elaboración de Programas Interactivos en Multimedia para la Enseñanza de la Tecnología Farmacéutica : Libro electrónico sobre Inyectables*.
14. Huang, X., Li, X., Xie, M., Huang, Z., Huang, Y., & Wu, G. (2019). Chemico-Biological Interactions Resveratrol : Review on its discovery , anti-leukemia effects and pharmacokinetics. 306(February), 29–38.
15. Hung, C. F., Fang, C. L., Liao, M. H., & Fang, J. Y. (2007). The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: Tocol emulsion versus lipid emulsion. *International Journal of Pharmaceutics*, 335(1–2), 193–202. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.11.016>
16. Hung, C.-F., Chen, J.-K., Liao, M.-H., Lo, H.-M., & Fang, J.-Y. (2006). Development and Evaluation of Emulsion-Liposome Blends for Resveratrol Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(9), 2950–2958. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.420>

17. Jato, J. L. (2001). *Tecnología Farmacéutica volumen II: Formas farmacéuticas*. España: SINTESIS.
18. Katekar, R., Thombre, G., Riyazuddin, M., Husain, A., Rani, H., Praveena, K. S., & Gayen, J. R. (2019). Pharmacokinetics and Brain targeting of Trans-Resveratrol loaded mixed micelles in rats following intravenous administration. *Pharmaceutical Development and Technology*, 0(0), 1–28.  
<https://doi.org/10.1080/10837450.2019.1680690>
19. Ketan Amin, R.-M. D. (2012). In Vitro Hemolysis: Guidance for the Pharmaceutical Scientist. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(7), 2271–2280.  
<https://doi.org/10.1002/jps>
20. Krzyzaniak, J. F., & Yalkowsky, S. H. (1998). Lysis of human red blood cells 3: Effect of contact time on surfactant- induced hemolysis. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 52(2), 66–69.
21. Krzyzaniak, J. F., Alvarez Núñez, F. A., Raymond, D. M., & Yalkowsky, S. H. (1997). Lysis of human red blood cells. 4. Comparison of in vitro and in vivo hemolysis data. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(11), 1215–1217.  
<https://doi.org/10.1021/js970184o>
22. Kwon, K. J., Kim, J. N., Kim, M. K., Lee, J., Ignarro, L. J., Kim, H. J., ... Han, S. H. (2011). Melatonin synergistically increases resveratrol-induced heme oxygenase-1 expression through the inhibition of ubiquitin-dependent proteasome pathway: A possible role in neuroprotection. *Journal of Pineal Research*, 50(2), 110–123.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00820.x>
23. Lamas, M. C., Villaggi, L., Nocito, I., Bassani, G., Leonardi, D., Pascutti, F., ... Salomón, C. J. (2006). Development of parenteral formulations and evaluation of the biological activity of the trypanocide drug benznidazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 307(2), 239–243. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.004>

24. López-Nicolás, J. M., & García-Carmona, F. (2008). Aggregation state and pKa values of (E)-resveratrol as determined by fluorescence spectroscopy and UV-visible absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(17), 7600–7605. <https://doi.org/10.1021/jf800843e>
25. Lozano, M. d. (2012). *Manual de tecnología farmacéutica*. Barcelona: Elsevier.
26. Mardare, C. (2001). Error estimates between the linearized three-dimensional shell equations and Naghdi ' s model. 28(12), 1–30. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885.sponding>
27. Matos, M., Laca, A., Rea, F., Iglesias, O., Rayner, M., & Gutiérrez, G. (2018). O/W emulsions stabilized by OSA-modified starch granules versus non-ionic surfactant: Stability, rheological behaviour and resveratrol encapsulation. *Journal of Food Engineering*, 222, 207–217. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.009>
28. Monroy, E. N. (2003). *Desarrollo de una solución inyectable para un fármaco con actividad antihipertensiva*. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
29. Moshawih, S., Mydin, R. B. S. M. N., Kalakotla, S., & Jarrar, Q. B. (2019). Potential application of resveratrol in nanocarriers against cancer: Overview and future trends. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53(August), 101187. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101187>
30. Mota Lugo, E. (2019). *Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos para evaluar la estabilidad de resveratrol en una formulación parenteral*.
31. Narang, A. S., & Boddu, S. H. (2015). Excipient applications in formulation design and drug delivery. *Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery*, 1–681. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20206-8>

32. Narang, A. S., Rao, V. M., & Raghavan, K. S. (2009). Excipient Compatibility. *Developing Solid Oral Dosage Forms*, 125–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53242-8.00006-0>
33. Neves, A. R., Lúcio, M., Lima, J. L. C., & Reis, S. (2012). Resveratrol in Medicinal Chemistry: A Critical Review of its Pharmacokinetics , Drug-Delivery , and Membrane Interactions. 1663–1681.
34. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-001-SSA1-93, Que instituye el procedimientos por el cual se revisará, actualizará y editará la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
35. Park, E. J., & Pezzuto, J. M. (2015). The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1852(6), 1071–1113. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.01.014>
36. Peñalver, P., Efres, B.-R., Norma, A., & Marta, C. (2018). Alkylated resveratrol produgs and metabolites as potential therapeutics for neurodegenerative diseases. *Medicinal Chemistry*, 146(5), 55.
37. Pramod K., G., & Brazeau, G. A. (1999). *Injectable drug development*. Denver, Colorado: Interpharm Press.
38. Prokop, J., Abrman, P., Seligson, A. L., & Sovak, M. (2006). Resveratrol and its glycon piceid are stable polyphenols. *Journal of Medicinal Food*, 9(1), 11–14. <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.9.11>
39. Protocols, S. (1991). Product information. *Building Research & Information*, 19(3), 143–145. <https://doi.org/10.1080/09613219108727117>

40. Rajput, A. P., & Butani, S. B. (2019a). Resveratrol anchored nanostructured lipid carrier loaded in situ gel via nasal route: Formulation, optimization and in vivo characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51(December 2018), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.040>
41. Rajput, A. P., & Butani, S. B. (2019b). Resveratrol anchored nanostructured lipid carrier loaded in situ gel via nasal route: Formulation, optimization and in vivo characterization. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51(February), 214–223. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.01.040>
42. Robinson, K., Mock, C., & Liang Dong. (2017). Preformulation studies of resveratrol. *Physiology & Behavior*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
43. Rowe, R. C., Sheskey, P. J., Cook, W. G., & Quinn, M. E. (2013). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*.
44. Seljak, K. B., German, I., Ga, M., & Pobirk, A. Z. (2018). Self-microemulsifying tablets prepared by direct compression for improved resveratrol delivery. 548(June), 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.06.065>
45. Shanan, N., GhasemiGharagoz, A., Abdel-Kader, R., & Breitingner, H. G. (2019). The effect of Pyrroloquinoline quinone and Resveratrol on the Survival and Regeneration of Cerebellar Granular Neurons. *Neuroscience Letters*, 694(November 2018), 192–197. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.12.002>
46. Thomas Walle, Faye Hsieh, Mark H. DeLegge, John E. Oatis, Jr., and U. K. W., & Department. (2004). High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(12), 1377–1382. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>

47. Vijayakumar, M. R., Kumari, L., Patel, K. K., Vuddanda, P. R., Vajanthri, K. Y., Mahto, S. K., & Singh, S. (2016). Intravenous administration of: Trans -resveratrol-loaded TPGS-coated solid lipid nanoparticles for prolonged systemic circulation, passive brain targeting and improved in vitro cytotoxicity against C6 glioma cell lines. *RSC Advances*, 6(55), 50336–50348. <https://doi.org/10.1039/c6ra10777j>
48. Williams, H. D., Trevaskis, N. L., Charman, S. A., Shanker, R. M., & Charman, W. N. (2013). Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. (January), 315–499.
49. Yu, C., Geun Shin, Y., Chow, A., Li, Y., Kosmeder, J. W., Sup Lee, Y., ... Van Breemen, R. B. (2002). Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. *Pharmaceutical Research*, 19(12), 1907–1914. <https://doi.org/10.1023/A:1021414129280>
50. Zupancic, S., Lavric, Z., & Kristl, J. (2015). Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.002>

## 14. ANEXOS

## 14.1. Certificado de materia prima del resveratrol 50 %



**ALEPHQUIM, S.A. DE C.V.**  
 AV. INSURGENTES NORTE 240 INT 22  
 COLONIA STA. MARIA LA RIBERA  
 C.P. 06400 DEL. CUAUHTEMOC  
 TEL. 2630-0505 Y 55415419

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

## Polygonum Cuspidate Extract trans-Resveratrol 50% HPLC

## GENERAL INFORMATION

<b>Batch Number</b>	CHZ-A-709224	<b>Report Date</b>	6/5/2017
<b>Manufacture Date</b>	6/1/2017	<b>Expiry Date</b>	5/30/2020
<b>Botanical Source</b>	Polygonum cuspidatum	<b>Part Used</b>	Roo
<b>Country Of Origin</b>	China	<b>Appearance</b>	Brown fine powder
<b>Solvents Used</b>	Water&Ethanol	<b>Carrier Used</b>	None
<b>Sterilization Method</b>	Etanol    NON-IRR / ETO	<b>Kosher    Halal</b>	Yes    Yes, AHF
<b>ITEMS</b>	<b>SPECIFICATION</b>	<b>RESULTS</b>	<b>METHODREFERENCE</b>
Identification	Corresponds to standard	Complies	HPTLC
Trans-Resveratrol	NLT(%) 50.0	50.07	HPLC    USP <621>
Emodin	Report only (%)	1.67	HPLC    USP <621>
Particle size	NLT 95% Through 80 mesh	Complies	USP <786>
Loss on drying	NMT (%) 100	2.31	USP <731>
Bulk density	Between (g/100ml) 20-60	57	USP <616>Method I
Residue of Solvent	NMT (ppm) 500	Complies	GC    USP <467>
Lead (Pb)	NMT (ppm) 2.0	0.0620	USP<730>ICP-MS
Arsenic (As)	NMT (ppm) 2.0	1.3424	USP<730>ICP-MS
Cadmium (Cd)	NMT (ppm) 1.0	0.0333	USP<730>ICP-MS
Mercury (Mg)	NMT (ppm) 1.0	0.0073	USP<730>ICP-MS
Total Plate Count	NMT (cfu/g) 10000	45	USP<2021>
Yeas&Mold	NMT (cfu/g) 1000	10	USP<2022>
E. Coli	Absent (cfu/10g)	Complies	USP<2022>
Salmonella	Absent (cfu/10g)	Complies	USP<2022>
Staphylococcus	Absent (cfu/10g)	Complies	USP<2023>

**Storage:** Store in tight, light-resistant containers, avoid exposure to direct sunlight, moisture and excessive heat.

**Shelf life** 36 months if store under the conditions above and as saty in original packaging.

ESTE CERTIFICADO ES COPIA FIEL DEL PROPORCIONADO POR EL FABRICANTE.

  
 I.R. JACOBO GARCERAN  
 (C.E.B. PROF.6702966)

Email [ventas@alephquim.com](mailto:ventas@alephquim.com)

[www.alephquim.com](http://www.alephquim.com)

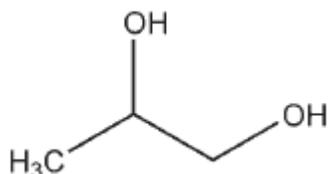
## 14.2. Generalidades del propilenglicol (PG)

**Otros nombres:** 1,2-dihidroxiopropano; E1520; 2-hidroxiopropanol; metil etileno glicol; metilglicol; propano-1,2-diol; propilenglicol.

**Formula y peso molecular:** C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> PM: 76.09 g/mol

**Descripción:** es un producto transparente, incoloro, viscoso, prácticamente inodoro.

**Estructura química:**



**Solubilidad:** miscible en acetona, cloroformo, etanol (95 %), glicerina, y agua; soluble 1 en 6 partes de éter; no miscible con aceite mineral ligero o aceites fijos, pero es algo soluble en aceites esenciales.

**Densidad:** 1.038 g/cm<sup>3</sup> a 20°C

**Punto de ebullición:** 187.6 ° C

**CAS:** 57-55-6

**Pka:** 14.9

**Usos y aplicaciones:** antimicrobiano, antiséptico, humectante, plastificante, solvente, agente estabilizador, cosolvente miscible en agua. El propilenglicol se usa como solvente para preparaciones farmacéuticas intravenosas, orales y tópicas. Generalmente se considera seguro.

**Estabilidad:** A temperaturas frías, el propilenglicol es estable en un recipiente bien cerrado, pero a altas temperaturas, al aire libre, tiende a oxidarse, dando lugar a productos como propionaldehído, ácido láctico, ácido pirúvico y ácido acético.

El propilenglicol es químicamente estable cuando se mezcla con etanol (95%), glicerina o agua ; Las soluciones acuosas pueden esterilizarse en autoclave.

**Incompatibilidades:**

El propilenglicol es incompatible con reactivos oxidantes como permanganato de potasio.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; (Rowe, Sheskey, Cook, & Quinn, 2013)

**14.3. Generalidades del PEG (PEG400)**

**Otros nombres:** etilenglicol; Etano-1,2-diol; 1,2-etanodiol; Glicol.

**Formula y peso molecular:**  $(C_2H_4O)_nH_2O$  n= número de unidades de óxido de etileno correspondientes a un peso molecular de 6 000, aproximadamente 140. PM 62.07 g/mol

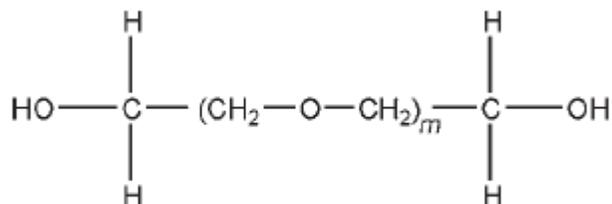
PM<sub>PEG400</sub>: 380-420 g/mol

**Descripción:**

Los grados de polietilenglicol 200–600 son líquidos; los grados 1000 y superiores son sólidos a temperaturas ambiente.

Los grados líquidos (PEG 200–600) se presentan como transparentes, incoloros o ligeramente líquidos viscosos de color amarillo. Tienen un ligero pero característico olor y un sabor amargo, ligeramente ardiente.

**Estructura química:**



**Solubilidad:** El PEG 400 es miscible con agua, muy soluble en acetona, en alcohol y en cloruro de metileno, prácticamente insoluble en aceites grasos y en aceites minerales; PEG 3000 y PEG 3350: muy soluble en agua y en cloruro de metileno, muy poco soluble

en alcohol, prácticamente insoluble en aceites grasos y en aceites minerales; PEG 4000, PEG 6000 y PEG 8000: muy soluble en agua y en cloruro de metileno, prácticamente insoluble en alcohol y en aceites grasos y en aceites minerales.

**pka:**15.1

**Densidad PEG400:** 1.12 g/cm<sup>3</sup> 25°C

**pH:** 4-7 (solución 5 %)

#### **Usos y aplicaciones:**

Base de ungüento, plastificante solvente, base de supositorio, lubricante para cápsulas y tabletas.

Los polietilenglicoles (PEG) se usan ampliamente en una variedad de formulaciones farmacéuticas, incluyendo parenteral, tópica, preparaciones oftálmicas, orales y rectales. El polietilenglicol tiene sido utilizado experimentalmente en matrices poliméricas biodegradables utilizadas en sistemas de liberación controlada. Los polietilenglicoles son sustancias hidrofílicas estables que son esencialmente no irritante para la piel.

En concentraciones de hasta aproximadamente 30% v / v, PEG 300 y PEG 400 se ha utilizado como vehículo para formas de dosificación parenteral. En formulaciones de dosificación sólida, polietileno de mayor peso molecular los glicoles pueden mejorar la efectividad de los aglutinantes de tabletas y imparte plasticidad a los gránulos.

#### **Estabilidad:**

Los polietilenglicoles son químicamente estables en el aire y en solución, aunque los grados con un peso molecular inferior a 2000 son higroscópico. Los polietilenglicoles no son compatibles con el crecimiento microbiano, y no se vuelven rancios. La temperatura debe ser mantenida al mínimo necesario para asegurar la fluidez; la oxidación puede ocurrir si los polietilenglicoles están expuestos durante largos períodos a temperaturas superiores a 50°C. Sin embargo, almacenamiento bajo nitrógeno reduce la posibilidad de oxidación.

#### **Incompatibilidad:**

La reactividad química de los polietilenglicoles se limita principalmente a los dos grupos hidroxilo terminales, que pueden estar esterificados o eterificado Sin embargo, todos los

grados pueden exhibir alguna actividad oxidante debido a la presencia de impurezas de peróxido y secundaria productos formados por autoxidación. Los grados de polietilenglicol líquido y sólido pueden ser incompatibles con algunos colorantes.

La actividad antibacteriana de ciertos antibióticos se reduce en bases de polietilenglicol, particularmente la de penicilina y bacitracina. La eficacia conservadora de los parabenos también puede ser deteriorado debido a la unión con polietilenglicoles. La decoloración de sulfonamidas y ditranol también puede ocurrir, y el sorbitol puede precipitarse de las mezclas. Plásticos, tales como polietileno, fenolformaldehído, cloruro de polivinilo y las membranas de éster de celulosa (en filtros) pueden ablandarse o disolverse por polietilenglicoles.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; (Rowe, Sheskey, Cook, & Quinn, 2013)

#### 14.4. Generalidades del etanol (EtOH)

**Otros nombres:** Etanol (96 por ciento); alcohol etílico; hidróxido de etilo; alcohol de grano; metil carbinol.

**Formula y peso molecular:** C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O PM 46.07

##### Descripción:

Un líquido claro e incoloro que se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y se distribuye por todo el cuerpo. Tiene actividad bactericida y se usa a menudo como antiséptico. Es ampliamente utilizado como solvente y conservante en preparaciones farmacéuticas, además de servir como ingrediente principal en bebidas alcohólicas.

##### Estructura química:



**Solubilidad:** miscible en cloroformo, éter, glicerina, y agua

**pka:** 15.9

**Densidad:** 0.79 g/cm<sup>3</sup>

**pH:** 7

**Usos y aplicaciones:**

Conservador antimicrobiano, antiséptico, solvente.

Etanol y soluciones acuosas de etanol de varias concentraciones se utilizan ampliamente en productos farmacéuticos formulaciones y cosméticos. Aunque el etanol es utilizado principalmente como solvente, también se emplea como desinfectante, y en soluciones como conservante antimicrobiano. Las soluciones de (1,2) Etanol tópico se utilizan en el desarrollo de la administración de sistemas transdérmicos de fármacos como potenciadores de penetración.

**Estabilidad:**

Las soluciones acuosas de etanol pueden esterilizarse por autoclave o por filtración y debe almacenarse en recipientes herméticos, en un lugar fresco.

**Incompatibilidad:**

En condiciones ácidas, las soluciones de etanol pueden reaccionar vigorosamente con materiales oxidantes. Las mezclas con álcali pueden oscurecerse debido a una reacción con cantidades residuales de aldehído.

Las sales o acacias pueden precipitarse a partir de soluciones o dispersiones acuosas. Las soluciones de etanol también son incompatibles con los envases de aluminio y pueden interactuar con algunos medicamentos.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>; (Rowe, Sheskey, Cook, & Quinn, 2013)

## 14.5. Condiciones cromatográficas para el análisis de resveratrol

**Tabla 30.** Condiciones cromatográficas para el análisis de RSV.

<b>Columna</b>	Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm, Irlanda) No. De serie: W23331X020
<b>Temperatura de la columna</b>	Temperatura ambiente
<b>Longitud de onda</b>	306
<b>Fase móvil</b>	Formiato de amonio 10mM, pH=4: Acetonitrilo (70:30)
<b>Flujo</b>	0.9 mL/min
<b>Tiempo de retención</b>	2.69 min.
<b>Volumen de inyección</b>	10 µL

## 14.6. Procedimiento para la evaluación de variables de respuesta en el diseño de experimentos factorial 3<sup>3</sup>.

1. Preparar 1L de EtOH:agua 50:50
2. Preparar un estándar secundario a 3.5 mcg/mL
3. Preparar fase móvil para HPLC.
4. Pesar 0.035 g de materia prima resveratrol en pesa muestra
5. Agregar lo pesado en un tubo de centrifuga de 15 mL
6. Pesar la cantidad de cosolventes de acuerdo a las formulaciones planteadas por el diseño experimental.
7. Agregar el PEG400 y/o PG al tubo de centrifuga donde está contenido el resveratrol.
8. Posteriormente agregar el etanol (según aplique el ensayo) y agitar en vortex hasta ver que ya no se pueda disolver el resveratrol o hasta ver completa disolución.
9. Llevar a volumen de 10 mL con agua purificada y agitar con el vortex hasta lograr homogeneidad.
10. Centrifugar soluciones a 2500 rpm por 10 minutos
11. Después de centrifugar tomar una alícuota de 1 mL colocar en un matraz de 20 mL, llevar a volumen con EtOH:agua 1:1
12. De la dilución obtenida en el punto 11 tomar una alícuota de 0.5 mL, colocar en un matraz de 25 mL y llevar a volumen con EtOH:agua 1:1
13. Leer en espectrofotómetro a 306 nm y calcular el porcentaje de resveratrol.
14. Medir pH de la formulación con un potenciometro.

### 14.7. Cálculos para determinar potencial hemolítico

100ml – 0.9 g NaCl

10 ml – – 0.09 g NaCl Se necesitan para ser una solución isotónica

#### Datos

$PM_{RSV} = 228.25 \text{ g/mol}$

$$Eq \text{ NaCl} = 17 \frac{L \text{ iso}}{PM}$$

L iso = 1.9 para fármacos no electrolitos

#### Cálculos

$$Eq \text{ NaCl} = 17 \frac{1.9}{228.25g} = 0.1415g \text{ NaCl}$$

$\frac{0.1415g \text{ NaCl}}{1g \text{ RSV}} \times \frac{0.35g}{100ml} \times 10ml = 4.9525 \times 10^{-3}g$  de NaCl/ RSV la solución no es isotónica por lo tanto:

0.09 g NaCl -  $4.9525 \times 10^{-3}g$  NaCl/RSV = 0.0850 g NaCl se requieren para volver isotónica la solución.

#### 14.8. Resultados del análisis de intervalos de confianza para estabilidad del resveratrol

**Tabla 31.** Resultados de intervalos de confianza para F2.

Temperatura / envase	F2 % Resveratrol			F2 PH		
	Pendiente	LI	LS	Pendiente	LI	LS
4°C A	-0.0525	-0.0790	-0.0259	-0.0061	-0.0111	-0.0011
4°C V	-0.0364	-0.0597	-0.0130	-0.0061	-0.0111	-0.0011
30°C A	-0.0543	-0.0824	-0.0261	-0.0002	-0.0021	0.0016
30°C V	-0.0350	-0.0702	0.0002	-0.0002	-0.0021	0.0016
40°C A	-0.0482	-0.0926	-0.0038	-0.0028	-0.0038	-0.0017
40°C V	-0.0421	-0.0870	0.0027	-0.0028	-0.0038	-0.0017
50°C A	-0.0568	-0.1172	0.0035	-0.0059	-0.0092	-0.0026
50°C V	-0.0511	-0.0891	-0.0131	-0.0059	-0.0092	-0.0026
60°C A	-0.0789	-0.1348	-0.0229	-0.0092	-0.0146	-0.0038
60°C V	-0.0686	-0.1011	-0.0362	-0.0092	-0.0146	-0.0038

**Tabla 32.** Resultados de intervalos de confianza para F5.

Temperatura / envase	F5 % Resveratrol			F5 PH		
	Pendiente	LI	LS	Pendiente	LI	LS
4°C A	0.0038	-0.0082	0.0158	-0.0011	-0.0040	0.0017
4°C V	0.0034	-0.0114	0.0182	0.0000	-0.0023	0.0023
30°C A	-0.0110	-0.0268	0.0047	-0.0010	-0.0025	0.0006
30°C V	-0.0104	-0.0240	0.0033	-0.0011	-0.0027	0.0005
40°C A	-0.0221	-0.0369	-0.0072	-0.0019	-0.0038	0.0000
40°C V	-0.0094	-0.0185	-0.0003	-0.0011	-0.0031	0.0009
50°C A	-0.0072	-0.0222	0.0077	-0.0026	-0.0041	-0.0011
50°C V	-0.0124	-0.0333	0.0085	-0.0027	-0.0041	-0.0013
60°C A	-0.0401	-0.0568	-0.0234	-0.0068	-0.0108	-0.0029
60°C V	-0.0189	-0.0306	-0.0071	-0.0056	-0.0093	-0.0019

**Tabla 33.** Resultados de intervalos de confianza para F23.

Temperatura / envase	F23 % Resveratrol			F23PH		
	Pendiente	LI	LS	Pendiente	LI	LS
4°C A	-0.0380	-0.0509	-0.0252	-0.0020	-0.0038	-0.0002
4°C V	-0.0263	-0.0447	-0.0079	0.0015	-0.0019	0.0050
30°C A	-0.0419	-0.0602	-0.0237	-0.0003	-0.0016	0.0010
30°C V	-0.0292	-0.0418	-0.0165	0.0009	-0.0023	0.0042
40°C A	-0.0503	-0.0717	-0.0290	-0.0017	-0.0027	-0.0007
40°C V	-0.0193	-0.0302	-0.0084	0.0005	-0.0028	0.0037
50°C A	-0.0480	-0.0633	-0.0327	-0.0007	-0.0031	0.0016
50°C V	-0.0688	-0.1225	-0.0150	0.0013	-0.0024	0.0049
60°C A	-0.0634	-0.0925	-0.0342	-0.0018	-0.0036	0.0001
60°C V	-0.0558	-0.0895	-0.0221	-0.0004	-0.0053	0.0044

### 14.9. Efectos estimados.

#### Efectos estimados para RSV Disol UV

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	83.4856	1.51748	
A:PG	8.87556	2.14604	1.0
B:PEG 400	8.80778	2.14604	1.0
AB	-20.895	2.62835	1.0
BC	-7.03333	2.62835	1.0
CC	15.1789	3.71705	1.0

Errores estándar basados en el error puro con 3 g.l.

#### Efectos estimados para RSV Disol HPLC

<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	89.5781	2.68551	
A:PG	15.0633	6.57814	1.0
B:PEG 400	16.8922	6.57814	1.0
AB	-24.8083	8.05654	1.0
BC	-17.3967	8.05654	1.0
ABC	23.54	9.86721	1.0

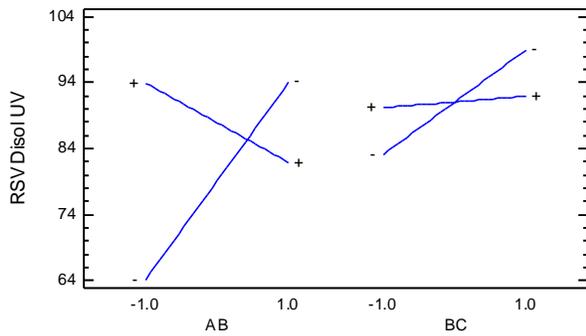
Errores estándar basados en el error total con 21 g.l.

#### Efectos estimados para pH Iny

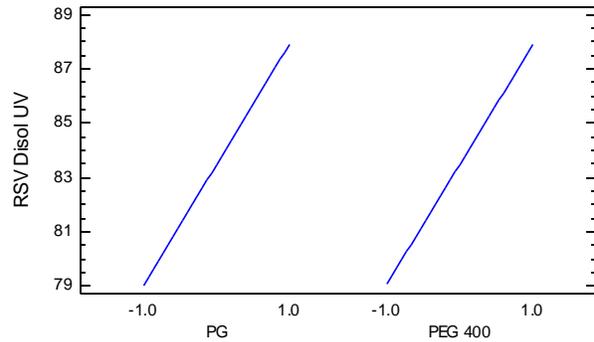
<i>Efecto</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error Estd.</i>	<i>V.I.F.</i>
promedio	6.50741	0.0724747	
A:PG	0.322222	0.177526	1.0
B:PEG 400	0.0222222	0.177526	1.0
C:EtOH	-0.0777778	0.177526	1.0

Errores estándar basados en el error total con 23 g.l.

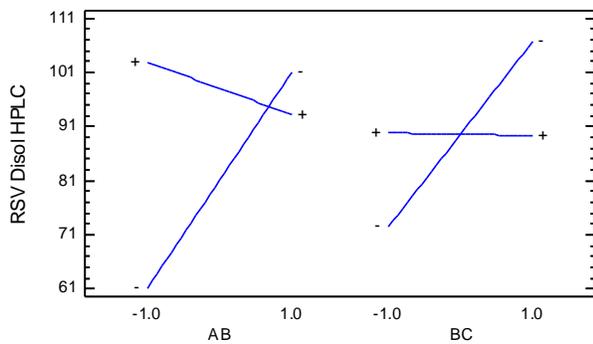
Gráfica de Interacción para RSV Disol UV



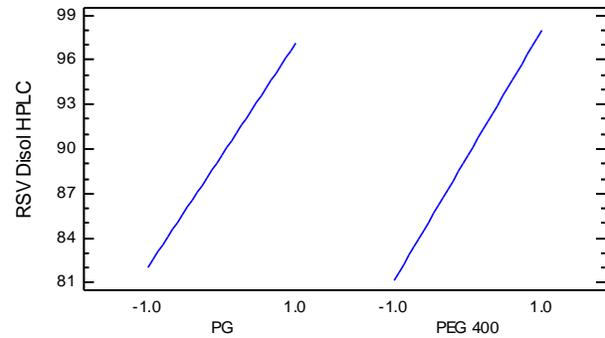
Gráfica de Efectos Principales para RSV Disol UV



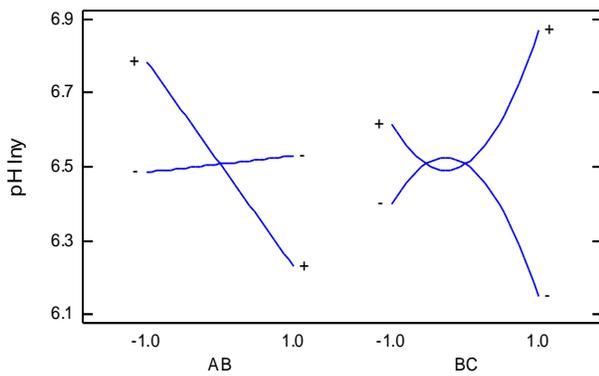
Gráfica de Interacción para RSV Disol HPLC



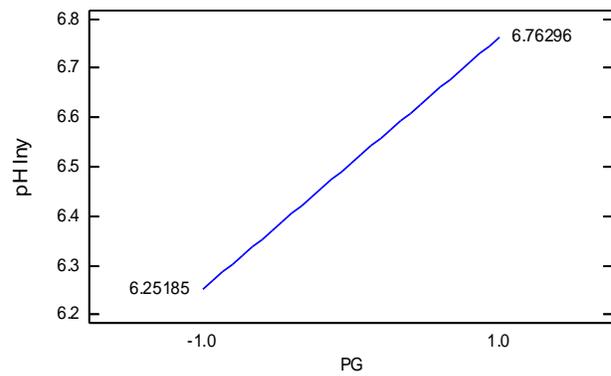
Gráfica de Efectos Principales para RSV Disol HPLC



Gráfica de Interacción para pH lny



Gráfica de Efectos Principales para pH lny



#### 14.10. Coeficientes de regresión de las respuestas evaluadas en el diseño de experimentos.

##### Coef. de regresión para pH Iny

Coeficiente	Estimado
constante	6.50741
A:PG	0.161111
B:PEG 400	0.0111111
C:EtOH	-0.0388889

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{pH Iny} = 6.50741 + 0.161111 \cdot \text{PG} + 0.0111111 \cdot \text{PEG 400} - 0.0388889 \cdot \text{EtOH}$$

##### Coef. de regresión para RSV Disol UV

Coeficiente	Estimado
constante	83.4856
A:PG	4.43778
B:PEG 400	4.40389
AB	-10.4475
BC	-3.51667
CC	7.58944

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{RSV Disol UV} = 83.4856 + 4.43778 \cdot \text{PG} + 4.40389 \cdot \text{PEG 400} - 10.4475 \cdot \text{PG} \cdot \text{PEG 400} - 3.51667 \cdot \text{PEG 400} \cdot \text{EtOH} + 7.58944 \cdot \text{EtOH}^2$$

##### Coef. de regresión para RSV Disol HPLC

Coeficiente	Estimado
constante	89.5781
A:PG	7.53167
B:PEG 400	8.44611
AB	-12.4042
BC	-8.69833
ABC	11.77

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{RSV Disol HPLC} = 89.5781 + 7.53167 \cdot \text{PG} + 8.44611 \cdot \text{PEG 400} - 12.4042 \cdot \text{PG} \cdot \text{PEG 400} - 8.69833 \cdot \text{PEG 400} \cdot \text{EtOH} + 11.77 \cdot \text{PG} \cdot \text{PEG 400} \cdot \text{EtOH}$$

#### 14.11. Matriz de correlación para los efectos estimados.

##### Matriz de Correlación para los Efectos Estimados para RSV Disol UV

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
(1)	promedio	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.8165
(2)	A:PG	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(3)	B:PEG 400	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)	AB	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
(5)	BC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
(6)	CC	-0.8165	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000

##### Matriz de Correlación para los Efectos Estimados para RSV Disol HPLC

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
(1)	promedio	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(2)	A:PG	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(3)	B:PEG 400	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)	AB	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
(5)	BC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
(6)	ABC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000

La matriz de correlación muestra el grado de confusión entre los efectos. Un diseño perfectamente ortogonal mostrará una matriz diagonal con 1's en la diagonal y 0's fuera de ella. Cualquier término distinto de cero implica que los estimados de los efectos correspondientes a esa fila y columna estarán correlacionados. En estos casos, no hay correlación entre ninguno de los efectos. Esto significa que se obtendrán estimados 'limpios' para todos esos efectos.

**Matriz de Correlación para los Efectos Estimados pH Iny**

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1)	promedio	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(2)	A:PG	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.6325	-0.6325	0.0000
(3)	AB	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)	BC	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(5)	AAC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	-0.6667
(6)	ABB	0.0000	-0.6325	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
(7)	ACC	0.0000	-0.6325	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
(8)	BBC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.6667	0.0000	0.0000	1.0000

La matriz de correlación muestra el grado de confusión entre los efectos. Un diseño perfectamente ortogonal mostrará una matriz diagonal con 1's en la diagonal y 0's fuera de ella. Cualquier término distinto de cero implica que los estimados de los efectos correspondientes a esa fila y columna estarán correlacionados. En este caso, hay 3 pares de efectos con interacción distinta de cero. Dado que uno ó más pares son mayores o iguales que 0.5, puede ser que tenga alguna dificultad para separar los efectos unos de otros al analizar los datos. Hay considerar agregar corridas adicionales al diseño para reducir las correlaciones.

Gráfica de Cubo para RSV Disol UV

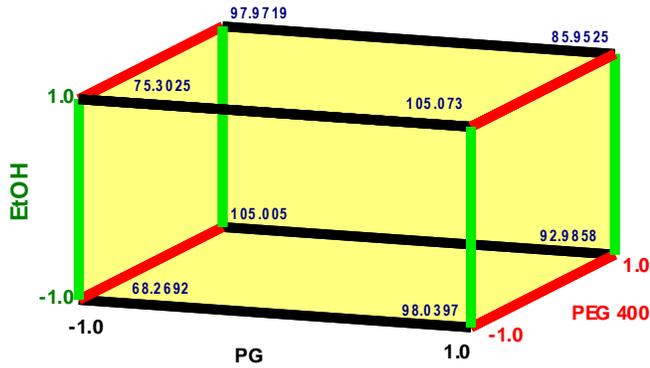
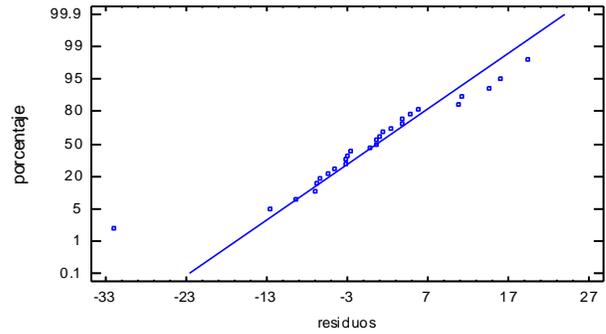


Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos



Gráfica de Cubo para RSV Disol HPLC

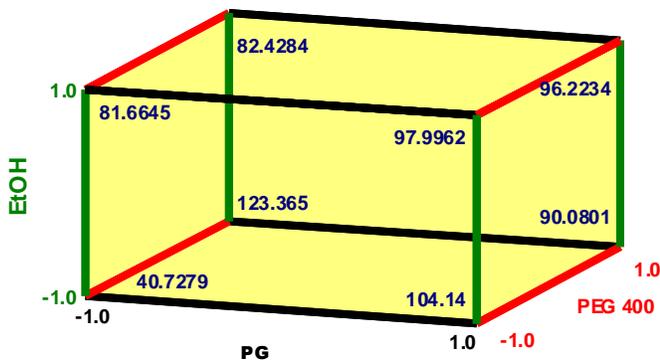
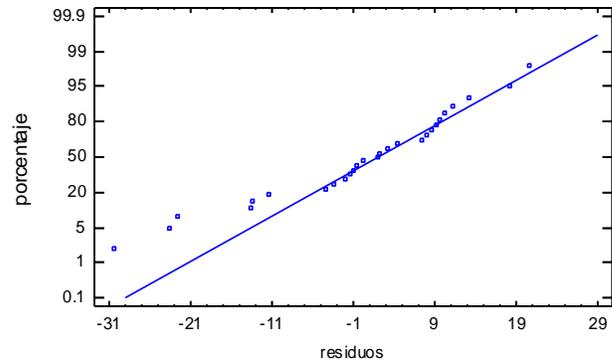


Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos



Gráfica de Cubo para pH Iny

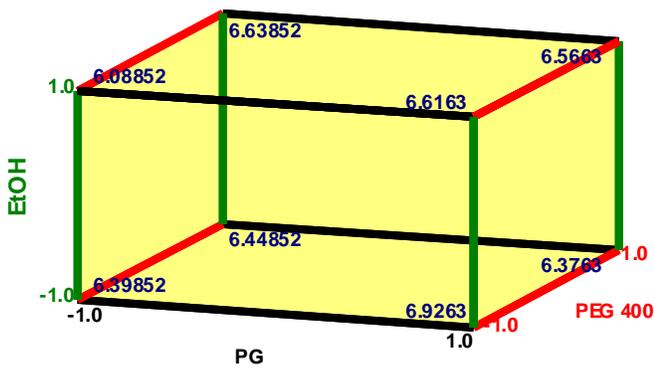
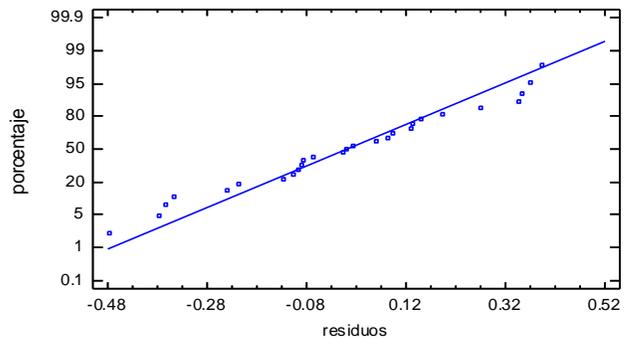
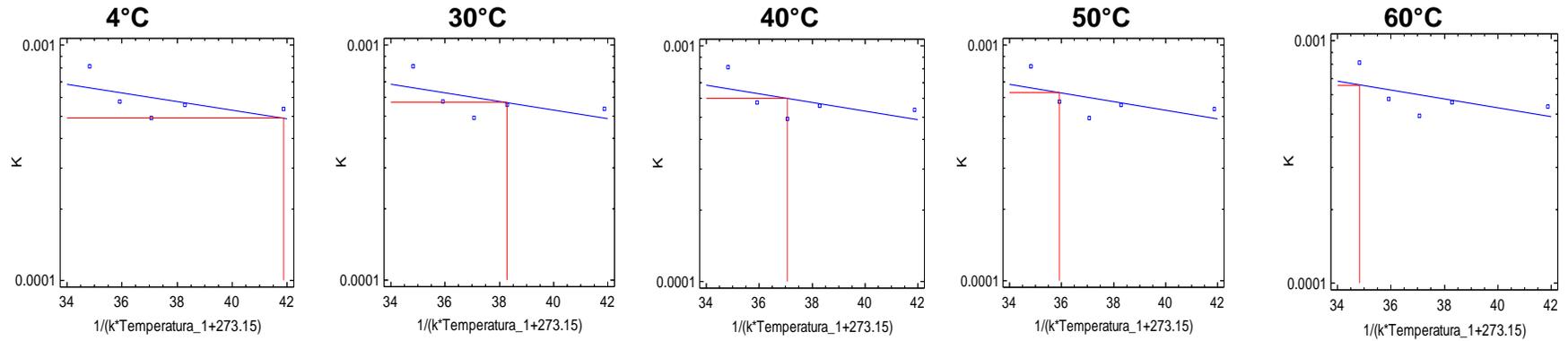


Gráfico de Probabilidad Normal para Residuos

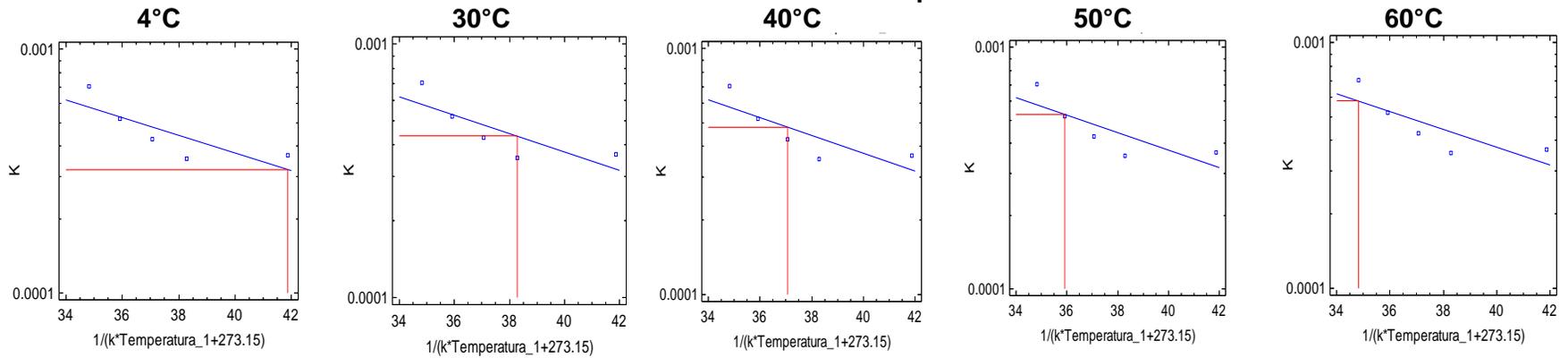


El lado izquierdo muestra los gráficos de superficie de respuesta en cubo mostrando en la línea verde el factor etanol en sus 3 niveles, la línea negra al factor PG y la línea roja PEG400. Del lado derecho de muestran los gráficos de probabilidad normal para residuos, la gráfica se emplea para verificar los residuos están distribuidos normalmente por lo que se debe seguir un comportamiento lineal. Como se puede observar en todos los caso se muestran puntos alejados de la línea lo cual implica una distribución con valores atípicos.

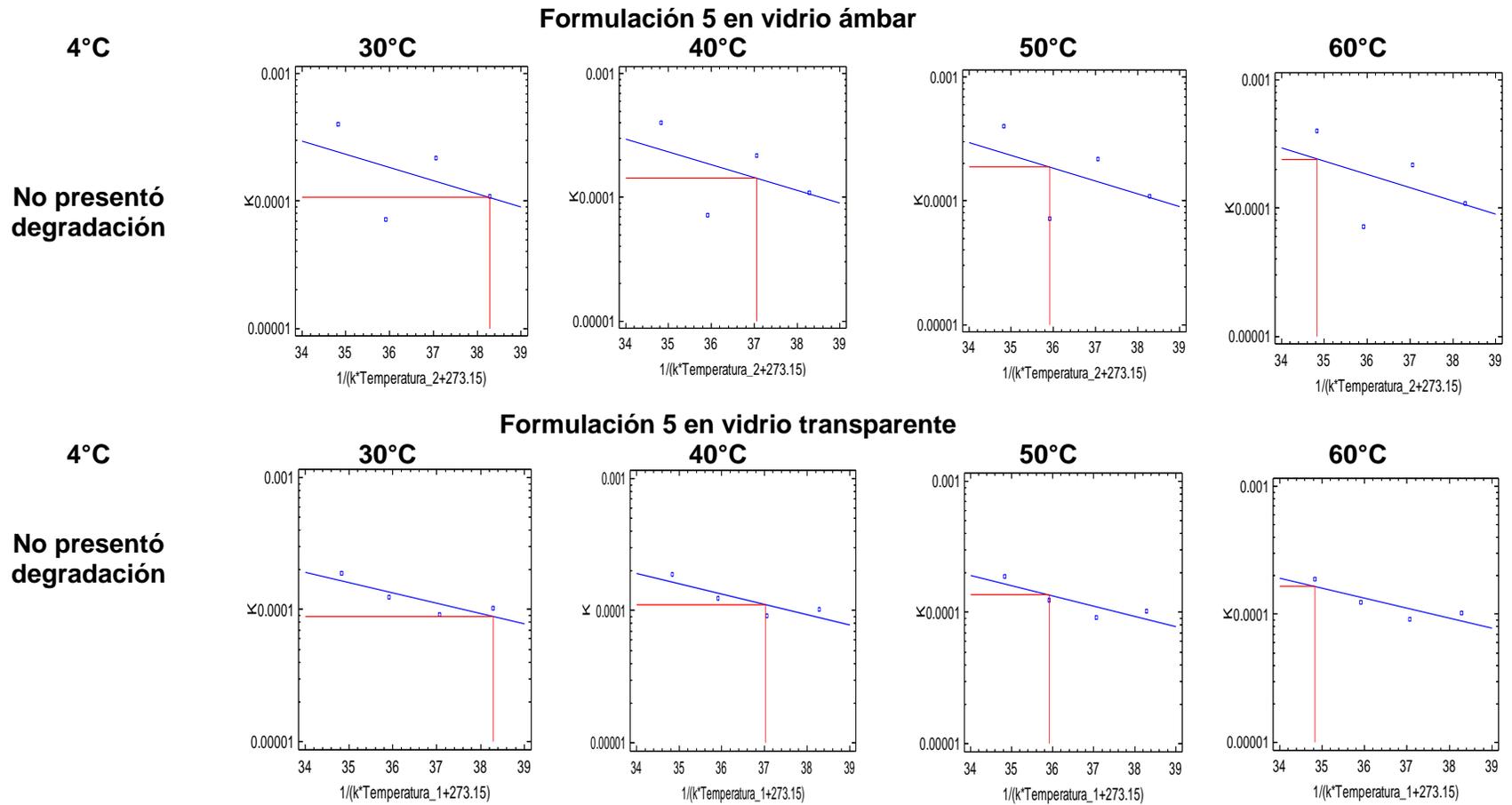
**Formulación 2 en Vidrio ámbar**



**Formulación 2 en vidrio transparente**

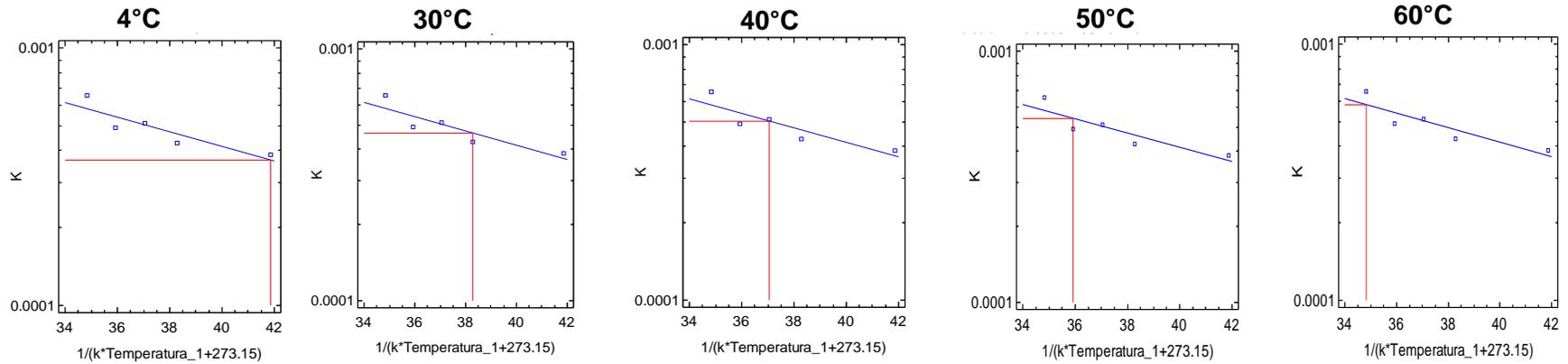


Esquemas de la ecuación de Arrhenius para la formulación 2.

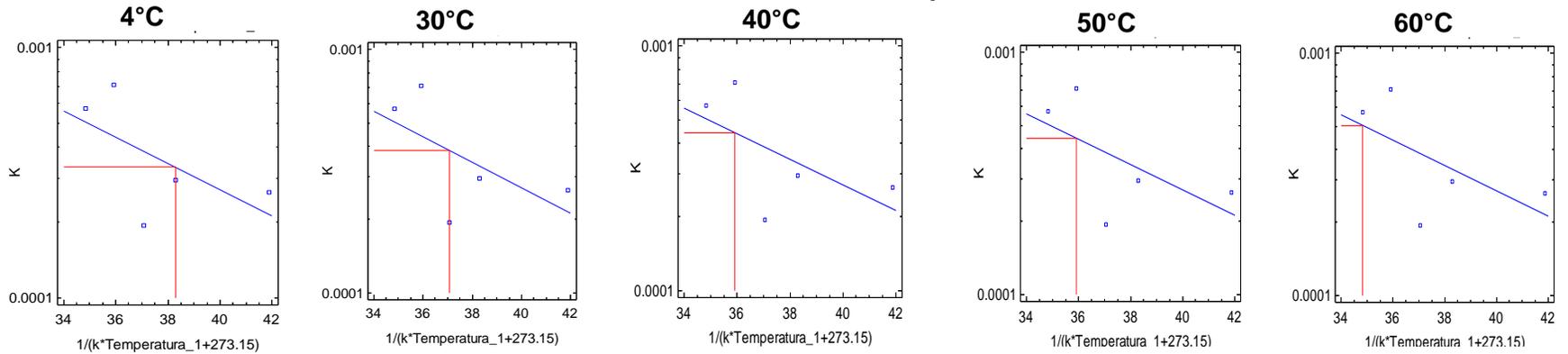


Esquemas de la ecuación de Arrhenius para la formulación 5.

**Formulación 23 en vidrio ámbar**



**Formulación 23 en vidrio transparente**



Esquemas de la ecuación de Arrhenius para la formulación