

Caracterización de los procesos de liofilización y reconstitución de un hemosustituto a base de perfluoro-octilbromuro

Cortázar G., Jessica Milena; Jiménez G., Maria Camila

Resumen

Un hemosustituto es una sustancia que busca cumplir la función de transportar oxígeno como lo hace la sangre en un ser vivo. Uno de los sistemas que se utilizan como hemosustitutos corresponde a emulsiones a base de perfluoro-octilbromuro (PFOB). Una investigación previa ha mostrado que el proceso de liofilización en un hemosustituto puede aportar condiciones favorables para su uso parenteral pero también ha generado tamaños de partícula no recomendables para la salud humana [1]. Como método para mejorar esta condición, se propuso analizar el efecto de la lecitina de huevo (tensoactivo) sobre la liofilización del producto así como poner en marcha una metodología de reconstitución para la disminución del tamaño de gota. Para esto, se hizo uso de sistemas similares al hemosustituto, emulsiones de aceite mineral en agua, con el fin de generar comparaciones coherentes. Así, se estableció la influencia de la lecitina de huevo sobre la encapsulación de aceite en el proceso de liofilización y se evaluó la eficacia del ultrasonido y del vortex para la disminución del tamaño de partícula a lo largo del proceso de reconstitución. De acuerdo a los resultados obtenidos, la lecitina de huevo encapsula correctamente el aceite para que se mantenga en la muestra después de liofilización. Asimismo, el uso de ultrasonido y vortex disminuye el tamaño de partícula durante la reconstitución de manera que se cumplan condiciones para la administración parenteral.

Palabras clave— Hemosustituto, lecitina de huevo, perfluoro-octilbromuro (PFOB), liofilización, emulsión.

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y los bancos de sangre llevan a cabo programas e incentivos para que las personas aptas para donar sangre lo hagan regularmente. Esto se realiza con el fin de tener un suministro y una reserva mínimos de éste tejido para cubrir los tratamientos y atención a accidentes [2].

Sin embargo, la cantidad del fluido se encuentra limitada. En efecto, la sangre almacenada en los bancos sólo puede ubicarse allí por un periodo de tiempo limitado, debido a que es un producto perecedero y cada componente tiene un tiempo de almacenaje establecido. Los glóbulos rojos se conservan por 42 días, las plaquetas durante 5 días y el plasma se puede almacenar durante 2 años [3]. Además, se deben realizar pruebas para garantizar que su administración no represente ningún riesgo para el paciente (contagio de VIH, Hepatitis B, sífilis, inmuno-compatibilidad, entre otros) [4]. Es por ello que, en los últimos años, la falta de disponibilidad del

fluido ha causado millones de muertes alrededor del mundo. Según la OMS, el 25% de las madres que presentan complicaciones en el embarazo mueren por hemorragias. Asimismo, 1.2 millones de personas mueren cada año por accidentes vehiculares [5]. Una gran cantidad de éstas muertes, se dan por una situación hemodinámica llamada choque hipovolémico, causada porque el corazón pierde la capacidad de bombear la sangre debido a la pérdida del fluido [6].

Así, la Universidad de los Andes se encuentra en el proceso de desarrollar un hemosustituto. En otras palabras, se está sintetizando un fluido que tiene como función el transporte de gases esenciales en el proceso de respiración, tal y como lo hace la sangre. El reactivo encargado de esta función es el Perfluoro-Octilbromuro, que corresponde al componente a cargo del transporte de oxígeno. Otro de los componentes del sustituto es la lecitina de huevo, que es un tensoactivo comúnmente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica. Se usa como surfactante en el hemosustituto debido a su afinidad

biológica ya que no es de origen vegetal sino animal [7]. Además, este componente es compatible con el cuerpo humano ya que está presente en la bilis, que es producida por el hígado [8]. Adicionalmente, éste sustituto no presenta las complicaciones que tiene la donación, tales como incompatibilidad, la transmisión de enfermedades y los problemas de almacenamiento. El desarrollo de este producto es posible debido al establecimiento de una formulación y una metodología de síntesis de una emulsión que tiene las propiedades mencionadas y requisitos para ser administrada parenteralmente.

Estudios previos han permitido caracterizar el hemosustituto. Por un lado, investigaciones realizadas por Navarrete muestran que la estabilidad de la emulsión se ve afectada por la presencia de oxígeno. Ciertamente, se determinó la existencia de grupos sensibles al oxígeno que desencadenaban la activación de un proceso de degradación. Por otro lado, se encontró que existe un efecto negativo de la temperatura sobre el producto. Así, se mostró que hay un aumento del tamaño de partícula debido a la degradación de componentes por estrés térmico [9] [10].

Posteriormente, determinaron el tamaño de gota requerido del hemosustituto. Así, se planteó la necesidad de cumplir con un tamaño de partícula inferior a 5µm. En efecto, este tamaño de gota se requiere para asegurar el buen transporte del producto a través de los capilares sanguíneos, durante la administración parenteral, sin que se presente embolia [11]. Estudios asociados a la disminución de tamaño de gota en emulsiones, para la creación de sistemas similares al producto analizado, sugieren que se aplique energía adicional a la agitación durante la incorporación de fases. Para ello, Abbas et al proponen el ultrasonido [12] debido a que presenta cavitación, induce la rápida formación y el colapso de micro-burbujas en la interface de las fases continua y dispersa. Este colapso, a su vez, produce poderosas ondas de choque que desencadenan fuerzas de cizalla y permiten la obtención de gotas más pequeñas [13].

Por otra parte, Luengas et al propusieron la puesta en marcha de un proceso de liofilización como medio para mejorar las propiedades del hemosustituto. A

través de este mecanismo, se mejora la estabilidad, la esterilización, y el transporte del sustituto, debido a la reducción de peso [1]. La liofilización es un proceso de separación, mediante el cual se retira la fase acuosa de una muestra, usando bajas temperaturas y presiones, obteniendo un sólido concentrado [14]. Asimismo, Liversidge et al, en su estudio de modificadores de superficie a base de nanopartículas, presentan condiciones favorables para la liofilización de compuestos similares al hemosustituto. En primer lugar, reiteran que es de vital importancia el uso de un modificador de superficie o una mezcla de estos. Segundo, plantean una reducción de tamaño de gota a escala micro, antes de la liofilización y, al igual que Abbas et al, sugieren el uso de ultrasonido para llegar a esta condición. Tercero, consideran la utilización de crioprotectores [15] con el fin de proteger al componente de interés del proceso de congelación, mediante la disminución del punto eutéctico de la emulsión [16]. Actualmente, el grupo de Hemosustitutos de la Universidad de los Andes está trabajando en la adición de crioprotectores en la fórmula y, por ende, en el presente estudio no se tuvo en cuenta su uso.

A partir de los estudios previos, la necesidad de mejora y desarrollo del hemosustituto, el presente trabajo tiene por objetivo estudiar el efecto de la lecitina sobre el proceso de liofilización para el hemosustituto así como tomar el aceite mineral como sustancia de referencia para la liofilización de emulsiones directas. Asimismo, se plantea disminuir el tamaño de gota del liofilizado-reconstituido para el producto final con PFOB así como para emulsiones directas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se abordará la metodología utilizada para el desarrollo del proyecto. Así, se mostrarán los métodos asociados a la preparación, la liofilización, la reconstitución y la caracterización tanto del hemosustituto como de emulsiones directas.

1. PREPARACIÓN

A continuación se indica el procedimiento para la preparación del producto a base de PFOB así como de las emulsiones directas a base de agua, aceite y modificadores de tensión.

1.1. PREPARACIÓN DEL HEMOSUSTITUTO

Para la síntesis del hemosustituto se hizo uso de la formulación desarrollada en la Universidad de los Andes, siguiendo el protocolo PRO-PPH-31-02 [17]. Además, el protocolo mencionado previamente incluye el uso de reactivos tales como: lecitina de huevo, PFOB y Glicerina, entre otros.

1.2. PREPARACIÓN DE EMULSIONES

Para la preparación de emulsiones se utilizaron tres tensoactivos distintos. Por un lado, Span 80® y Tween 20®, proveídos por CRODA y con HLB de 4,3 y 16,7 respectivamente [18]. Por otro lado, se hizo uso de lecitina de huevo, agua desionizada microfiltrada y aceite mineral grado USP.

Respecto a las condiciones de preparación, es de interés mencionar que se utilizó un homogenizador D-91126 de Heidolph Instruments a 10000 rpm así como un microfluidizador a 18000 psi por cinco ciclos. Esto se realizó con miras a cumplir un proceso de incorporación similar al del hemosustituto.

1.2.1. Emulsiones con variación de tensoactivo

Se prepararon tres tipos de emulsiones directas aceite en agua (O/W) al 30% (p/p) en fase dispersa, debido a que la fase dispersa del hemosustituto es al mismo porcentaje, siguiendo las formulaciones presentadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Formulación de emulsiones

Reactivos	Emul. 1	Emul. 2	Emul. 3
Agua (g)	167.9	167.9	167.9
Span 80® (g)	2.980	-	2.980
Tween 20® (g)	7.010	-	7.010
Lecitina (g)	-	2.400	2.400
Aceite (g)	72.01	72.01	72.01

1.2.2. Emulsiones con variación de lecitina

Después, se prepararon cuatro tipos de emulsiones directas, al 30% (p/p) en fase dispersa, generando variaciones en la cantidad de lecitina utilizada como se indica en la Tabla 2.

Tabla 2. Formulación de emulsiones con lecitina

Componente	E1	E2	E3	E4
Agua (g)	80.63	80.63	80.63	80.63
Aceite (g)	34.56	34.56	34.56	34.56
Span (g)	1.43	1.43	1.43	1.43
Tween (g)	3.36	3.36	3.36	3.36
Lecitina (g)	3.00	6.00	9.00	12

1.2.3. Emulsiones con variación de fase dispersa

Ahora bien, se fijó la cantidad de lecitina a utilizar en 6g y se generaron variaciones en la proporción de fase dispersa para la preparación de emulsiones directas. En ese orden de ideas, se hicieron cinco emulsiones, en un rango de 5% a 30% (p/p) de fase dispersa como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Formulación de emulsiones variando fase dispersa

Fase Dispersa (p/p)	Agua (g)	Tween (g)	Aceite (g)	Span (g)
5%	138.29	4.21	5.71	1.79
10%	130.79	4.21	13.21	1.79
15%	123.29	4.21	20.71	1.79
20%	115.79	4.21	28.21	1.79
30%	100.79	4.21	43.21	1.79

2. LIOFILIZACIÓN

Esta parte abarca el funcionamiento del proceso de liofilización que se realizó tanto para el hemosustituto como para las emulsiones directas. En ese orden de ideas, se hizo uso de viales de 20mL y de un liofilizador FreeZone 6 Liter Benchtop Dry System de LABCONCO. Así, se agregaron 1.5mL/vial del producto a liofilizar y se configuraron pruebas siguiendo el protocolo de liofilización PRO-PPH-33-00, detallado en la Tabla 4 [19].

Tabla 4.

Protocolo de Liofilización

Segmento	Rampa [°C/min]	Temperatura [°C]	Presión [mBar]	Tiempo [h]
1	0.14	-45	—	9
2	0.01	-45	0.14	18
3	0.30	-10	0.14	3
4	0.30	17	0.14	1.7

3. RECONSTITUCIÓN

Para el proceso de reconstitución se utilizaron 1.5mL de agua desionizada microfiltrada y de suero fisiológico al 0.9% (p/v) como compuestos reconstituyentes para las emulsiones directas y para el hemosustituto, con variación de tensoactivo, respectivamente. Dicha etapa se realizó en los viales donde se encontraban las muestras. Asimismo, se aseguró un tiempo de agitación de 10 minutos y se utilizaron tres vías distintas. Por un lado, se realizó una muestra control que se basaba en agitar manualmente hasta observar homogenización. Por otro lado, siguiendo la literatura expuesta

previamente, se utilizó un ultrasonido Ultrasonic 2510^{MT} de Branson durante 10 minutos a 40 kHz. Además, como método adicional, se agitó con un vortex Multi Vortex Genie Shaker de Cole-Parmer a dos velocidades distintas: 200 rpm y 300 rpm. Esto se propuso ya que el vortex es un agitador comúnmente utilizado que genera un movimiento controlado, continuo y que permite mezclar el reconstituido mientras se genera una variación de la energía aplicada al sistema.

Cabe resaltar que para el hemosustituto se realizaron los tres métodos de reconstitución propuestos previamente. Sin embargo, para las emulsiones con variación de tensoactivo solo se utilizó el método del Vortex con una velocidad fija de 300 rpm.

4. CARACTERIZACIÓN

Esta etapa se dividió en tres pruebas diferentes. Se realizaron medidas de tamaño de partícula haciendo uso de un Master Sizer 3000 de Malvern®, se buscó confirmar la presencia de aceite a partir de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) en un SmartProbe™ Analyzer 5000 de FOSS y se generó un análisis cualitativo de las muestras.

4.1. Tamaño de Partícula

Después de que todas las muestras estaban homogeneizadas se midió el tamaño de gota. El equipo encargado de esto emite un haz de láser a través de la muestra, y mide la variación angular en la intensidad de la luz, para determinar el tamaño de partícula [20]. Para efectos de este proyecto, el tamaño de partícula se evaluó para el hemosustituto y para las emulsiones directas con variación de tensoactivo de la tabla 1. Estas mediciones se hicieron con una potencia de 70% y una velocidad de 2000 rpm para que la obscuración llegara al 11% aproximadamente, y así obtener resultados confiables. Además, las medidas de tamaño de partícula para el hemosustituto se realizaban después de liofilizar-reconstituir mientras que para las emulsiones directas se medía antes y después de este paso. Las emulsiones de las tablas 2 y 3 se utilizaron con fines distintos al de estudiar el tamaño de partícula.

4.2. Presencia de aceite

Se caracterizaron el aceite mineral, el agua desionizada microfiltrada y las emulsiones preparadas, con espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR). Para esto, se generaron curvas características de cada componente haciendo un barrido de longitud de onda desde 1000nm hasta 2500nm y midiendo la absorbancia obtenida en cada caso.

4.3. Análisis cualitativo de muestras

Con el fin de identificar las emulsiones más adecuadas para caracterizarlas en los equipos previamente mencionados, se realizó un análisis cualitativo de los sistemas expuestos en las tablas 2 y 3. Así, después de liofilizar las muestras, se buscó identificar el encapsulamiento a partir de la observación de compuesto sólido en cada vial. En ese orden de ideas, se observaron las muestras para así definir la cantidad idónea de lecitina y de fase dispersa en las muestras en función de qué tanto líquido y qué tanto sólido se generaba en cada vial.

Cabe resaltar que, en relación al desarrollo de las pruebas a lo largo del proyecto, primero se llevó a cabo todo lo asociado al hemosustituto lo cual incluía su preparación, liofilización, la reconstitución con los tres métodos planteados previamente y su caracterización. Segundo, se modificó el proyecto de manera que se trabajó con las emulsiones directas para comparar el comportamiento que se observara con el producto de interés. Así, se hizo, en primera instancia, una selección de la combinación de surfactantes más indicada para que hubiera similitud con el sustituto, pasando por liofilización y por reconstitución con vortex. En segunda instancia, se planteó la variación de lecitina en la formulación de emulsiones directas y se liofilizó dicho sistema. Finalmente, se generó variación en la concentración de fase dispersa de emulsiones directas y se liofilizó. Además, se realizaron réplicas de todos los experimentos exceptuando lo relacionado al hemosustituto, debido a la disponibilidad del reactivo. Las réplicas se hicieron preparando el doble de emulsiones y liofilizándolas al mismo tiempo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se muestra cada uno de los resultados de la experimentación anteriormente descrita. Así, se plantea todo lo asociado a la caracterización de las muestras donde se evalúa el tamaño de partícula, la presencia de aceite y se analizan cualitativamente las muestras.

En primer lugar, en relación al hemosustituto, se observó que se obtuvo un liofilizado blanco, en forma de tableta, totalmente seco y sin ninguna parte líquida. Ahora bien, después de los tres procesos de reconstitución se midió el tamaño de partícula y se obtuvieron los valores reportados en la tabla 5.

Tabla 5.

Tamaño de gota del hemosustituto reconstituido

Tipo de reconstitución	Dv90 [μm]
Agitación manual	9.381
Vortex 200 rpm	0.203
Vortex 300 rpm	0.199
Ultrasonido 40 kHz	0.194

De esto, es posible afirmar que se consiguió una disminución del tamaño de partícula tanto con el Vortex como con el Ultrasonido. El tamaño de la muestra control es de $9.381\mu\text{m}$, mientras que las muestras que se reconstituyeron por medio de Vortex y Ultrasonido tienen un tamaño de aproximadamente $0.2\mu\text{m}$. De aquí, se presenta la posibilidad de que éste sea un buen protocolo de reconstitución debido a que se logró un tamaño de gota que permite que la solución sea administrada parenteralmente sin generar problemas para la salud. Además, es posible afirmar que no hay diferencia significativa entre utilizar el Vortex a 300 rpm y el ultrasonido ya que la variación entre tamaños de partícula es de, aproximadamente, $0.01\mu\text{m}$. No obstante, los resultados generan un cuestionamiento importante que se aplica sobre la presencia del PFOB en el liofilizado. En efecto, se sabe que al liofilizar el PFOB puro hay una sublimación total de compuesto por lo que se debe considerar si la lecitina de huevo sí está cumpliendo el rol de encapsulamiento o si el compuesto se difunde durante el proceso de liofilización. Se debe considerar que hay evidencia que da cuenta de la eficacia de la lecitina para el encapsulamiento de aceites. De este modo, Moreno et al demostraron que un tipo de aceite, el antimicótico Anfotericina B, fue exitosamente encapsulado y liofilizado en un sistema de agua destilada, Tween

80® y lecitina de soya. Así, generaron un tamaño de gota de $0.048\mu\text{m}$ y se cercioraron de la presencia de su compuesto de interés haciendo pruebas antibióticas sobre ratones enfermos que tuvieron un resultado exitoso [21]. Este estudio permite considerar que hay una gran probabilidad de que exista PFOB encapsulado en el hemosustituto liofilizado reconstituido e indica que el tamaño de gota obtenido después de utilizar el vortex y el ultrasonido es coherente, debido al proceso previo de microfluidización. Si bien esto es un buen indicio sobre la presencia de PFOB en el producto, es necesario verificar de otra manera que éste sí se encuentra en la muestra liofilizada reconstituida.

En ese orden de ideas, se propone la alternativa de realizar el proceso con emulsiones directas y así evaluar la presencia de aceite mineral después de liofilizar y reconstituir el compuesto. Así, en caso de identificar presencia de aceite mineral después de pasar las emulsiones por el mismo proceso que el hemosustituto, entonces es posible comparar dicho compuesto con el PFOB. Con el fin de obtener una emulsión similar al hemosustituto, se realizaron pruebas de formulación de las emulsiones. De esta manera, se generaron variaciones en los surfactantes utilizados como se mostró en la tabla 1.

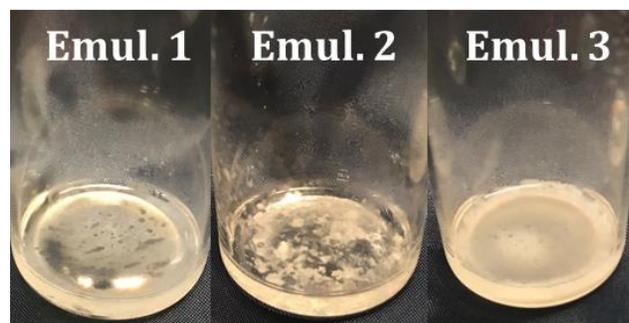
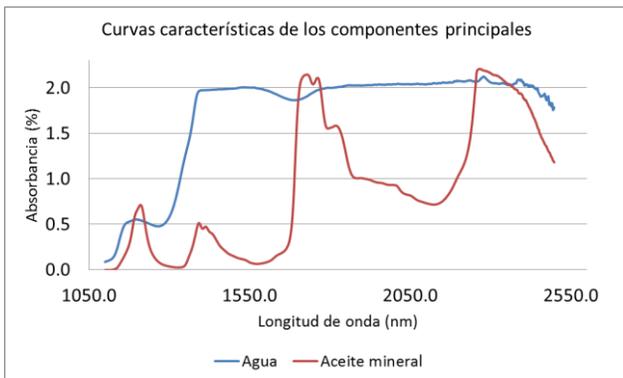


Imagen 1. Resultados de la liofilización de las tres formulaciones con aceite mineral.

En la Imagen 1 se presentan las muestras después de la liofilización, el registro fotográfico permite realizar un análisis cualitativo de las muestras. Así, se observa que ninguna de las emulsiones se secó por completo y que la que presenta mayor encapsulamiento es aquella con lecitina, Tween 20® y Span 80®. Además, se identifica que el aceite mineral no encapsulado se mantuvo líquido y no se sublimó, como lo hace el PFOB, por lo que es evidente que este va a estar presente en el reconstituido. Por lo

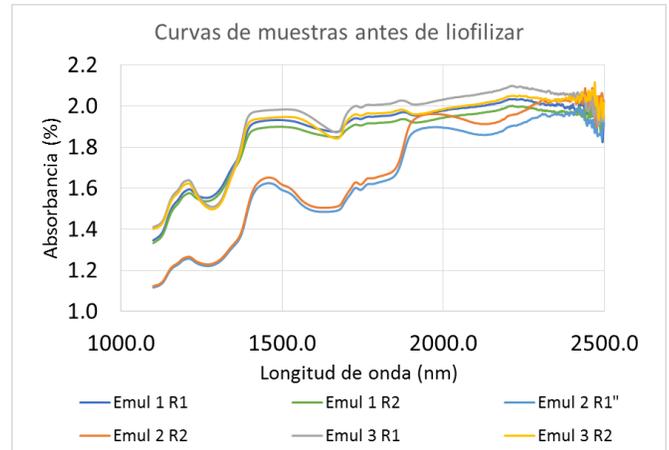
tanto, se determina que la combinación de tensoactivos mencionada previamente es la más indicada para la comparación entre emulsiones directas y el hemosustituto.

Paralelamente, se realizaron pruebas de NIR para corroborar la presencia de aceite mineral en las emulsiones liofilizadas reconstituidas. Así, se hallaron las curvas características de los componentes principales de las emulsiones en el NIR, mostradas en la gráfica 1. Se considera que la curva característica del agua destilada es el aumento que se da entre los 1250 y los 1450nm y que la del aceite mineral es el pico en forma de "M" entre las longitudes de onda 1650 y 1850nm.



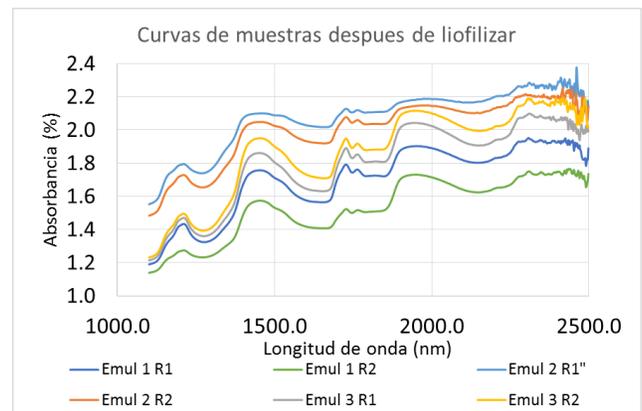
Gráfica 1. Curvas del NIR para los componentes puros

A partir, de estos comportamientos se pueden analizar los resultados en la gráficas 2 y 3, donde se presentan las curvas de las muestras antes y después de liofilizar respectivamente. En la primera, se evidencia el aumento característico del agua en todas las emulsiones y se mantienen en una absorbancia de 2% al igual que la curva del agua pura, a excepción de la emulsión dos, probablemente ya que ésta no posee ningún surfactante, únicamente la lecitina. Asimismo, todas presentan la "M" característica del aceite mineral, los cuales son resultados totalmente esperados debido a que la emulsión no ha sufrido ningún proceso diferente al de su preparación.



Gráfica 2. Curvas del NIR de las muestras antes de liofilizar

Después del proceso de liofilización las curvas varían bastante y aún más en el pico característico del agua. Lo anterior, es posible que se deba a que cierta cantidad de surfactante se haya sublimado durante el proceso de liofilización. Aunque de igual forma todas las curvas presentan los picos característicos a menor absorbancia, lo que permite pensar que el aceite no se sublimó.



Gráfica 3. Curvas del NIR de las muestras después de liofilizar

Posteriormente, se procedió a la caracterización de las emulsiones directas por el tamaño de gota. Así, es posible observar los resultados antes y después de liofilizar, expuestos en la Tabla 6. A partir de éstos, se evidencia que los tamaños de gota de las emulsiones no se mantienen como sí se observó en el hemosustituto. Esto se debe a que el liofilizado no terminó completamente seco y tenía presencia de aceite, por lo que es coherente que haya gotas grandes en la emulsión ya que, al no estar encapsulado, no se va a disminuir el tamaño de gota de éstas con la energía que les proporciona un vortex.

Tabla 6.
Tamaño de gota de emulsiones directas

Muestra / Tamaño	Dv90 [μm]			
	Antes de liofilización		Después de liofilización y reconstitución	
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 1	Réplica 2
Emul. 1	0.204	0.204	18.3	27.3
Emul. 2	0.685	0.681	104	141
Emul. 3	0.199	0.155	3.35	18.4

Siendo así, se procedió de dos maneras distintas. Por un lado, se varió la proporción de lecitina en las emulsiones directas de 3g a 12g. Por otro lado, se varió la proporción de aceite mineral en las emulsiones de 5% a 30% (p/p). Para el primer caso, se obtuvo el registro fotográfico de la imagen 2 mientras que el segundo caso está asociado a la Imagen 3.



Imagen 2. Resultados de la liofilización variando la cantidad de Lecitina de 3g a 12g

En este caso se obtiene un resultado similar a la primera liofilización de la emulsión general. Lo que se observa en la imagen son viales que presentan una parte sólida blanca y una parte líquida transparente que es aceite mineral, según su apariencia. Respecto al registro fotográfico, y a la dosis de aceite encapsulado, según la porción blanca de cada vial, se definió que la mejor cantidad de lecitina a utilizar era de 6g. Esta muestra, caracterizada con el número “6” en la imagen, proporcionó la liofilización con el compuesto más seco, y, por consecuente, con el mejor encapsulamiento de aceite mineral por parte de la lecitina.

Después, fijando la cantidad de lecitina en 6g se generaron los resultados de la imagen 3. De este grupo de emulsiones se observa que las muestras que se encuentran alrededor de 30% (p/p) en fase dispersa, ilustradas con los números “25” y “30”, presentan un mejor encapsulamiento que aquellas que poseen menor contenido de aceite mineral. De igual manera, se puede apreciar que todas las

muestras contienen aceite líquido, no encapsulado. Por lo tanto, al comparar el efecto de la lecitina sobre las emulsiones, respecto al hemosustituto, se debe considerar la posibilidad de que esté ocurriendo el mismo fenómeno de encapsulamiento poco eficaz del PFOB.



Imagen 3. Resultados de la liofilización variando la cantidad de aceite mineral

Es entonces que se considera que las emulsiones con concentraciones menores al 20%, catalogadas con los números “15”, “10” y “5”, presentan una baja protección a las condiciones del proceso de liofilización. En otras palabras, se plantea que las concentraciones de fase dispersa inferiores a 20% (p/p) presentan menor estabilidad que las de concentraciones superiores. Por lo tanto, es de suponer que, durante el tiempo que tarda en darse el proceso de liofilización, 30 horas aproximadamente, las emulsiones de más baja concentración sufren una separación de fases y se genera sublimación de la fase acuosa. La suposición anterior se da debido a que las muestras que están totalmente líquidas presentan un color amarillento característico del Span 80®. Además, a menores concentraciones de fase dispersa en las emulsiones, el color amarillento es más brillante.

IV. CONCLUSIONES

Para concluir, se puede decir que la comparación realizada con emulsiones directas indica que la lecitina no está en capacidad de encapsular aceite mineral en emulsiones sometidas a un proceso de liofilización. Sin embargo, es viable afirmar que la lecitina está cumpliendo con el trabajo de proteger el PFOB durante el proceso de liofilización y que el uso de aceite mineral como sustancia de referencia puede descartarse. Por ende, aún es posible suponer que el hemosustituto sí contiene el compuesto de interés.

En cuanto al protocolo de reconstitución, se considera que este se llevó a cabo satisfactoriamente debido a que se redujo el tamaño de gota considerablemente respecto a la muestra control. Sin embargo, la comparación realizada con emulsiones directas indica que se requiere generar un sistema más afín al hemosustituto que produzca un liofilizado sin residuo de aceite para así poder evaluar el tamaño de partícula y hacer una comparación confiable.

Además, se recomienda realizar una caracterización del PFOB para hacer estudios comparativos con aceites más afines al sistema de interés para tomar como referencia frente a las emulsiones directas. También, se plantea llevar a cabo pruebas de diálisis en animales para corroborar que la presencia de PFOB en el liofilizado reconstituido es suficiente y que lo que se sublima durante el proceso no tiene un impacto significativo sobre el producto final.

V. REFERENCIAS

- [1] Y. Luengas, C. Navarrete y Ó. Álvarez, «Estudio de las propiedades físico-químicas de una solución reconstituida, del liofilizado de una emulsión de PFOB,» Bogotá D.C., 2015.
- [2] W. h. Organization, *The global need for safe blood*, WHO Press, 2006.
- [3] «Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León,» 2012. [En línea]. Available: <http://www.centrodehemoterapiacyl.es/donacion/dudas-faq>. [Último acceso: 29 Abril 2017].
- [4] R. Sarode, «Manual MSD,» MSD, 2017. [En línea]. Available: <http://www.msmanuals.com/es/hogar/trastornos-de-la-sangre/transfusi%C3%B3n-de-sangre/proceso-de-donaci%C3%B3n-de-sangre>. [Último acceso: 29 Abril 2017].
- [5] W. H. Organization, «Towards 100% Voluntary Blood Donation, A global framework for action,» WHO Press, Genova, 2010.
- [6] U. o. Maryland, «University of Maryland, Medical Center,» 2017. [En línea]. Available: <http://www.umm.edu/health/medical/spanishency/articles/choque-hipovolemico>. [Último acceso: 29 Abril 2017].
- [7] B. F. Szuhaj, *Lecithins: sources, manufacture and uses*, The American Oil Chemists Society, 1989.
- [8] J. Campos, «Fisiopatología de la litiasis biliar,» *Acta Médica Colombiana*, vol. 17, n° 3, pp. 161-166, 1992.
- [9] Diana M. Vásquez, Daniel Ortiz, Oscar A. Alvarez, Juan C. Briceño, Pedro Cabrales, «Hemorheological implicatios of perfluorocarbon based oxygen interaction with colloid plasma expanders and blood,» *Biotechnology Progress*, vol. 29, n° 3, pp. 796-807, 2013.
- [1] S. C. Navarrete, «Estudio de la estabilidad de emulsiones de perfluoro-octibromuro (PFOB) sometidas a diferentes condiciones de preparación,» Bogotá, 2014.
- [1] R. E. Klabunde, *Cardiovascular Physiology* 1] Concepts, Baltimore: Wolters Kluwer, 2012.
- [1] Shabbar Abbas, Khizar Hayat, Eric Karangwa, Mahanad Bashari, Xiaoming Zhang, «An Overview of Ultrasound-Assisted Food-Grade Nanoemulsions,» *Springer Science*, pp. 1-6, 2013.
- [1] G.A. Cardoso Ugarte, M.T. Jiménez Munguía, 3] «Nanoemulsoes en alimentos: preparación y aplicaciones,» Puebla, 2015.
- [1] T. N. S. o. P. Lyophilización, «Pharmaceutical 4] Processing,» 6 Octubre 2012. [En línea]. Available: <https://www.pharmpro.com/article/2012/06/new-scope-pharmaceutical-lyophilization>. [Último acceso: 20 Abril 2017].
- [1] G. Liversidge, C. Phillips y K. Cundy, 5] «Method to reduce particle size growth during lyophilization». Estados Unidos de América Patente US5302401A, 1994.
- [1] J. M. B. Arenas, *Fundamentos de reproducción*, Panamericana, 2009.
- [1] Laboratorio de Hemosustitutos - Universidad 7] de los Andes, *Preparación de emulsiones de perfluorocarbono 200mL PRO-PPH-32-02*, Bogotá, 2015.

- [1 CRODA, *Span and Tween*, 2009.
8]
- [1 Laboratorio de Hemosustitutos - Universidad
9] de los Andes/Fundación Cardioinfantil,
*Proceso de Liofilización de la Emulsión de
PFOB PRO-PPH-33-00*, Bogotá D.C., 2015.
- [2 Malvern Instruments Ltd., «Mastersizer 3000:
0] Smarter particle sizing,» 2017. [En línea].
Available:
<http://www.malvern.com/en/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000/>.
- [2 Marco Antonio Moreno, Paloma Frutos, Maria
1] Palona Ballesteros, «Lyophilized Lecithin
Based Oil-Water microemulsions as a new and
low toxic delivery system for amphotericin B,»
Pharmaceutical Research, vol. 18, n° 3, pp.
344-351, 2001.