



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Dirección de Postgrado
Maestría en Biotecnología Industrial

Interfaz tecnológica – Regulatoria: Desarrollo de un medicamento de origen biológico para el tratamiento de úlceras crónicas con elevado volumen de exudado

CYNTHIA ADRIANA ZACARÍAS CHAMORRO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY
Abril – 2020



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Dirección de Postgrado
Maestría en Biotecnología Industrial

Interfaz tecnológica – Regulatoria: Desarrollo de un medicamento de origen biológico para el tratamiento de úlceras crónicas con elevado volumen de exudado

CYNTHIA ADRIANA ZACARÍAS CHAMORRO

Orientador: **Dra. María Eugenia Sesto Cabral**
Co Orientador: **Dra. Sonia Lorena Fretes de Aquino**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial

SAN LORENZO – PARAGUAY
Abril – 2020

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)
DE LA BIBLIOTECA DE LA FACEN – UNA

Interfaz tecnológica – Regulatoria: Desarrollo de un medicamento de origen biológico para el tratamiento de úlceras crónicas con elevado volumen de exudado

QCA. FCA. CYNTHIA ADRIANA ZACARÍAS CHAMORRO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Biotecnología Industrial.

Fecha de aprobación: de de 2020.

MESA EXAMINADORA

MIEMBROS:

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Universidad Autónoma de Barcelona, España

Prof. Dra. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Universidad Nacional de la Pampa, Argentina

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. Dr. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

Prof. MSc. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha ... de de 2020.

Prof. MSc. Andrea Weiler
Director de Postgrado, FACEN – UNA

A mis padres, Julia Chamorro y Pedro Zacarías por la confianza y apoyo constante en esta larga travesía por cumplir mis sueños.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT por realizar la financiación de la Maestría en Biotecnología Industrial y por permitirme acceder al Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos PVCT19-167 – PROCIENCIA, al cual fui adjudicada y por medio de la misma pude realizar el desarrollo de mi tesis.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción FACEN – UNA por desarrollar la Maestría en Biotecnología Industrial.

A mi Orientadora la Dra. Eugenia Sesto, por su vocación de servicio y predisposición, por ser mi apoyo, mi guía y motivación con tanta humildad a lo largo de este camino.

A mi Co Orientadora Dra. Sonia Fretes, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción FCQ - UNA, por el constante asesoramiento y predisposición.

Al gran equipo humano y profesional del Laboratorio de Estudios Farmacéuticos y Biotecnología Farmacéutica del Instituto de Biotecnología Farmacéutica y Alimentaria LEF y BiFa – INBIOFAL de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán – Argentina. Exequiel, Julieta, Lilian, Nicolás y Romina por tanta hospitalidad, gratos recuerdos, por todos los conocimientos compartidos y la posibilidad de estrechar vínculos.

A la Lic. Julieta Moreno, por su amistad, paciencia, empeño y dedicación en pos del logro de los objetivos propuestos en tantas horas de trabajo y por hacerme sentir como en casa, a pesar de la distancia durante del desarrollo de la estancia en Tucumán.

A la Dirección Nacional de Vigilancia Sanitaria del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, por la oportunidad de poder cursar la Maestría en Biotecnología Industrial.

Interfaz tecnológica – Regulatoria: Desarrollo de un medicamento de origen biológico para el tratamiento de úlceras crónicas con elevado volumen de exudado

Autor: QCA. FCA. CYNTHIA ADRIANA ZACARÍAS CHAMORRO

Orientador: DRA. MARÍA EUGENIA SESTO CABRAL

Co Orientador: DRA. SONIA LORENA FRETES DE AQUINO

RESUMEN

Una herida crónica cuando la cicatrización se detiene en el estadio inflamatorio. La infección y la presencia de exudado contribuyen al retraso en la cicatrización. La infección se produce por bacterias formadoras de biofilm, estrategia que les confiere resistencia a antibióticos, desinfectantes y a la respuesta inmune.

La ausencia de tratamientos específicos y accesibles en el sistema público de salud lleva a la aplicación de tratamientos paliativos, que impiden al paciente permanecer ambulante. La úlcera representa disminución de calidad de vida. Por tratarse de una enfermedad crónica recidivante, con alto requerimiento de recursos, representa una problemática en salud pública.

El uso de sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (LAPS) como tratamiento alternativo está avalado por reportes científicos publicados desde 2012. Posee metabolitos con actividad antipatogénica y procicatrizante que actúan de manera sinérgica, lo que convierte a esta mezcla compleja en un único Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA).

El desafío consistió en desarrollar un medicamento que vehiculice LAPS, conserven su actividad y permitan el manejo de diferentes volúmenes de exudado, para ofrecer un tratamiento personalizado.

Se diseñó una forma farmacéutica para manejar elevados volúmenes de exudado. Los métodos de producción se realizaron acorde a la normativa vigente, a

escala laboratorio. Todos se diseñaron bajo principios de (P+L) y Química Verde, para contribuir en el aporte de productos amigables con el ambiente.

La biomasa residual producida durante la obtención del IFA, se reutilizó para elaborar productos de alto valor agregado, con la posibilidad de su reingreso completo en la línea de producción.

El diseño de STT se hizo bajo la premisa de P+L. Se obtuvieron productos capaces de retener volúmenes elevados de fluidos en función de su composición y de liberar progresivamente el IFA.

La investigación aporta al desarrollo de un producto que ofrece tratamiento integral. Así, se consiguieron matrices estables, de uso tópico y que permiten vehicular activos de origen biológico y/o de baja acidez orgánica.

Palabras Claves: IFA, Medicamentos de uso tópico, Producción más Limpia, STT.

Technological interface - regulatory: Development of a drug of biological origin for the treatment of chronic ulcers with high volume of exudate

Author: QCA. FCA. CYNTHIA ADRIANA ZACARÍAS CHAMORRO

Advisor: DRA. MARÍA EUGENIA SESTO CABRAL

Co Advisor: DRA. SONIA LORENA FRETES DE AQUINO

SUMMARY

A wound is chronic when healing stops in the inflammatory stage. Infection and the presence of exudate infection to delay healing. The infection is caused by biofilm-forming bacteria, a strategy that gives them resistance to antibiotics, disinfectants and the immune response.

The absence of specific and accessible treatments in the public health system leads to the application of palliative treatments, which prevent the patient from staying traveling. The ulcer represents decreased quality of life. As it is a relapsing chronic disease, with a high resource requirement, representing a public health problem.

The use of the *Lactobacillus plantarum* (LAPS) supernatant as an alternative treatment is available through scientific reports published since 2012. It has metabolites with antipathogenic and pro-healing activity that act synergistically, which makes this complex mixture a unique ingredient. Active Pharmaceutical Ingredient (IFA)

The challenge is to develop a drug that laps LAP, retain its activity and the management of different volumes of exudate, to offer a personalized treatment.

A pharmaceutical form was designed to handle exudate volumes. The production methods are in accordance with current regulations, a laboratory of scale. All were designed under the principles of (P + L) and Green Chemistry, to contribute to the contribution of environmentally friendly products.

The residual biomass produced during the obtaining of the IFA, was reused to produce products with high added value, with the possibility of its complete re-entry into the production line.

The STT design was done under the premise of P + L. Products were obtained with the capacity to retain fluid volumes based on their composition and progressively release the IFA.

The research contributes to the development of a product that offers comprehensive treatment. Thus, stable matrices were obtained, of topical use and that allowed to vehicularize assets of biological origin and / or of low organic acidity.

Keywords: IFA, Topical medications, Cleaner Production, STT.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Planteamiento del problema.....	4
1.2.	Pregunta de investigación.....	4
1.3.	Justificación.....	5
1.4.	Objetivos.....	6
1.4.1	Objetivo General.....	6
1.4.2	Objetivos Específicos.....	6
1.5.	Hipótesis.....	7
2.	MARCO TEÓRICO.....	8
2.1.	Antecedentes.....	8
2.2.	La Piel.....	9
2.3.	Heridas crónicas – úlceras.....	10
2.4.	Infección.....	10
2.5.	Tratamiento.....	12
3.	METODOLOGÍA.....	19
3.1.	Producción del ingrediente activo farmacéutico e implementación de metodologías de producción más limpia.....	19
3.2.	Desarrollo de un medicamento biológico de uso tópico para elevado volumen de exudado.....	26
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1.	Producción del ingrediente activo farmacéutico e implementación de metodologías de producción más limpia.....	33
4.2.	Elaboración de un medicamento biológico de uso tópico para elevado volumen de exudado.....	44
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
5.1.	Conclusiones.....	59
5.2.	Recomendaciones.....	61

6.	BIBLIOGRAFÍA.....	67
----	-------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de obtención de los sobrenadantes (LAPS), el procedimiento de recuperación y reutilización de residuos de biomasa involucrado hasta la producción de la forma farmacéutica final.	34
Figura 2. Curva de crecimiento normal de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 cultivado durante 12 horas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) incubado a 37°C.....	38
Figura 3. Curva de crecimiento normal de <i>S. aureus</i> ATCC 25933 cultivado durante 12 horas en medio de cultivo Brain Heart Infussion (BHI) incubado a 37 °C.....	38
Figura 4. Inhibición de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.....	39
Figura 5. Inhibición de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 25933 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.	40
Figura 6. Inhibición de formación de biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.....	41
Figura 7 Inhibición de formación de biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 25933 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.	42
Figura 8. Disrupción de biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.....	43
Figura 9. Disrupción de biofilm de <i>S. aureus</i> ATCC 25933 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.	44
Figura 10 Estudios de capacidad de hinchamiento	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Características de heridas crónicas versus agudas.....	10
Tabla 2: Componentes de LAPS y su efecto sobre las UCMI.....	16
Tabla 3: Composición cuali-cuantitativa del Medio MRS.....	20
Tabla 4: Composición cuali-cuantitativa del Medio SCM1.....	20
Tabla 5: Composición cuali-cuantitativa del Medio MRST.....	21
Tabla 6: Composición cuali-cuantitativa del Medio MRSTC.....	21
Tabla 7: Parámetros de calidad verificados en el IFA producido.....	23
Tabla 8: Composición cuali-cuantitativa de STT 1 – Blanco ₁	30
Tabla 9: Composición cuali-cuantitativa de STT 2 – Blanco ₂	30
Tabla 10: Composición cuali-cuantitativa de STT 3 - LAPS ₀	30
Tabla 11: Composición cuali-cuantitativa de STT 4 - LAPS _A	31
Tabla 12: Composición cuali-cuantitativa de STT 5 - LAPS _B	31
Tabla 13: Composición cuali-cuantitativa de STT 6 - LAPS _C	31
Tabla 14: Composición cuali-cuantitativa de STT 7 - Gentamicina.....	32
Tabla 15: Resultados de los controles de calidad realizados a todos los LAPS durante el proceso de producción.....	36
Tabla 16: Listado de polímeros y solventes considerados en el estudio de pre-formulación, nombres de fantasía y fabricante o proveedor.....	46
Tabla 17: Resultados de características organolépticas de los STT.....	54
Tabla 18: Concentración de LAPS _A liberado desde la matriz portadora en función del tiempo en hora.....	57

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica
ATCC	American Type Culture Collection
A/C	Ausencia de crecimiento
BAL	Bacterias ácido lácticas
Bco1	Blanco 1
Bco2	Blanco 1
BcoG	Blanco con Gentamicina
BHI	Medio Brain Heart Infusion
CBR	Células bacterianas residuales
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
Csp.	Cantidad suficiente para
DNVS	Dirección Nacional de Vigilancia Sanitaria
DO	Densidad óptica
FACEN	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
g	Gramos
IFA	Ingrediente Activo Farmacéutico
IFNA	Ingrediente Farmacéutico No Activo
INBIOFAL	Instituto de Biotecnología Farmacéutica y Alimentaria
LAPS	Sobrenadante de cultivo de <i>Lactobacillus plantarum</i> .
LAPSo	Sobrenadante del medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe
LAPSa	Sobrenadante del medio de cultivo Sesto, Cabrera, Moreno 1
LAPsb	Sobrenadante del medio de cultivo MRST
LAPSc	Sobrenadante del medio de cultivo MRSTC
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LEFyBiFa	Laboratorio de Estudios Farmacéuticos y Biotecnología Farmacéutica
LEL	Medio leche extracto levadura
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Min.	Minuto
mL	Mililitro
MRS	Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe
MRSA	Meticilino Resistente
MRST	Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe con Tween 80
MRSTC	Medio de cultivo de Man, Rogosa y Sharpe con Tween 80 y cationes calcio y magnesio
m/v	masa/volumen
O	Opaco
pH	potencial hidrógeno
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P+L	Producción más Limpia
PCC	Puntos Críticos de Control
POE	Procedimiento operativo estándar
PVL	Panton Valentine

rpm	Revoluciones por minuto
SCM₁	Medio de cultivo Sesto, Cabrera, Moreno 1
STT	Sistemas de administración transdérmica de fármacos
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T	Translucido
UC	Ulceras crónicas
UCMI	Ulceras crónicas de miembro inferiores
UNA	Universidad Nacional de Asunción
UNT	Universidad Nacional de Tucumán
μL	Microlitro
ug	Microgramos
°C	Grados Celsius

1. INTRODUCCIÓN

Los Productos Biológicos son medicamentos obtenidos a partir de una variedad de fuentes naturales, de origen humano, animal o de microorganismos. Al igual que otros medicamentos, son utilizados para el tratamiento de enfermedades y condiciones médicas, así como la prevención y el diagnóstico de enfermedades (**WHO, 1995**).

En el desarrollo de los productos biológicos, la fase inicial comienza con la investigación del agente causal de la enfermedad, **Ibarz. M, 2017**. La siguiente etapa involucra el desarrollo del proceso productivo, para poder obtener posteriormente el producto a gran escala, **Salleras, 2002**. En ambos casos, tanto para la producción del ingrediente farmacéutico activo (IFA) y del producto final se debe garantizar que todos los materiales de partida cumplan con las especificaciones de calidad correspondientes, el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura en las diferentes etapas de producción, el establecimiento de los puntos críticos de control de calidad (PCC). **WHO, 1995**

Se debe tener presente en todo momento que, en el caso de los medicamentos de origen biológico, la calidad no puede determinarse exclusivamente en el producto final y debe ser, evaluada en cada una de las etapas de producción. Por lo tanto, es fundamental en la etapa de desarrollo, identificar las características fisicoquímicas, biológicas y microbiológicas del producto biológico, que pueden tener impacto en su calidad, a los fines de establecer los controles respectivos, **ICH, 2009**.

Actualmente, las lesiones en la piel siguen siendo un gran problema de salud pública en términos de morbilidad y discapacidad a largo plazo en todo el mundo. La agresión a la piel, afecta su función de barrera normal, permitiendo de este modo la colonización microbiana, lo que constituye una fuente de infección que afecta al sistema inmunológico. **Troche, 2017**.

Por ello, la prescripción médica constituye un acto crítico para la salud de los pacientes, **Cabeza, 2003**. La prescripción y consumo de antibióticos son un factor

importante en la curación y control de las infecciones. La incidencia de infecciones en la piel es mayor en relación a otras lesiones traumáticas, debido a la pérdida de la barrera cutánea que constituye la primera defensa del organismo. La incorrecta utilización de los antibióticos puede ocasionar la resistencia microbiana y disminución de la eficacia terapéutica. **Demirdjian, 2010, Mediavilla A, et al.,1997.**

Los trabajos publicados previamente demostraron que el sobrenadante de cultivo de *Lactobacillus plantarum* (LAPS) inhibe *in vitro* la adhesión, crecimiento, señales de quorum sensing, biofilm y factores de virulencia de *P. aeruginosa* (**Ramos, et al., 2010**). También se comprobó que LAPS inhibe, crecimiento, formación de biofilm y disrumpe biofilm preformado de: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* y *S. marcesens*. Estas cepas están presentes en el 80% de los aislamientos clínicos de úlceras crónicas en la provincia de Tucumán, Argentina. (**Lindon, et al., 2016**). Del mismo modo en Paraguay, las infecciones bacterianas más frecuentes que fueron aisladas, son de bacterias Gram (-) como *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes y dentro de los gram positivos, *S. aureus*. **Balmelli et al., 2018.**

Además, se demostró que LAPS no es citotóxico, ni induce apoptosis o necrosis (*in vivo* y *ex vivo*). Tampoco desencadena respuesta inflamatoria localizada o generalizada *in vivo*, comparado con antisépticos utilizados en el tratamiento de estas infecciones (**Ramos, et al., 2010**). El tratamiento propuesto, reduce la carga bacteriana patógena y la cantidad de tejido necrótico, promueve el desbridamiento, la aparición de tejido de granulación y la cicatrización de manera directa e indirecta (**Ramos, et al., 2015**). LAPS incrementa la producción de TGF- β , IL-8, IL-8R y las células endoteliales y sus precursoras en el lecho de heridas crónicas (neovascularización) (**Peral, et al., 2010; Ramos, et al., 2012a; Ramos, et al., 2012b**).

A partir de un profundo análisis de las propiedades biológicas y químicas de LAPS, se determinó su composición completa de metabolitos y enzimas. Basados en las propiedades ya demostradas para estos componentes, se hipotetizó un mecanismo de acción en heridas crónicas. Los metabolitos responsables de las propiedades

antipatogénicas y pro-cicatrizantes de LAPS, actúan de manera sinérgica, lo que posiciona a esta mezcla compleja, como un único IFA de origen biológico. (**Ramos, et al., 2015**).

Dadas las propiedades pro-cicatrizantes directas e indirectas y la seguridad en el uso demostrada previamente, se diseñaron formas farmacéuticas para facilitar la administración en humanos. (**Sesto Cabral, et al., 2015a; Cabrera, et al., 2016**). Todo ello avala el uso de LAPS como IFA en el diseño de medicamentos tópicos dirigidos al tratamiento de úlceras crónicas de elevado volumen de exudado. En este caso específicamente, el interés radica en vehiculizar un principio activo de origen biológico en un sistema de administración transdérmica (STT) de liberación controlada y de esta forma obtener un producto final, es decir un medicamento que reúna las características fundamentales de seguridad, calidad y eficacia. Y de este modo mejorar la calidad de vida de los pacientes que padecen de úlceras, ya que la presencia de elevados volúmenes de exudado contribuye al retraso en la cicatrización, los estadios inflamatorios, así como también un sitio favorable para adquirir infecciones.

1.1. Planteamiento del problema.

Una herida crónica, cuando la cicatrización se detiene en el estadio inflamatorio. Sumado a la patología de fondo, la infección y la presencia de exudado contribuyen ampliamente al retraso en el proceso de la cicatrización.

La infección se produce por bacterias formadoras de biofilm, estrategia que les confiere resistencia al tratamiento con antibióticos, desinfectantes y a la respuesta inmune, siendo las bacterias más frecuentemente aisladas la *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Los exudados poseen abundantes metaloproteinasas de matriz y citoquinas pro-inflamatorias citotóxicas que inhiben la proliferación.

La ausencia de tratamientos específicos y accesibles en el sistema de salud pública del país y la región, lleva a la aplicación de tratamientos paliativos, que impiden al paciente permanecer ambulante durante su tratamiento. Debido a que la úlcera representa notablemente la disminución de calidad de vida del paciente que la padece, principalmente por tratarse de una enfermedad crónica recidivante, con alto requerimiento de recursos, lo cual representa una problemática en salud pública.

Por ello radica el interés y el desafío de diseñar un sistema de administración transdérmica de liberación controlada a partir del sobrenadante de *Lactobacillus plantarum*, para el tratamiento de pacientes con úlceras crónicas con elevado volumen de exudado.

1.2. Pregunta de investigación.

¿Las formas farmacéuticas diseñadas son capaces de controlar elevados volúmenes de exudados in vitro?

1.3. Justificación

El uso de sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (LAPS) como tratamiento alternativo de pacientes que padecen de úlceras crónicas con elevado volumen de exudado está avalado por reportes científicos publicados desde el año 2012 y actualmente se halla protegida por una solicitud de patente nacional argentina INPI N°: P20130104098.

El sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (LAPS) posee metabolitos con actividad anti-patogénica y pro-cicatrizante que actúan de manera sinérgica, lo que convierte a esta mezcla compleja en un único Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA).

Por ello, toda la investigación posee un enfoque biotecnológico-farmacéutico y aportará el desarrollo de un medicamento biológico, específicamente un sistema de administración transdérmica de liberación controlada que reúna las características de calidad, seguridad y eficacia que ofrece un tratamiento integral, de concepción y elaboración regional. Dirigido al paciente que padece de úlceras, desarrollado con métodos de producción acorde a la normativa vigente, a escala laboratorio y la formulación se diseñará bajo principios de Producción más Limpia (P+L) y Química Verde, para contribuir en el aporte de productos amigables con el ambiente de nuestra región.

De este modo, se aportará al sistema de salud un tratamiento más accesible, específico, permitiendo que el paciente permanezca ambulante durante su tratamiento y así, mejorar su calidad de vida.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Desarrollar formulaciones de uso tópico en forma de sistemas de administración transdérmica de liberación controlada, vehiculizando el sobrenadante del *Lactobacillus plantarum* como Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) para el tratamiento de úlceras crónicas con elevado volumen de exudado.

1.4.2. Objetivos Específicos

- a) Realizar la producción de LAPS a escala laboratorio en tres medios de cultivo alternativos diseñados al medio comercial.
- b) Obtener IFAs de características homogéneas.
- c) Realizar estudios de control de calidad: fisicoquímicos, microbiológicos y de actividad antimicrobiana del IFA obtenido.
- d) Realizar estudios de pre-formulación y formulación del sistema de administración transdérmica de liberación controlada desarrollado.
- e) Realizar estudios de control de calidad in-vitro del producto terminado e intermedios.
- f) Aplicar principios de producción más limpia y química verde en todo el proceso productivo.

1.5. Hipótesis

1.5.1 Hipótesis nula:

Las formas farmacéuticas diseñadas no son capaces de controlar elevados volúmenes de exudados in vitro, cumpliendo con las premisas de eficacia, estabilidad, seguridad, bajo costo y conservación de todas las actividades previamente reportadas para LAPS.

1.5.2 Hipótesis alternativa:

Las formas farmacéuticas diseñadas son capaces de controlar elevados volúmenes de exudados in vitro, cumpliendo con las premisas de eficacia, estabilidad, seguridad, bajo costo y conservación de todas las actividades previamente reportadas para LAPS.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Las Farmacopeas reconocen varias formas farmacéuticas destinadas al control temporal de la liberación: liberación prolongada, liberación retardada y liberación pulsátil (**Real Farmacopea Española 3ª edición 2005; Farmacopea Europea 6ª edición, 2008; USP 32, 2009**). Se añaden las formulaciones de liberación sitio-específicas y las nuevas formas de disgregación rápida. Los excipientes juegan un papel clave, ya que el control de la liberación está regulado por los materiales que forman el sistema (**Sánchez, 2010**). Los sistemas de administración transdérmica de fármacos (STT) están diseñados para lograr un efecto terapéutico prolongado a dosis única, mediante la liberación continua del medicamento en un determinado periodo de tiempo (**Pillai, 2011; Pillai, 2011 b**).

Los STT presentan ventajas productivas como simplicidad en el proceso de fabricación, transporte y conservación. Estas características suman ventajas por tratarse de productos que no necesitan condiciones especiales de transporte y conservación, resultando en una opción económica y con gran aceptación en el ámbito tecnológico farmacéutico (**Janßen, et al 2013, Morales et al, 2011**).

Los Ingredientes Farmacéuticos No Activos (IFNA) utilizados en la producción de este tipo de matrices incluyen polímeros formadores de película, polímeros formadores de la matriz hidrofílica, potenciadores de permeación y un sistema de solventes. Un mismo polímero puede funcionar como formador de película y/o matriz y como regulador de la velocidad de liberación (**Kusum et al, 2003, Mutalik, 2004**). El manejo de la composición polimérica permite manipular las características clave de los films, como la tasa de liberación, las propiedades muco-adhesivas y la resistencia mecánica, etc (**Karki, 2016**).

En contraste con los parches, los films producen menos irritación debido a que permiten el intercambio de gases y vapor de agua y no dejan sensación pegajosa en el sitio de aplicación (**Guo et al 2011, Trivedi et al 2017**). Por su naturaleza

hidrófila, poseen propiedades muco-adhesivas. En contacto con la superficie biológica, los films se hinchan y forman enlaces con la mucina (**Morales, et al 2011, Karki, et al 2016**).

En consonancia con la filosofía de producción más limpia y los procesos 4R, implementamos rudimentos de Química verde en el diseño de los prototipos de STT que se presentan en este trabajo, entendiendo a la Química verde como: “la utilización eficiente de materias primas (preferiblemente renovables), incluyendo los recursos energéticos, en la fabricación y empleo de productos químicos” y “el reemplazo de disolventes y reactivos tóxicos o peligrosos en la fabricación y empleo de productos químicos” (**Sheldon, 2000 , Sheldon, 2017**).

2.2. La Piel.

La piel es un tejido de estructura compleja y altamente diferenciado. Se encuentra en un estado continuo de regeneración y reparación (**Schaefer, et al., 2008**). Posee funciones muy importantes, como: protección, termorregulación, absorción de las radiaciones ultravioleta, producción de vitamina D, protección contra los microorganismos patógenos, defensa inmunológica y detección de estímulos sensoriales (**Brain, et al., 2002**).

La importancia de la función protectora y homeostática de la piel radica en su propiedad de barrera (**Brain, et al., 2002**). La piel y las mucosas son la primera línea de defensa del huésped frente a los microorganismos. La biota normal y las glándulas sebáceas liberan ácidos grasos y ácido láctico que disminuyen el pH de la piel y actúan como antibacterianos (**Madigan, et al., 2004**).

Por ello la ruptura de la piel representa una puerta de entrada a microorganismos y cuerpos extraños. Esta pérdida de integridad del tejido se conoce como “herida”. Inmediatamente después de que se produce el daño, se inicia la reparación tisular. Este evento se denomina “proceso de cicatrización” (**Singer & Clark, 1999; Delavary, et al., 2011**).

2.3. Heridas crónicas – úlceras.

Una herida se produce como consecuencia de un daño físico o químico. Se clasifican en heridas agudas y crónicas. Las heridas agudas son lesiones en la piel que se resuelven de manera predecible (**Kamoun, et al., 2017; Dhivya, et al., 2015**). Las heridas crónicas, también denominadas úlceras crónicas (UC), se definen como lesiones que no progresan a través de las etapas normales de la cicatrización o que no presentan ningún signo de mejoría en un plazo de 4 a 6 semanas. Las UC se caracterizan por permanecer detenidas en la fase inflamatoria de la cicatrización (**To, et al., 2016; Järbrink, et al., 2016; Agale, 2013; Frykberg & Banks, 2015; Rhoads, et al., 2012**). A pesar de sus diferencias etiológicas, las UC poseen características en común a nivel molecular (**Tabla 1**) (**Frykberg & Banks, 2015**). En la **Tabla 1** se resumen las diferencias entre las heridas agudas y crónicas.

Tabla 1: Características de heridas crónicas versus agudas (**Morton & Phillips, 2016**).

Heridas agudas	Heridas crónicas
-Bajos niveles de bacterias.	-Altos niveles de bacterias.
-Bajo porcentaje de citoquinas proinflamatorias.	-Alto porcentaje de citoquinas proinflamatorias.
-Bajos niveles de proteasas y ROS.	-Altos niveles de proteasas y ROS.
-Matriz intacta, funcional.	-Matriz degradada, no funcional.
-Alta actividad mitogénica.	-Baja actividad mitogénica.
-Células mitóticamente competentes	-Células senescentes.

2.4. Infección.

Es producida por bacterias aeróbicas y anaeróbicas provenientes de la microflora de la piel circundante o por bacterias ambientales oportunistas (**Mihai, et al., 2014**). Existe un espectro de estadios infecciosos, desde la contaminación (donde las bacterias no se multiplican ni causan infección clínica) hasta estadios más severos, por ejemplo, en infecciones sistémicas. Se considera que la úlcera está infectada cuando el número supera el orden de los 10⁵ microorganismos por gramo de tejido (**Morton & Phillips, 2016**).

Todas las infecciones en heridas son polimicrobianas. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) representan las bacterias

comúnmente aisladas desde las úlceras crónicas de miembro inferiores (UCMI) (Gjødsbøl, et al., 2006; Fazli, et al., 2009; Malic, et al., 2009; Serra, et al., 2015). *S. aureus* se encuentra en las capas superiores de la herida, mientras que *P. aeruginosa* se localiza en las regiones más profundas del lecho (Serra, et al., 2015). El microbioma puede incluir hongos y levaduras (Kalan, et al., 2016). Las interacciones entre distintas especies de bacterias son cruciales en la fisiopatogenia, ya que su acción sinérgica les permite ejercer un efecto patógeno mayor. Tanto *S. aureus* como *P. aeruginosa* son capaces de modular su virulencia para mejorar su supervivencia y persistencia en entornos hostiles (Holban, et al., 2013; Kolar, et al., 2013; Mihai, et al., 2015). Se reportó que la patogénesis de comunidades de *S. aureus* Meticilino Resistente (MRSA) están relacionadas con su capacidad de producir la toxina leucocidina de Pantón Valentine (PVL) que lisa a los leucocitos. Además, la elastasa producida por *P. aeruginosa* deteriora la inmunoglobulina G y el sistema del complemento, aumentando la cronicidad de la herida (Serra, et al., 2015). Sumado a esto, las condiciones del lecho ulceroso son propicias para la formación de biofilm bacteriano.

2.4.1. Biofilms.

Los expertos reportan que los biofilms existen en todas las heridas crónicas (Percival, et al., 2014; Bjarnsholt, et al., 2008; Frykberg & Banks, 2015). El biofilm produce infecciones de tipo crónico, que no responden a los tratamientos antibióticos y no pueden prevenirse mediante inmunización. Algunas de estas enfermedades son la fibrosis quística, otitis, osteomielitis, etc. (Kalan, et al., 2016).

Un biofilm es una comunidad mono o polimicrobiana, que está embebida en una matriz extracelular, compuesta de polisacáridos, proteínas, ADN, ARN y lípidos, producidos por ellos mismos u obtenidos del huésped (Flemming & Wingender, 2010; Mihai, et al., 2015; To, et al., 2016). Varios autores sostienen que los biofilms polimicrobianos son más patógenos que los monoespecie (Bjarnsholt, et al., 2008; Mihai, et al., 2015; Kalan, et al., 2016; Serra, et al., 2015; Percival, et al., 2015). Kalan y colaboradores encontraron heridas colonizadas por hongos, en las que algunas levaduras son capaces de formar biofilms con bacterias (Kalan, et al.,

2016). Por ello la matriz del biofilm protege a los microorganismos de la acción de los antimicrobianos (tanto tópicos como sistémicos) y de los mecanismos de defensa inmunológica (representa una estructura demasiado grande para ser fagocitada).

2.4.2. Secuelas sociales y disminución de la calidad de vida en los pacientes con UCMI.

Una UCMI representa una complicación para el paciente en términos de calidad de vida y de su estado de salud (**Green, et al., 2014; Alexander, 2013**). El dolor persistente, ya sea espontáneo o inducido por el tratamiento, el mal olor, el prurito de la herida, las restricciones de movilidad y el exudado excesivo pueden provocar cambios de humor, como estrés, ansiedad, falta de autoestima, preocupación por los síntomas físicos y trastornos depresivos (**Upton, et al., 2012; Guo & Di Pietro, 2010; Mihai, et al., 2015**). El mal olor es uno de los aspectos más angustiosos. Produce malestar psicológico y aumenta el aislamiento social. El olor fétido se atribuye a una combinación de factores, como el tejido necrótico y la infección. Tanto las bacterias anaeróbicas como las aeróbicas contribuyen a la producción de olor (**Akhmetova, et al., 2016**). Dada su cronicidad y posibilidad de recidiva en mayor o menor período de tiempo, estas lesiones generan repercusiones psicosociales a los pacientes. Provocan cambios en el estilo de vida, abandono de la convivencia familiar, alteración de la autoimagen y representan una limitación para el ejercicio de actividades diarias (**Oliveira, et al., 2013**).

4.5. Tratamiento.

Dada la complejidad de la lesión y sus consecuencias en la salud del paciente, la atención integral se vuelve esencial. Los cuidados deben ser adecuados y específicos para cada lesión, conducido por un profesional con conocimiento técnico y científico capacitado para acompañar el proceso de cicatrización (**Oliveira, et al., 2013**). El acrónimo TIME se utilizó durante la última década para facilitar el enfoque del tratamiento de UCMI (**Leaper, et al., 2012; Ligresti & Bo, 2007; Schultz, et al., 2005**). Este acrónimo hace referencia a la evaluación y manejo de tejidos (Tissue), manejo de la inflamación/infección (Infection/Inflammation), control

de la humedad (Moisture) y observación y manejo del centro de la herida (Edge). Los principios de TIME incorporan los requerimientos básicos del cuidado de heridas (Frykberg & Banks, 2015). En conjunto, las acciones preventivas y el monitoreo multidisciplinar de la úlcera son fundamentales. En este punto se debe incluir la educación del paciente y de la familia. Ellos tienen que reconocer los potenciales problemas de pie y que acciones seguir (Schaper, et al., 2003). Se debe hacer hincapié en la importancia del descanso, del calzado, del vendaje regular y de las observaciones frecuentes de los signos de infección (Edmonds, 2006). Con la ayuda de la terapia tópica se alcanzan las condiciones ideales para la cicatrización (Da Silva, et al., 2014). El tratamiento tópico no involucra sólo la limpieza y aplicación del producto apropiado. Este debe ser un proceso sistematizado, que abarque la evaluación de la herida respecto a: estado de cicatrización, características del tejido y exudado (dos Santos, et al., 2010). Un producto ideal debe tener las siguientes características: mantener un nivel de humedad óptimo en la lesión y sus bordes, poseer buena transmisión de gases, remover el exceso de exudados (sin saturar otras zonas), proteger a la herida de microorganismos, infecciones o contaminaciones, impedir su desecación y reducir la necrosis superficial. Además, debe estimular la producción de factores de crecimiento, proveer protección mecánica, ser fácil y comfortable de remover y cambiar, no producir alergia, ni intoxicación, ser biocompatible, biodegradable y elástica, reducir el dolor, y ser de costo aceptable (Kokabi, et al., 2007; Kamoun, et al., 2017). En las UC infectadas, el tratamiento involucra el uso de diversos antimicrobianos. Los antibióticos tópicos también son importantes, pero el desarrollo de resistencia hace que su uso se vuelva limitado. El mayor desafío lo constituyen las comunidades polimicrobianas y la presencia de cepas resistentes (Serra, et al., 2015). Los productos para el manejo de las UC son variados, pero en general, de elevado costo. La curación en el ámbito de la salud pública a nivel local involucra limpieza diaria y antibioticoterapia oral. Es conocido que los usos prolongados y excesivos de antibióticos sistémicos conducen a efectos adversos indeseables (por ejemplo, colitis por *Clostridium difficile*) y promueven la aparición de bacterias resistentes (To, et al., 2016). Otra práctica muy utilizada es el desbridamiento quirúrgico. Este procedimiento remueve el tejido necrótico, exudado, bacterias y células anormales. Si bien mantener la herida limpia ayuda a la

cicatrización, el desbridamiento vigoroso y repetido resulta un procedimiento cruento para el paciente, además de que no existen evidencias de que su aplicación constante sea efectiva (**Gontcharova, et al., 2010**). La ausencia de tratamientos antipatogénicos específicos en el mercado y los altos costos de los productos farmacéuticos disponibles reducen las alternativas de tratamiento en el sistema de salud pública. De esta forma, los pacientes pueden permanecer muchos años con una úlcera que no cicatriza, con todas las secuelas de salud, personales y sociales que eso conlleva.

4.5.1. Nueva estrategia de curación.

Uso de activos terapéuticos con propiedades sinérgicas. Las heridas crónicas infectadas son irreductibles por tratamientos antibióticos y antisépticos convencionales. Por esto, la estrategia actual se centra en la búsqueda de antimicrobianos antipatogénicos. Éstos, a diferencia de los antibióticos, son capaces de inhibir la virulencia bacteriana a través de distintos mecanismos (**Bjarnsholt, et al., 2005; Rasmussen, et al., 2005a; Rasmussen, et al., 2005b**). El sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (LAPS), inhibe in vitro adhesión, crecimiento, señales quorum sensing, biofilm y factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* (**Peral, et al., 2009; Peral, et al., 2010; Ramos, et al., 2010**).

4.5.1.1. Lactobacillus plantarum

Constituye el grupo de bacterias acidolácticas (BAL), gram positivos de forma bacilar o cocoide, que posee la característica de producir ácido láctico y otros compuestos como acetato, etanol, CO₂, formato y succinato a partir de carbohidratos fermentables. (**Zapata, 2009**).

Los problemas sanitarios principalmente la falta de una farmacología específica, constituye una de las razones por la cuales, se plantean nuevas alternativas que promueven una producción más limpia mediante el uso de probióticos de bacterias ácido lácticas (BAL). (**Gámez, et al, 2017**). Por ello, el sobrenadante de

Lactobacillus plantarum (LAPS) como IFA para la producción de un medicamento biológico como alternativa al uso de antibióticos.

4.5.1.2. LAPS.

Se comprobó que LAPS inhibe, crecimiento, formación de biofilm y disrumpe biofilm preformado en aislamientos clínicos de las bacterias presentes en el 80% de las UC en nuestra provincia: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Serratia marcesens* (**Lindon, et al., 2016**). LAPS no es citotóxico, ni induce apoptosis o necrosis (*in vivo* y *ex vivo*). Tampoco desencadena respuesta inflamatoria localizada o generalizada *in vivo*, cuando se comparó su efecto frente al de los antisépticos utilizados habitualmente en el tratamiento de UC infectadas (**Ramos, et al., 2010**).

Se determinó que LAPS reduce la carga bacteriana patógena y la cantidad de tejido necrótico, promueve el desbridamiento, la aparición de tejido de granulación y la cicatrización de manera directa e indirecta (**Ramos, et al., 2015**). Incrementa la producción de quimiocinas e interleucinas involucradas en el proceso de neovascularización (TGF- β , IL-8, IL-8R) y de células endoteliales y sus precursoras (**Peral, et al., 2010; Ramos, et al., 2012a; Ramos, et al., 2012b**). Mediante análisis de las propiedades biológicas y químicas de LAPS, se definió su composición y se propuso un mecanismo de acción hipotético (**Ramos, et al., 2015; Ramos, et al., 2013**). En la tabla 2 se presenta la composición de LAPS y el mecanismo de acción para cada componente. Los metabolitos responsables de las propiedades anti-patogénicas y pro-cicatrizantes de LAPS, actúan de manera sinérgica. Esta mezcla compleja puede considerarse como un único Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de origen biológico, según lo establecido por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica (ANMAT) en su disposición 7075/2011 y según la Dirección Nacional de vigilancia Sanitaria (DNVS) según su Decreto N° 6611/16. De esta forma, LAPS se postula como un producto eficaz y seguro para el tratamiento integral de las UCMI, ya que contempla todos los aspectos terapéuticos sugeridos por los especialistas:

- Posee efecto antibiótico, inhibidor de formación de biofilm y de disrupción de biofilm preformado sobre las principales bacterias aisladas de UC.
- Posee efecto antiséptico, sin comprometer la viabilidad de los tejidos vivos.
- Es desbridante (limpia la superficie de la herida).
- Es angiogénico y vasodilatador (aumenta la irrigación de la herida)
- Es inhibidor de la actividad MMPs (impide el agrandamiento del área de la herida)
- Es antioxidante e inmunomodulador (impide el daño por respuesta inflamatoria descontrolada).
- Es anestésico (ayuda a paliar el dolor crónico).
- Es desodorizante.

Tabla 2: Componentes de LAPS y su efecto sobre las UCMI. Ramos, et al., 2015.

Componentes que explican la capacidad bacteriostática y bactericida de LAPS sobre bacterias plantónicas y en biofilm	
Ácidos orgánicos	Principalmente ácido láctico seguido por ácido acético. Interfieren con las funciones celulares. Sus formas disociadas disminuyen el pH citoplasmático. Pueden desacoplar el transporte de electrones y de nutrientes o quelar cationes esenciales como el hierro.
Alcoholes	Varios tipos, el más abundante es el etanol. Desnaturaliza proteínas, principalmente las de membrana celular.
Otras moléculas orgánicas	Mevalonolactona, ácido benzoico, metil-hidantoína, etc. Poseen actividad inhibitoria del crecimiento en Gram negativos y hongos. Pueden actuar sinérgicamente.
H ₂ O ₂	Agente oxidante que ataca componentes celulares esenciales.
Plantaricinas	Son péptidos con acción bactericida. Poseen diferentes espectros de actividad, el daño se produce por formación de poros en la membrana.
Componentes que explican la capacidad inhibitoria del quorum sensing, biofilm y factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	
AI-2	Interfieren con la actividad biológica de las AHL con la consecuente inhibición de la producción de biofilm y factores de virulencia, a través del quorum quenching.
Componentes que explican la capacidad disruptora de biofilm	
DNAsa	Actúa contra el ADN extracelular presente en la matriz del biofilm.
Iones	Calcio, Sodio, Magnesio. También contribuyen al desprendimiento del biofilm.
Surfactantes	Distearin, palmitin y Tween 80 provenientes del medio de cultivo. Disrupción de las interacciones hidrofóbicas involucradas en los entrecruzamientos de la matriz del biofilm.
Agentes quelantes	Ácidos orgánicos, EDTA. Producen reducciones en la fuerza de la matriz y reducen su viscosidad.

Componentes que explican las propiedades pro-cicatrizantes	
Compuestos fenólicos	Atenúan el microambiente altamente oxidante generado por el continuo influjo de PMN.
Acidez (pH= 5.22±0.43)	Inhibe la excesiva actividad de la elastasa.
Ácido láctico	Estimula la angiogénesis (neovascularización y aumento de la perfusión del tejido de la herida).
Esterasa	Aumenta la concentración de acetilcolina, esta posee propiedades vasodilatadoras, mejorando la perfusión al sitio de la herida.
Mevalonolactona	Propiedades anti-edad y humectante de la piel.
Barbitúricos	Proporcionarían efectos analgésicos y anestésicos al tratamiento.

4.5.2. Nano celulosa bacteriana.

La celulosa es un polisacárido lineal que consiste en una cadena de β (1-4) unidades de D-glucosa unidas. **Klemm, et al, 2005**. La celulosa es el componente principal de la madera y la mayoría de las fibras naturales del reino vegetal. **Croteau, et al, 2000**. Se aplica ampliamente a nivel industrial, la escala productiva genera serios problemas en ecosistemas. **Kamm, et al, 2007**.

Diversas aplicaciones de cada nuevo material descubierto es objeto de estudio por investigadores de todo el mundo. Este análisis variado y exhaustivo resultó en la aparición de productos potenciales con alto valor agregado y muy bajo impacto ambiental. **Kargarzadeh, et al 2018**. Estas estructuras celulósicas se llaman Nano celulosa fibrilada (NFC) y se refiere a las fibras de celulosa que tienen sido fibrilado para lograr aglomerados de unidades de microfibrillas de celulosa. **Gandini, et al, 2018**.

La nano celulosa se produce comúnmente con un tamaño deseado por el tratamientos enzimáticos, donde se biosintetiza de glucosa usando la acción directa de cepas bacterianas específicas, como *Pseudomonas fluorescens*. **Trache, 2018**.

Posee amplia ventaja sobre otros polímeros, representa un desarrollo sostenible, verde, económico y es una alternativa para reemplazar productos no biodegradables. Entre sus aplicaciones se encuentra el reemplazo de ingredientes farmacéuticos no

activos en el diseño de productos farmacéuticos formulaciones, debido a que tienen mayor transparencia óptica, su superficie es químicamente adaptable. Permite la anexión de múltiples grupos funcionales, mejorando sus propiedades mecánicas. **Klemm, et al, 2018.**

Algunas aplicaciones farmacéuticas de gran relevancia como la biomédica implantes o andamios, películas translúcidas, sistemas de liberación controlada, apósitos y parches antimicrobianos con acción de barrera. **González, et al, 2018.**

3.METODOLOGÍA

3.1. PRODUCCIÓN DEL INGREDIENTE ACTIVO FARMACÉUTICO E IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA.

3.1.1. Parámetros de calidad de los componentes de partida.

3.1.1.1. Materia prima: Todas las materias primas utilizadas fueron donadas por el Laboratorio de Estudios Farmacéuticos y Biotecnología Farmacéutica (LEF y BiFa – UNT), previamente adquiridas por proveedores aprobados; desde los medios de cultivo para realizar la producción principal hasta aquellas utilizadas para realizar los controles de calidad correspondientes.

Los proveedores del LEF y BiFa cuentan con certificaciones que avalan y aseguran la uniformidad de la composición de los productos que comercializan. Todo ello a fin de poder estandarizar la producción de LAPS y obtener IFAs de características constantes.

3.1.1.2. Medios de cultivo:

3.1.1.2.1. Preparación de medios de cultivo para la producción de LAPS.

A fin de exacerbar la actividad inductora del Biofilm. Fueron preparados según Ficha Técnica del medio MRS de Britania detallado en Anexo 1, cuatro medios de cultivo diferentes (MRS, SCM1, MRST y MRSTC) para la producción de LAPS, cuyas fórmulas y justificación se detallan a continuación:

3.1.1.2.1.1. Medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) comercial: medio de cultivo utilizado en este trabajo como base para el diseño y posterior modificación de composición de SCM1, MRST y MRSTC y como patrón de control. Este medio se utilizó para obtener LAPS0.

Tabla 3: *Composición cuali-cuantitativa del Medio MRS.*

Componentes	Cantidad
Proteosa peptona N° 3	5 g
Extracto de Carne	5 g
Extracto de Levadura	2,5 g
Glucosa	10 g
Sorbitán monoleato	0,5 mL
Fosfato dipotásico	1 g
Acetato sódico	2,5 g
Citrato de amonio	1 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de manganeso	0,025 g
Agua destilada	500 mL

3.1.1.2.1.2. Medio SCM1: medio de cultivo en el cual fue reemplazado totalmente el extracto de levadura por CBR (células bacterianas residuales) secas y lisadas. En el marco de la filosofía de P+L, se reemplazaron las fuentes de proteínas. Este medio se utilizó para obtener LAPSa.

Tabla 4: *Composición cuali-cuantitativa del Medio SCM1.*

Componente	Cantidad
Peptona de Carne	5 g
Extracto de Carne	5 g
CBR	1,25 g
Glucosa anhidra	10g
Tween 80	0,5 mL
Fosfato di potásico	1 g
Acetato sódico anhidro	2,5 g
Citrato de sodio	1 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de manganeso	0,025 g
Agua destilada	500 mL

3.1.1.2.1.3. Medio MRST: Al medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe) comercial fue adicionado Tween 80, debido a que el mismo posee elevado poder irruptor de biofilm. Este medio se utilizó para obtener LAPSb.

Tabla 5: *Composición cuali-cuantitativa del Medio MRST.*

Componente	Cantidad
Proteosa peptona N° 3	5 g
Extracto de Carne	5 g
Extracto de Levadura	2,5 g
Glucosa	10 g
Sorbitán monooleato	0,5 mL
Fosfato dipotásico	1 g
Acetato sódico	2,5 g
Citrato de amonio	1 g
Sulfato de magnesio	0,1 g
Sulfato de manganeso	0,025 g
Tween 80	1,5 mL
Agua destilada	500 mL

3.1.1.2.1.4. Medio MRSTC: Se adicionó cationes calcio, magnesio y tween 80, al medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe). Con la adición de los mismos se potenció la capacidad disruptora de biofilm, debido a que los cationes bivalentes rompen el biofilm. Este medio se utilizó para obtener LAPSc. Según solicitud de patente INPI N°: P20130104098.

Tabla 6: *Composición cuali-cuantitativa del Medio MRSTC.*

Componente	Cantidad
Proteosa peptona N° 3	5 g
Extracto de Carne	5 g
Extracto de Levadura	2,5 g
Glucosa	10 g
Sorbitán monooleato	0,5 mL
Fosfato dipotásico	1 g
Acetato sódico	2,5 g
Citrato de amonio	1 g
Sulfato de magnesio	0,1 g

Sulfato de manganeso	0,025 g
Cloruro de Magnesio	1 g
Cloruro de Calcio	1 g
Tween 80	1,5 mL
Agua destilada	500 mL

3.1.1.2.2. Preparación de medios de cultivo estándar.

3.1.1.2.2.1. Para *L. plantarum*: Las cepas de *L. plantarum* ATCC 10241 utilizadas, fueron conservadas en el LEF y BiFa desde el 07/12/2018, en medio LEL compuesto por leche, extracto de levadura y glucosa con glicerol al 30%, en viales almacenados en freezer a -22 °C. Para obtener el cultivo starter del mismo se preparó medio MRS.

3.1.1.2.2.2. Para *P. aeruginosa*: Para obtener el cultivo estándar del mismo se preparó medio Luria Bertani (LB). Según Ficha Técnica del medio LB detallado en **Anexo 2**.

3.1.1.2.2.3. Para *S. aureus*: Para obtener el cultivo starter del mismo se preparó medio Brain Heart Infusion (BHI). Según Ficha Técnica del medio BHI detallado en **Anexo 3**.

3.1.1.2.3. Preparación de soluciones para ensayos de inhibición de crecimiento y disrupción de biofilm preformado.

3.1.1.2.3.1. Preparación de solución fisiológica al 0,9%: Utilizadas para tinción de biofilm con cristal violeta y para ensayos de inhibición de crecimiento y disrupción de biofilm preformado. Ver la composición es detallada del mismo en el **Anexo 4**.

3.1.2. Proceso de producción del IFA: La obtención de LAPS se publicó por Ramos y colaboradores en 2012 (**Ramos, et al., 2012a**). En este trabajo se utilizó el protocolo de elaboración estandarizado según Cabrera, et al., 2019 en el cual se definieron las condiciones de cultivo, métodos de purificación, las características fisicoquímicas y de actividad biológica del producto; teniendo en cuenta las

condiciones operativas como: tiempo de cultivo, proceso de filtración, tiempo de preparación del material, etc. Indispensables para estandarizar la producción del IFA.

Ver Anexo 5.

Se diseñó un diagrama de flujo del proceso de producción, y se identificaron los PCC, se establecieron los controles del proceso y criterios de aceptación/rechazo en cada etapa del proceso. También se identificaron los puntos del proceso donde se generan subproductos residuales con potencial de reutilización implementando la filosofía de producción más limpia.

3.1.3. Parámetros de calidad del IFA: En base a los antecedentes existentes (Ramos, et al., 2015; Sesto Cabral, et al., 2015a; Cabrera, et al., 2016, Cabrera, et al., 2019), fueron establecidos los parámetros de calidad para el IFA biológico según Tabla 1 y los métodos analíticos para determinarlos.

Tabla 7: *Parámetros de calidad verificados en el IFA producido.*

Controles de calidad	Parámetros	Especificaciones
Organolépticos	Aspecto	Líquido homogéneo, sin turbidez.
	Color	Marrón translúcido.
	Olor	Característico.
Fisicoquímico	pH	5,22 ± 0,43
Microbiológico	Esterilidad	Ausencia de crecimiento en caldo MRS.

Las mediciones de los parámetros de calidad se realizaron según las técnicas indicadas a continuación:

3.1.3.1. Organolépticos: se verificó por observación a simple vista y describió el aspecto, color y olor del producto y se calificó como aceptable/no aceptable.

3.1.3.2. pH: se midió por inmersión del electródo en la muestra a temperatura ambiente con pHmetro (Lutron PH-206).

3.1.3.3. Esterilidad: se sembró 500 uL del IFA en 10 mL de caldo MRS. Se incubó por 24 horas a 37 °C y se examinó visualmente al finalizar el periodo de incubación. Se calificó como presencia/ausencia de crecimiento.

3.1.4. Determinación de la actividad antimicrobiana.

3.1.4.1. Inhibición del crecimiento: las cepas patógenas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* se cultivaron en caldo LB y BHI respectivamente, durante 12 horas a 37 °C. Se prepararon las suspensiones DO600 \approx 0,150 usando medio fresco de LB y BHI como diluyente y blanco.

En microplacas de poliestireno de 96 pocillos, fueron sembrados: 100 μ L de cada medio de crecimiento, 50 μ L de suspensión bacteriana y 100 μ L de cada inhibidor: LAPS₀, LAPS_a, LAPS_b y LAPS_c fueron utilizados como control de actividad antimicrobiana original, la gentamicina (8 μ g/mL) fue utilizado como control antimicrobiano positivo y los medios LB o BHI como controles de crecimiento, la solución fisiológica como control antimicrobiano negativo.

Las microplacas se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Las curvas de crecimiento se obtuvieron a partir de la medición de la DO600 cada una hora, en lectora de microplacas (Multiskan Go - Thermo Scientific). Cada curva se realizó por quintuplicado y cada punto se expresó como la media \pm desviación estándar.

3.1.4.2. Inhibición de formación de biofilm: para poder estudiarlo se descartó el contenido de los pocillos del ensayo anterior de inhibición de crecimiento. Los pocillos fueron lavados 3 veces con suero fisiológico al 0,9%. La biomasa remanente adherida se tiñó durante 15 min con 250 μ L de cristal violeta al 0,1% (m/V). Se descartó el contenido y se lavó suavemente suero fisiológico al 0,9%. Las células muertas y adheridas se solubilizaron con 250 μ L de etanol y se midió la DO540 en lectora de microplacas (Multiskan Go - Thermo Scientific). La medida de la DO es

directamente proporcional a la biomasa formada. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar por quintuplicado.

3.1.4.3. Capacidad de disrupción de biofilm: se preparó la suspensión de cada cepa patógena siguiendo el mismo protocolo que en el ensayo para inhibición del crecimiento. En microplacas de poliestireno de 96 pocillos, se sembró: 100 μ L de cada medio de crecimiento y 50 μ L de las suspensiones bacterianas. Se incubó a 37 °C durante 6 horas. Luego, se agregaron 100 μ L de LAPSo, LAPSa, LAP Sb y LAPSc como control de actividad original, gentamicina (8 μ g/mL) como control antimicrobiano positivo, medio LB o BHI como control de crecimiento, solución fisiológica como control antimicrobiano negativo. Se incubó nuevamente a 37°C durante 6 horas. Se descartó el contenido de los pocillos y se lavó tres veces con solución fisiológica al 0,9%. El proceso de tinción se realizó según se indicó en **3.1.4.2.** inhibición de formación de biofilm. Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar.

3.1.5. Aplicación de metodologías de producción más limpia: el protocolo de producción más limpia aplicado en este trabajo, consistió en el diseño y producción de medios de cultivo que contengan CBR lisadas y secas. Buscando reutilizar las CBR como fuente de proteínas e hidratos de carbono, se reemplazó el extracto de levadura, uno de los componentes del medio de cultivo comercial MRS. Combinando nuestro interés por la sostenibilidad ambiental y por la disminución de costos. Se buscó así la generación de residuos tendientes a cero y el diseño de productos que mejoren la rentabilidad de la línea de producción del LEF y BiFa.

Se diseñó un medio de cultivo Sesto Cabrera Moreno 1 (SCM1), para el crecimiento de *L. plantarum*. Se comparó el comportamiento de *L. plantarum* en el medio SCM1 con un ensayo de crecimiento, utilizando medio MRS como medio de referencia. Se reemplazó totalmente una de las fuentes de proteínas (extracto de levadura) por CBR.

Ya que el producto obtenido en la línea de elaboración es un IFA con características de actividad y calidad previamente reportadas, se espera que los medios diseñados produzcan sobrenadantes con las propiedades del LAPS original que se obtiene a partir de MRS. Esta característica permitiría su uso en el tratamiento de úlceras crónicas con elevado volumen de exudado.

3.2. DESARROLLO DE UN MEDICAMENTO BIOLÓGICO DE USO TÓPICO PARA ELEVADO VOLUMEN DE EXUDADO.

3.2.1. Estudios de pre-formulación.

3.2.1.1. Relevamiento bibliográfico: se identificaron los Ingredientes Farmacéuticos No Activos (IFNAs) que cumplen con las premisas de seguridad, economía atómica, biocompatibilidad, biodegradabilidad (“bueno desde el diseño”).

3.2.1.2. Estudio y selección del sistema de solventes: se identificaron los sistemas de solventes verdes, con el objetivo ideal de utilizar agua. La selección del sistema de solventes, está directamente asociada a la selección de polímeros solubles en estos.

3.2.1.3. Estudio y selección del método de elaboración: Se realizó un relevamiento de posibles superficies inertes para el moldeado de las mezclas poliméricas, que cumplan con la premisa: No tóxico, facilidad de evaporación del solvente y facilidad de manipuleo.

3.2.1.4. Parámetros de proceso y diseño preliminar de POE: se diseñó un proceso de producción que se adapte a los requerimientos de Química verde y 4R, en particular en lo concerniente a la economía atómica.

3.2.1.5. Evaluación de las propiedades tecnológicas de los STT diseñados:

Características físicas de los STT diseñados. Se evaluaron las siguientes características:

Características	Especificaciones
Apariencia	Discriminando entre mate y brillante.
Flexibilidad	Sí/ No.
Burbujas	Presencia y Ausencia.
Color	Coloreado o Traslucido.
Integridad de Superficie	Si/No.
Resistencia al quiebre	Si /No.

3.2.1.6. Capacidad de Hinchamiento.

Para evaluar la capacidad de hinchamiento de los films diseñados se utilizó PBS de pH 7,2 reportado en literatura como el pH del tejido cutáneo en heridas. Estudios previos a cargo de nuestro equipo de trabajo, permitieron identificar que este valor de pH de 7,2 se repite en el mayor número de pacientes con úlceras crónicas, tomándose como el máximo valor de pH alcanzado por una úlcera cronicada.

Se colocó una solución aceptora de PBS en volumen de 10 mL y se mantuvo durante 24 h con agitación orbital. Las lecturas de peso, se realizaron luego de agotar el volumen remanente de agua. El aumento de peso por absorción de PBS se registrará a las 0, 4, 6 y 24 h. Con los valores registrados se calculará el índice de hinchamiento como:

$$S = (P_f - P_i) / P_i \quad (1)$$

Con los valores obtenidos del índice de hinchamiento se calculará la capacidad de absorción de agua por cm² de área del parche y el porcentaje de retención de agua del STT diseñado en comparación con un STT sin CB que se utiliza como control.

3.2.1.7. Porcentaje de absorción de humedad.

Se cortaron muestras de STT de 1,5 x 1,5 cm. Se pesaron en balanza analítica. Se ubicaron las muestras en un recipiente hermético con 100 mL de solución

saturada de KCl (mantiene la humedad relativa en 84%) a 25 °C. Luego de 3 días los STT fueron retirados y se pesaron.

El porcentaje de absorción de humedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$H = [(Pf - Pi) / Pi] \times 100 \quad (2)$$

3.2.1.8. Uniformidad de peso.

Se pesó el parche completo en balanza analítica. Se secó a 60 °C. Se registró el peso hasta las 4 h, 8 h o hasta peso constante. Se trabajó por triplicado. El promedio de los pesos y desviación estándar se calculó a partir de los pesos individuales.

3.2.1.9. pH superficial.

Se cortaron muestras de STT de 1,5 cm x 1,5 cm. Se dejaron hinchar en 2 mL de agua durante 15 min. El pH de la superficie se midió usando una tira universal de pH (Biopack) en contacto con el film hinchado.

3.2.1.10. Liberación del ingrediente farmacéutico activo desde la matriz portadora.

Para evaluar la liberación del IFA, se modificó el ensayo de liberación in vitro reportado en Sesto Cabral, M. E. y colaboradores, 2015. La modificación se debe a que el portador es un sólido en forma de parche y el equipo y método, se adaptaron para la medición de difusión desde una matriz semisólida.

Se cortó 1 cm² de parche para cada recipiente, se pesaron en balanza analítica y los mg registrados se utilizaron para los cálculos de concentración de LAPS liberado al medio.

- Se registraron los valores de absorbancia a tiempo 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 minutos.

- Con los datos obtenidos se graficó una curva de concentración por cm² de área del parche liberada en el tiempo.
- Con la solución remanente se hizo un seguimiento de pH en cada lectura de absorbancia.
- La concentración del analito liberado se identificó por barrido UV-visible en espectrofotómetro. Se identificó un pico de máxima absorbancia a 230 nm, coincidente con lo discutido en Sesto Cabral y col 2015.

3.2.2. Diseño de formas farmacéuticas para vehicular los ingredientes farmacéuticos activos diseñados.

3.2.2.1. Formas de liberación modificada para el transporte transdérmico de fármacos.

Las Farmacopeas reconocen diversas formas farmacéuticas destinadas al control temporal de la liberación: liberación prolongada, liberación retardada y liberación pulsátil (**Real Farmacopea Española 3ª edición 2005; Farmacopea Europea 6ª edición, 2008; USP 32, 2009**). A éstas se añaden las formulaciones de liberación sitio-específicas y las nuevas formas de disgregación rápida. Los excipientes juegan un papel clave, ya que el control de la liberación está regulado por los materiales que forman el sistema (**Sánchez, et al., 2010**). Los sistemas de administración transdérmica de fármacos (STT) están diseñados para lograr un efecto terapéutico prolongado a dosis única, mediante la liberación continua del medicamento en un determinado periodo de tiempo (**Pillai, et al., 2015; Kavitha & Rajendra, 2011**).

A continuación, se muestra en las **Tablas 11 al 14** la composición de las STT diseñadas durante este trabajo.

3.2.3. Formulación de STT de liberación prolongada para elevado volumen de exudado.

Fue seleccionado el sistema EC5 como se indica en la **Tabla 8** como Blanco1 según Cabrera, et al., 2019. Por tener las características apropiadas para las formulaciones en desarrollo.

A continuación, para elaborar un STT de 112,5 cm² se detallan las fórmulas cuali-cuantitativa de cada uno, de la **Tabla 8 al 13**:

Tabla 8: *Composición cuali-cuantitativa de STT 1 – Blanco₁.*

Componente	Cantidad
Neocel	1,800 g
Agua A	15 mL
Carbopol	0,230 g
Agua B	15 mL
E-NM30D	5 mL
Trietanolamina	0,125 mL

Tabla 9: *Composición cuali-cuantitativa de STT 2 – Blanco₂.*

Utilizado como control negativo de inhibición, en el cual se realizó la inclusión de nanocelulosa de origen bacteriano a la formulación Blanco₁.

Componente	Cantidad
Neocel	1,800 g
Agua A	15 mL
Carbopol	0,180 g
Nanocelulosa	0,050 g
Agua B	15 mL
E-NM30D	5 mL
Trietanolamina	0,100 mL

Además, se elaboraron sistemas en los que se reemplazó en su totalidad el agua de la formación original por el IFA de interés, como se indican a continuación en la **Tabla 10 al 13**:

Tabla 10: *Composición cuali-cuantitativa de STT 3 - LAPS₀.*

Componente	Cantidad
Neocel	1,800 g
LAPS ₀	15 mL

Carbopol	0,180 g
Nanocelulosa	0,050 g
LAPS ₀	15 mL
E-NM30D	5 mL
Trietanolamina	0,100 mL

Tabla 11: *Composición cuali-cuantitativa de STT 4 - LAPS_A.*

Componente	Cantidad
Neocel	1,800 g
LAPS _A	15 mL
Carbopol	0,180 g
Nanocelulosa	0,050 g
LAPS _A	15 mL
E-NM30D	5 mL
Trietanolamina	0,100 mL

Tabla 12: *Composición cuali-cuantitativa de STT 5 - LAPS_B.*

Componente	Cantidad
Neocel	1,800 g
LAPS _B	15 mL
Carbopol	0,180 g
Nanocelulosa	0,050 g
LAPS _B	15 mL
E-NM30D	5 mL
Trietanolamina	0,100 mL

Tabla 13: *Composición cuali-cuantitativa de STT 6 - LAPS_C.*

Componente	Cantidad
Neocel	1,800 g
LAPS _C	15 mL
Carbopol	0,180 g
Nanocelulosa	0,050 g
LAPS _C	15 mL
E-NM30D	5 mL
Trietanolamina	0,100 mL

Además, se elaboró un sistema de 25 cm² utilizado como control positivo de inhibición en el que se reemplazó totalmente el agua por Gentamicina como se indican a continuación en la **Tabla 14**:

Tabla 14: *Composición cuali-cuantitativa de STT 7 - Gentamicina.*

Componente	Cantidad
Neocel	0,6 g
Gentamicina	5 mL
Carbopol	0,06 g
Nanocelulosa	0,02 g
Gentamicina	5 mL
E-NM30D	2 mL
Trietanolamina	csp.

4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRODUCCIÓN DEL INGREDIENTE ACTIVO FARMACÉUTICO E IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN MÁS LIMPIA.

Se diseñaron tres medios de cultivo alternativos al medio comercial de crecimiento para *Lactobacillus plantarum* ATCC 10241. El medio comercial seleccionado fue el de Man Rogosa Sharpe (MRS).

Un cultivo de *L. plantarum* ATCC 10241 en medio MRS, crecido durante 12 horas a 37 °C (ver Materiales y Métodos 3.1.1.2.2.1). Como resultado del metabolismo normal de *L. plantarum*, en el medio MRS, se obtiene por mecanismos físicos de separación, un Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA) de origen biológico que denominamos LAPS original. Este IFA original se utiliza para la producción de formas farmacéuticas de uso tópico para el tratamiento de úlceras crónicas, por su probada actividad pro-cicatrizante y anti patogénica. La Figura 1 en forma de un diagrama de flujo muestra el proceso de obtención de LAPS original, su control de calidad y mecanismos de disposición de residuos.

4.1.1. Diagrama de flujo del proceso de producción:

Al realizar el diagrama de flujo se determinó el número de etapas del proceso de producción, la recuperación y reutilización de las células bacterianas residuales (CBR).

Además, se identificaron las etapas críticas del proceso de producción que son: la incubación de *Lactobacillus plantarum* ATCC 10241 y la filtración en vacío; que sirvieron para establecer los controles de calidad durante el proceso de producción a fin de verificar el cumplimiento de las condiciones requeridas para dar continuidad al proceso.

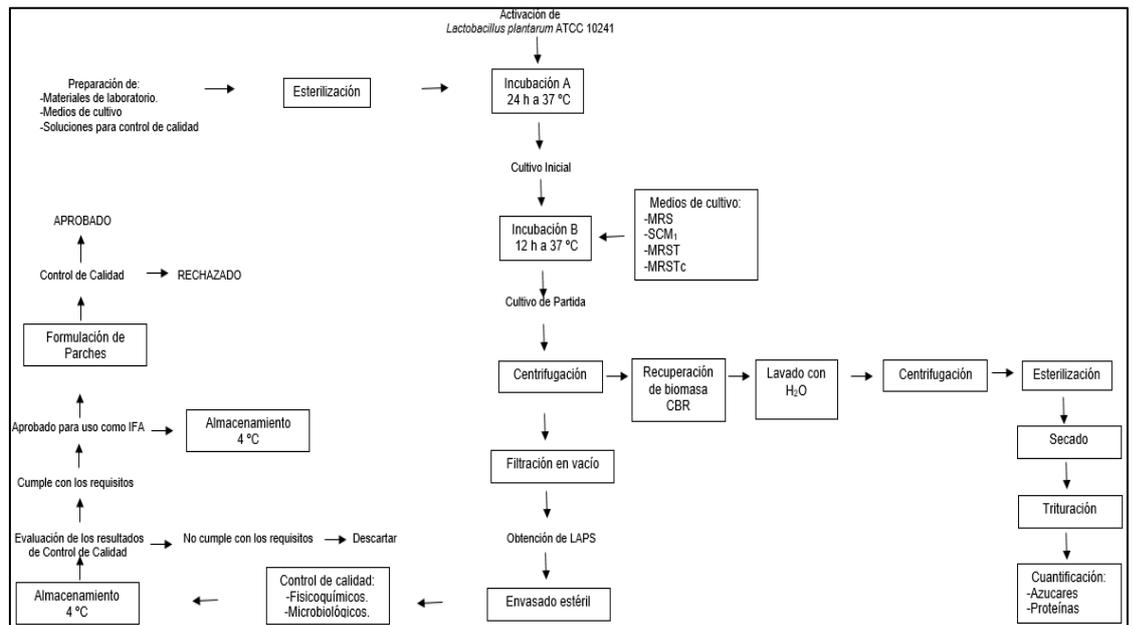


Figura 1: Diagrama de flujo del proceso de obtención de los sobrenadantes (LAPS), el procedimiento de recuperación y reutilización de residuos de biomasa involucrado hasta la producción de la forma farmacéutica final.

4.1.2. Proceso de Producción de LAPS.

A continuación, se describen las etapas del proceso de producción de LAPS:

4.1.2.1. Activación de *Lactobacillus plantarum* ATCC10241.

Se tomó 1 mL de un vial del stock permanente de la cepa, se sembró en 10 mL de caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 24 horas (Incubación A). Se realizó la activación de la cepa dos veces consecutivas debido a que se partió de una cepa refrigerada.

4.1.2.2. Preparación del cultivo de partida.

Se realizó una dilución del cultivo iniciador de $DO_{600} \approx 0,1$, utilizando MRS como blanco y diluyente. Se sembró 500 uL de la cepa activada en 500mL de MRS, SCM1, MRST y MRSTC. Se incubó a 37°C durante 12 horas. (Incubación B). Cabe destacar que la misma corresponde uno de los puntos críticos del proceso de producción para la producción de metabolitos de *L. plantarum*, por ello es de suma

importancia realizar el control de la concentración, volumen de siembra del inóculo, temperatura y tiempo de incubación.

4.1.2.3. Medios de cultivo.

Cada uno de los medios de cultivo fueron diseñados considerando como base el medio comercial y sus modificaciones se introdujeron con el objetivo de potenciar la actividad antibacteriana y anti patogénica del producto original. Estas modificaciones fueron introducidas en base a dos solicitudes de patente presentadas por el equipo de trabajo del LEF y BiFa, correspondientes a “Nuevos medios de crecimiento para bacterias de interés industrial”. Exp de Sol: AR20170123114. Y “Procedimiento para obtener un sobrenadante modificado del cultivo de bacterias, sobrenadante obtenido y composiciones”. Exp de Sol: P20130104098. En los puntos del 3.1.1.2.1.1 al 3.1.1.2.1.4 se muestra la composición de cada uno de los medios de cultivo diseñados para tal fin. Se realizaron los testeos de actividad antibacteriana y anti patogénica que serán presentadas más adelante en el punto de Control de Calidad.

4.1.2.4. Centrifugación: Los cultivos de partida (MRS, SCM1, MRST y MRSTC) fueron centrifugados a 8000 rpm durante 10 min. A fin de separar la mayor parte de las células bacterianas residuales susceptibles de ser reutilizadas, cuyo tratamiento y recuperación se comentará en la sección de implementación de P+L.

4.1.2.5. Filtración en vacío: Tanto el ensamblado del equipo como el proceso de filtración fue realizado en condiciones de esterilidad, en el cual el sobrenadante obtenido se filtró utilizando un equipo de filtración estéril a vacío y filtros de membrana de nitrocelulosa de 0,22 micras. Cabe destacar que la misma corresponde uno de los puntos críticos del proceso de producción, a fin de obtener el IFA estéril.

4.1.2.6. Envasado estéril: Los IFAs estériles filtrados (LAPS0, LAPSA, LAPSB y LAPSC) fueron acondicionados por separado en frascos de vidrio con tapa a rosca estéril. Se separaron 2 contra muestras de 10 mL de cada LAPS para los controles fisicoquímicos y microbiológicos. Los frascos fueron rotulados, indicando el nombre

del LAPS y la fecha, posteriormente fueron almacenados en el refrigerador a una temperatura de 4-8 °C hasta la aprobación de los controles de calidad.

4.1.2.7. Controles de calidad: A continuación, se detallan los controles realizados dentro del proceso de producción. A partir de las 2 contra muestras separadas luego de filtrar para tal fin.

4.1.2.7.1. Controles fisicoquímicos y organolépticos.

Como parámetro fisicoquímico se midió el pH y se verificaron caracteres organolépticos como: el aspecto, color y olor. Los datos relevados se presentan en la **Tabla 7**.

4.1.2.7.2. Controles microbiológicos.

Se realizó el ensayo de esterilidad utilizando 100 µL de LAPS en placas de MRS agar y se incubó a 37°C durante 24 horas. El resultado positivo corresponde a ausencia de crecimiento y el resultado negativo corresponde a presencia de crecimiento. Cuando el resultado fue positivo, se continuó con el proceso de producción y cuando fue negativo se procedió a descartar el sobrenadante obtenido. Los datos relevados se presentan en la **Tabla 15**.

Tabla 15: Resultados de los controles de calidad realizados a todos los LAPS durante el proceso de producción. Se indica con cada parámetro de calidad las especificaciones aceptables.

Controles de Calidad			LAPS			
Controles	Parámetros de calidad	Especificaciones	LAPSo	LAPSa	LAPSc	LAPSc
Organolépticos	Aspecto	Líquido homogéneo, sin turbidez	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Aceptable
	Color	Marrón translúcido	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Aceptable
	Olor	Característico	Aceptable	Aceptable	Aceptable	Aceptable
Fisicoquímicos	pH	5,22 ± 0,43	5,32	4,86	5,34	4,81
Microbiológico	Esterilidad	Ausencia de crecimiento en MRS Agar (A/C)	A/C	A/C	A/C	A/C

Los resultados de los controles organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos obtenidos para LAPS cumplieron con las especificaciones de los parámetros de calidad. Por ello fueron aprobados, de este modo dando continuidad al proceso de producción.

4.1.2.7.3. Crecimiento de *Lactobacillus plantarum*:

Como se indica en los objetivos del trabajo, se tomaron 3 medios de cultivo alternativo buscando obtener 3 nuevos IFAs a saber: LAPSA, LAPSB y LAPSC. **(ver materiales y métodos punto 3.1.2).**

Se testeó la actividad antibacteriana y anti patogénica para los 3 IFAs obtenidos y los resultados se compararon con la actividad biológica de LAPS original. Para estos ensayos se siguió el protocolo establecido previamente en publicaciones del equipo de trabajo. **(Ver materiales y métodos punto 3.1.4).** La actividad antimicrobiana y la actividad anti patogénica se testearon frente a dos bacterias patógenas comunes en las infecciones de úlceras venosas crónicas: *Staphilococcus aureus* ATCC 25933 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, estos patógenos predisponen el lecho ulceroso para la colonización por otras bacterias.

Curvas de crecimiento normal de las bacterias patógenas utilizadas para testear la actividad antimicrobiana y antipatogénica de los IFAs.

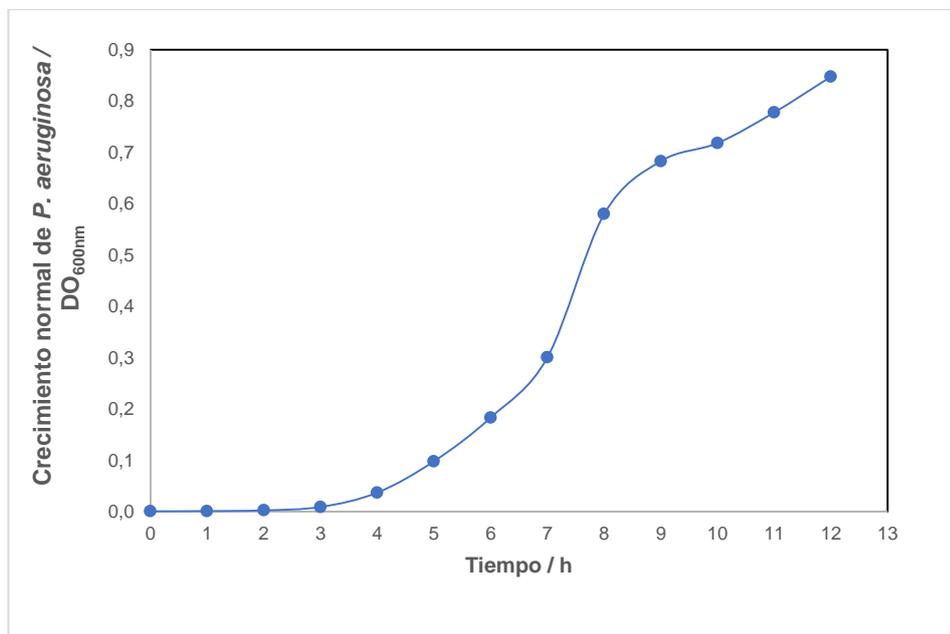


Figura 2: Muestra la curva de crecimiento normal de *P. aeruginosa* ATCC 27853 cultivado durante 12 horas en medio de cultivo Luria Bertani (LB) incubado a 37°C.

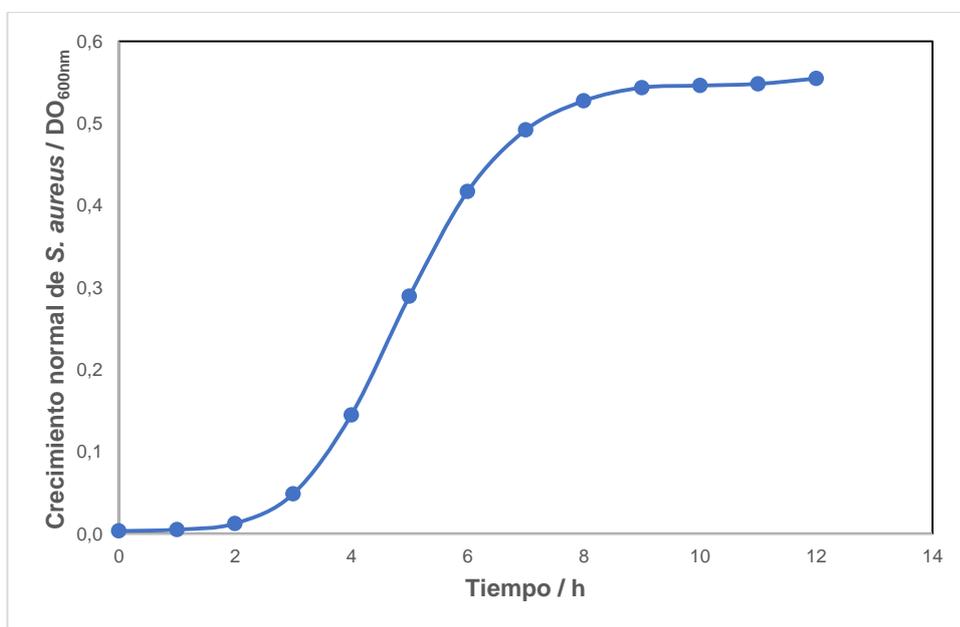


Figura 3: Muestra la curva de crecimiento normal de *S. aureus* ATCC 25933 cultivado durante 12 horas en medio de cultivo Brain Heart Infussion (BHI) incubado a 37 °C.

4.1.2.7.4. Determinación de actividad antimicrobiana:

Inhibición de crecimiento de bacterias patógenas aisladas en mayor porcentaje en heridas crónicas infectadas.

Para testear la capacidad de inhibición de crecimiento normal de bacterias patógenas generalmente aisladas de heridas crónicas, se realizaron ensayos pertinentes. (Ver materiales y métodos punto 3.1.4.1.)

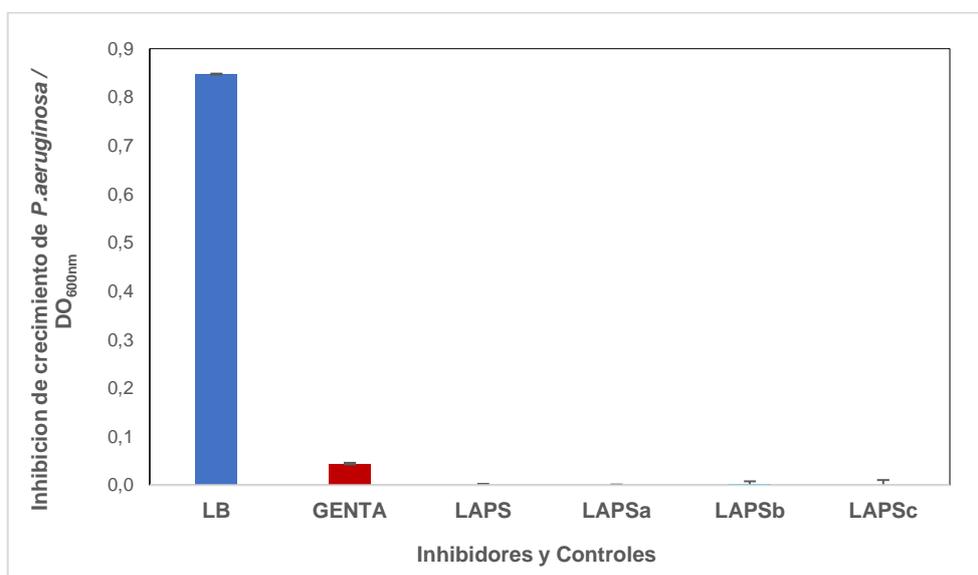


Figura 4: Inhibición de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.

La **Figura 4** muestra la inhibición de crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853. Para el ensayo se utilizó la bacteria patógena con crecimiento en medio de cultivo LB durante 12 horas a 37 °C. Se utilizó como control positivo de crecimiento al medio de cultivo Luria Bertani y como control negativo de crecimiento al antibiótico Gentamicina de concentración (8µg/mL). En todos los casos LAPS, LAPSa, LAPSb y LAPSc mostraron inhibición total del crecimiento de *P. aeruginosa* cuando se compararon las DO600 con respecto al control positivo de crecimiento. Cuando los valores de las DO600 obtenidas se contrastaron con los valores obtenidos con Gentamicina (Genta=0,031±0,005), en concentración inhibitoria mínima (CIM), todos los IFAs fueron significativamente diferentes para:

(LAPS= $0,001 \pm 0,002$), (LAPSa= $0,000 \pm 0,002$), (LAPSc= $0,001 \pm 0,001$), (LAPSb= $0,002 \pm 0,03$).

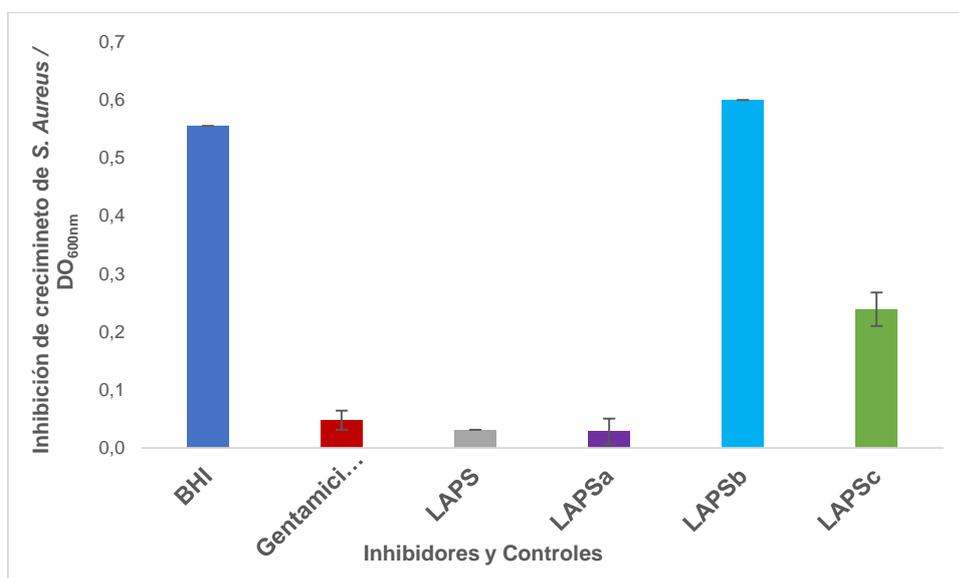


Figura 5: Inhibición de crecimiento de *S. aureus* ATCC 25933 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.

La **Figura 5** muestra la inhibición de crecimiento de *S. aureus* ATCC 25933. Para el ensayo se utilizó la bacteria patógena con crecimiento en medio de cultivo BHI durante 12 horas a 37 °C. Se utilizó como control positivo de crecimiento al medio Brain Heart Infusion y como control negativo de crecimiento al antibiótico Gentamicina en concentración ($8\mu\text{g/mL}$). En todos los casos LAPS, LAPSa, LAPSb y LAPSc mostraron inhibición del crecimiento de *S. aureus* cuando se compararon las DO600 con respecto al control positivo de crecimiento. Cuando los valores de DO600 obtenidas se contrastaron con los valores obtenidos con Gentamicina (Genta= $0,015 \pm 0,005$), en concentración inhibitoria mínima (CIM), todos los IFAs fueron significativamente diferentes y mostraron inhibición del crecimiento de *S. aureus*: (LAPS= $0,010 \pm 0,008$), (LAPSa = $0,010 \pm 0,009$), (LAPSb = $0,249 \pm 0,015$) y (LAPSc = $0,068 \pm 0,014$).

Inhibición de formación de biofilm de bacterias patógenas aisladas en mayor porcentaje en heridas crónicas infectadas.

Para cuantificar el biofilm formado en presencia del medio de crecimiento normal y en presencia de los inhibidores de formación, se descartaron los cultivos

contenidos en las placas de 96 pocillos y se colocaron 250 μ L de cristal violeta. Luego de descartar el cristal violeta se retomó la tinción adherida al biofilm remanente con alcohol de 96°. Los valores de concentración de cristal violeta leídos a una DO540, son una medida indirecta de la concentración de biofilm presente en cada uno de los pocillos.

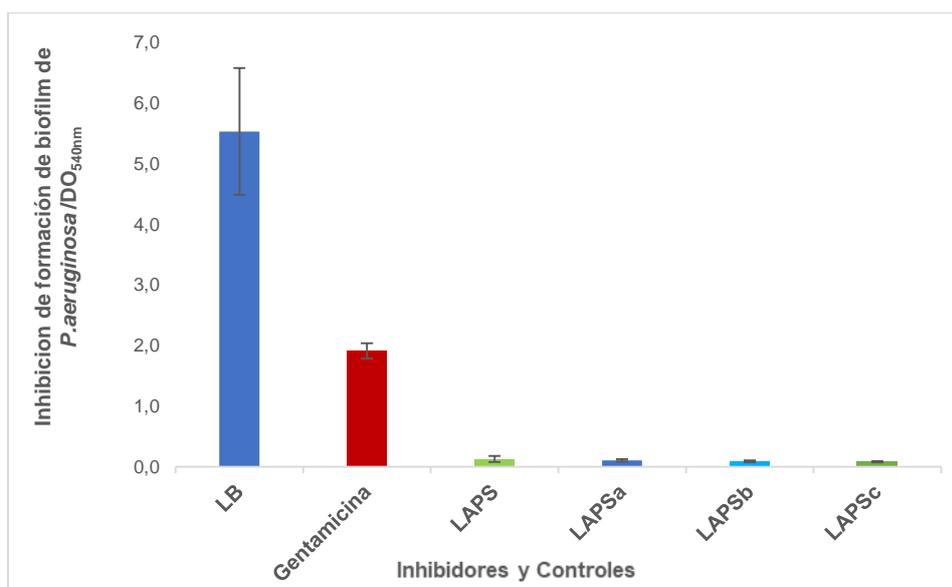


Figura 6: Inhibición de formación de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.

La **Figura 6** muestra la inhibición de formación de biofilm cuando se colocó el inhibidor (IFA) en contacto directo con el crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 en medio de cultivo Luria Bertani a 37 °C durante 12 horas. En todos los casos LAPS, LAPSa, LAPSb y LAPSc mostraron una inhibición significativa respecto a los controles negativos de inhibición de formación de biofilm (LB) y de inhibición de crecimiento (Gentamicina).

Cuando los valores de las DO₅₄₀ obtenidas se contrastaron con los valores obtenidos con Gentamicina (Genta=1,912 \pm 0,1270), en concentración inhibitoria mínima (CIM), todos los IFAs fueron significativamente diferentes para: (LAPS= 0,128 \pm 0,0497), (LAPSa= 0,106 \pm 0,0214), (LAPSb= 0,090 \pm 0,0149), (LAPSc= 0,085 \pm 0,0125).

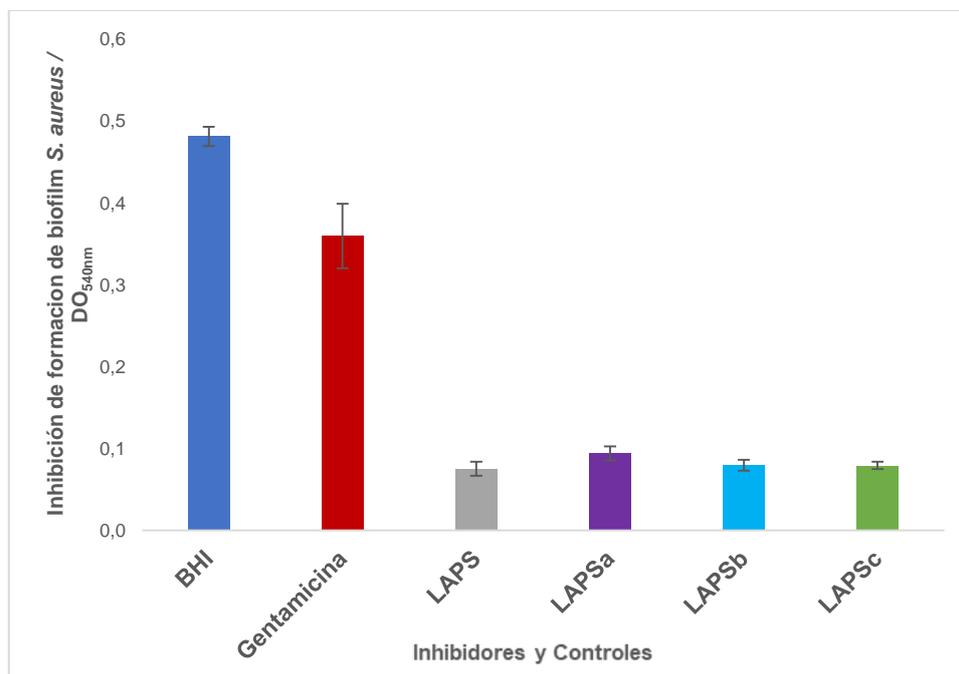


Figura 7: Inhibición de formación de biofilm de *S. aureus* ATCC 25933 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.

La **Figura 7** muestra la inhibición de formación de biofilm cuando se colocó el inhibidor (IFA) en contacto directo con el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25933 en medio de cultivo Brain Heart Infusion a 37 °C durante 12 horas. En todos los casos LAPS, LAPSa, LAPSb y LAPSc mostraron una inhibición significativa respecto a los controles tanto negativo de inhibición de formación de biofilm (BHI) y de inhibición de crecimiento (Gentamicina).

Cuando los valores de las DO₅₄₀ obtenidas se contrastaron con los valores obtenidos con Gentamicina (Genta=0,360±0,039), en concentración inhibitoria mínima (CIM), todos los IFAs fueron significativamente diferentes para: (LAPS= 0,075 ± 0,008), (LAPSa= 0,094 ± 0,008), (LAPSb= 0,080 ± 0,007), (LAPSc= 0,080 ± 0,004).

Disrupción de biofilm preformado de bacterias patógenas aisladas en mayor porcentaje en heridas crónicas infectadas

Para cuantificar el biofilm pre formado, en ausencia de los disruptores se dejó crecer a las cepas patógenas en sus medios de crecimiento normales y luego de 6 horas se agregaron los disruptores: LAPS, LAPSa, LAPSb, y LAPSc.

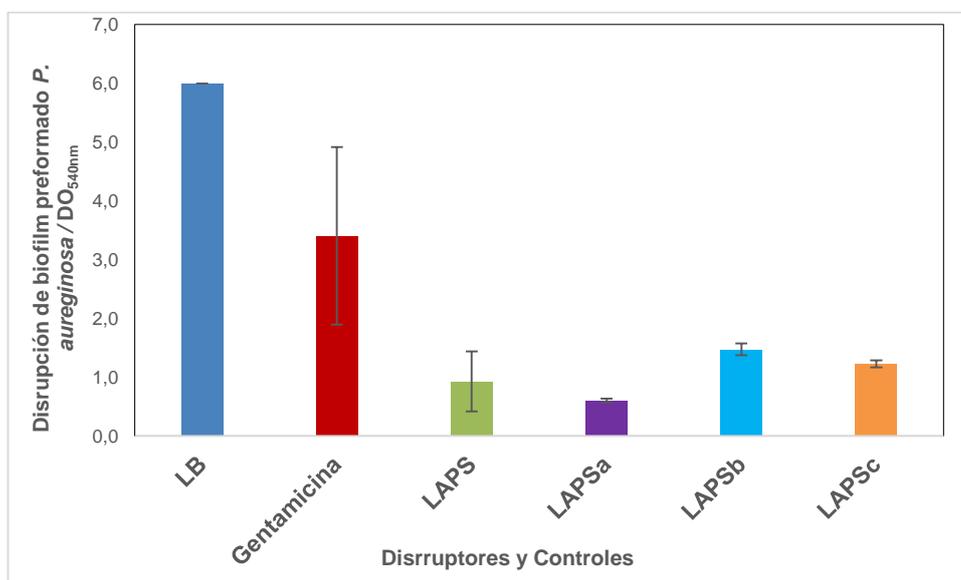


Figura 8: Disrupción de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.

Para cuantificar el biofilm pre formado, en ausencia de los disruptores se dejó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 en su medio de crecimiento normal (LB) y luego de 6 horas se agregaron los disruptores: LAPS, LAPSa, LAPSb, y LAPSc. La **Figura 8** muestra que en todos los casos los IFAS mostraron disrupción del biofilm de *P. aeruginosa* cuando se compararon las DO₅₄₀ con respecto al control positivo.

Cuando los valores de las DO₅₄₀ obtenidas se contrastaron con los valores obtenidos con Gentamicina (Genta=3,409±1,511), todos los IFAs fueron significativamente diferentes para: (LAPS= 0,929± 0,510), (LAPSa= 0,608 ± 0,030), (LAPSb= 1,475±0,099), (LAPSc=1,228±0,061).

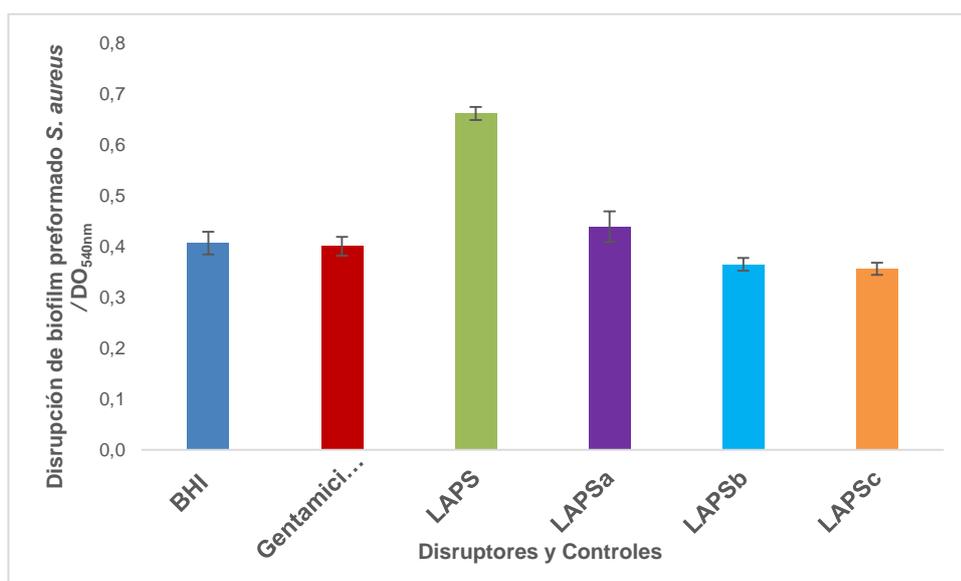


Figura 9: Disrupción de biofilm de *S. aureus* ATCC 25933 frente a los ingredientes farmacéuticos activos.

Para cuantificar el biofilm pre formado, en ausencia de los disruptores se dejó *S. aureus* ATCC 25933 en su medio de crecimiento normal (BHI) y luego de 6 horas se agregaron los disruptores: LAPS, LAPSa, LAPSb, y LAPSc. La **Figura 9** muestra la disrupción del biofilm de *S. aureus* cuando se compararon las DO₅₄₀ con respecto al control positivo. Cuando los valores de las DO₅₄₀ obtenidas se contrastaron con los valores obtenidos con Gentamicina (Genta=0,401±0,019), todos los IFAs fueron significativamente diferentes para: (LAPS= 0,662± 0,013), (LAPSa= 0,439 ± 0,030), (LAPSb= 0,365±0,012), (LAPSc=0,356±0,012).

4.2. ELABORACION DE UN MEDICAMENTO BIOLÓGICO DE USO TÓPICO PARA ELEVADO VOLUMEN DE EXUDADO.

4.2.1. Estudio de pre-formulación.

4.2.1.1. Selección de los Ingredientes farmacéuticos no activos del STT, resultante del relevamiento bibliográfico.

La selección de excipientes durante el desarrollo de un producto farmacéutico se enfoca sobre las características que se buscan en el excipiente, por ejemplo, funcionalidad, consistencia del material, aceptación por autoridades sanitarias, el

costo, su disponibilidad y su origen. Una selección imprudente tanto de excipientes, así como de los proveedores puede crear problemas que podrían conducir al fracaso del desarrollo del producto.

La aplicación de los conceptos de la calidad a través del diseño (quality by design) enfatiza la necesidad de caracterizar las propiedades de los materiales, por ejemplo, sus propiedades de tamaño y distribución del mismo, sus propiedades térmicas, químicas, reológicas y mecánicas. Sin embargo, es necesario también caracterizar su comportamiento tecnológico como materia prima y hacer explícito su desempeño en la formulación y en el proceso de manufactura.

La selección de los polímeros y sus proporciones representó el punto crítico en el diseño de las matrices y puesta a punto del procedimiento operativo estándar (POE).

Fue seleccionado combinaciones de polímeros verdes que junto a CB pudieran brindar una mejora en las características del producto terminado. CB se caracteriza por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, elevada capacidad de absorción (hasta 200 veces su peso en agua) y en este estudio se combinó con excipientes reconocidos y solventes considerados de baja o nula toxicidad, que minimizaron la generación de residuos no biodegradables a lo largo del proceso de producción.

Se cumplió con la premisa de que los polímeros empleados sean no tóxicos, no irritantes, ni presenten impurezas lixiviables. Se consideraron en el proceso, parámetros como: facilidad de adquisición y estabilidad en las combinaciones estudiadas. **Bhyan, et al., 2011.**

Tabla 16. Listado de polímeros y solventes considerados en el estudio de preformulación, nombres de fantasía y fabricante o proveedor.

IFNA/Solvente	Otras denominaciones / Nombre de fantasía	Fabricante/proveedor
Co-polímero de amonioquil metacrilato, con trimetiamonioetil como grupo funcional	Eudragit RS100 (E-RS100)	Evonik/Etilfarma S.A.
Co-polímero de metacrilato, con esteres neutros como grupo funcional	Eudragit NM30D (E-NM30D)	Evonik/Etilfarma S.A.
Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	Methocel K4M	Cicloquímica/EtilfarmaS.A.
Carboximetilcelulosa sódica	Neocel C11	Mingtai/Etilfarma S.A.
Celulosa Microcristalina (CMC)	PH 101, PH 102, PH 103; PH 105, PH112, PH 113, PH 200; PH 301, PH 302. PH 101, PH 102, PH 103; PH 105, PH112, PH 113, PH 200; PH 301, PH 302.	Celint S.A Fabriquimica S.A. Mingtai/Etilpharma S.A.
Croscarmelosa sódica (CrC)	Disolcel	Mingtai/Etilfarma S.A.
Polivinil Pirrolidona (PVP)	PVP K-30	Novalquim S.R.L.
Carbomero 940	Carbocare	Fabriquimica S.R.L.
Trietilcitrate (TEC)	-	Jungbuzlauer/Etilpharma S.A.
Polietilenglicol (PEG)	PEG400, carbowax, poliglicol	Fabriquimica
Trietanolamina (TEA)	Tris (2-hidroxi)etil amina, Trietilolamina, Trolamina	Fabriquimica
Etanol 96°	Alcohol etílico	San Iginio
Acetona	2-propanona, di metilcetona	Dorwil
Isopropanol	alcohol Isopropílico, Propan-2-ol	Biopack

4.2.1.1.1. Polímeros de matriz hidrofílica:

- **Polímeros Eudragit:** permiten formar sistemas transparentes, elásticos y autoadhesivos. **Joshi, 2013, Kathe, et al, 2017.** Los más utilizados en la elaboración de STT son E100, RS100, S100, RL100, NE30D, RS30D. **Rajabalaya, 2010, Gupta, et al, 2009.** En función de estos antecedentes y del estudio de las características funcionales de cada uno, se seleccionó el polímero: NM30D. NM30D que se presenta en forma de dispersión acuosa al 30%, no requiere plastificante. Presenta características como: flexibilidad, insolubilidad, baja permeabilidad y capacidad de hinchamiento independiente del pH.
- **Polímeros derivados de la celulosa:** se encuentra reportado el uso de hidroxipropil celulosa (HPMC) como matriz en parches y en la formación de películas transparentes. Permite la fabricación de films uniformes, de buena textura, livianos y libres de oleosidad. Es inerte y absorbe agua, proporciona lubricidad y sensación de confort durante la aplicación en la piel. Es estable en soluciones entre pH 3 y 11 y resiste hasta un 100% de etanol como solvente. **Vijaya, et al., 2015, Esuendale, et al., 2016.**

La carboxi metil celulosa (CMC) se utiliza para elaborar películas suaves y no pegajosas. Tiene propiedades absorbentes, antiadherentes y lubricantes. Es insoluble en agua, en acetona, en etanol anhidro en tolueno, en ácidos diluidos y en solución de 50 mg/L de NaOH. **Bhyan, et al., 2011.**

La carboxi metil celulosa sódica (CMCNa) se dispersa fácilmente en agua y forma soluciones coloidales, tiene elevada capacidad de hinchamiento y excelente bioadhesividad. **Karki, et al., 2016.**

Celulosa microcristalina (CMC) Es un compuesto estable a pesar de ser higroscópico. En la formulación de comprimidos por compresión directa, produce buena dureza y poca friabilidad. Presenta gran capacidad de deformación plástica, buenas propiedades de aglutinación.

4.2.1.1.2. Solventes e ingredientes auxiliares.

- **Trietilcitrate (TEC)** Actúa como agente plastificante en formas farmacéuticas de liberación controlada y en recubrimientos entéricos. Como plastificante presenta una mayor biodegradabilidad y menos efectos bioquímicos que otros plastificantes tradicionales. Ejemplos de estos nuevos productos son Monoglicéridos acetilados; utilizados como aditivos alimenticios y los citratos de alquilo, empleados en envases alimentarios, productos médicos, cosméticos y juguetes.
- **Polietilenglicol (PEG)** Los polietilenglicoles son productos de la condensación del óxido de etileno y etilenglicoles. El sufijo numérico da una indicación del peso molecular medio. El Polietilenglicol 400 (PEG-400) es, a 20 °C, un líquido no volátil, claro y transparente. Posee un bajísimo nivel de toxicidad y se incluye en numerosos preparados farmacéuticos y cosméticos actuando como espesante y estabilizante en formulaciones líquidas. Es soluble en agua y en numerosos disolventes orgánicos, tales como alcoholes, glicoles, glicoléteres, cetonas e hidrocarburos aromáticos. Solo es ligeramente soluble en hidrocarburos alifáticos y éteres.
- **Trietanolamina (TEA)** La trietanolamina actúa como una base química débil debido al par solitario de electrones en el átomo de nitrógeno.

Se presenta como un líquido viscoso, límpido, de color amarillo pálido o incoloro, poco higroscópico y volátil, totalmente soluble en agua y miscible con la mayoría de los solventes orgánicos oxigenados. Posee un olor amoniacal suave. Es una base que normalmente se obtiene por reacción de amoniólisis sobre el óxido de etileno con posterior purificación. Se usa como emulgente para la elaboración de preparados tópicos. Cuando se mezcla en proporciones equimoleculares con ácidos grasos, tales como el ácido esteárico y el oleico, forma un jabón aniónico, por lo que por lo que puede usarse como agente emulsificante, produciendo emulsiones O/W finas, estables, y con un pH de 8. Como Ingrediente Farmacéutico no Activo, se usa

como agente alcalinizante, o como agente emulsionante donde se emplea en concentraciones del 1 – 4 %.

- **Etanol 96°** se utiliza como solvente de alta polaridad, para vehicular formas farmacéuticas líquidas, que por sus afinidades químicas se solubilizan en alcohol y no en agua. También cumple con una función antiséptica siempre y cuando se incorpore en concentración de entre 70° y 50°.
- **Acetona** La Acetona es un líquido volátil, muy inflamable de olor característico, sabor dulce. Miscible en agua, alcohol, dimetilformamida, cloroformo, éter y la mayoría de aceites.
- **Isopropanol o Alcohol Isopropílico** es un disolvente latente para derivados de celulosa, agente anticongelante para combustibles líquidos, productos farmacéuticos, perfumes, cosméticos, medicinas, lacas, procesos de extracción, agente deshidratante, preservativo. En condiciones de uso normal y en su forma original, el producto no tiene ningún otro efecto negativo para la salud y el medio ambiente.

4.2.1.2. Estudio y selección del sistema de Solventes e Ingredientes Farmacéuticos no Activos.

La tendencia en la Química Verde es reemplazar los solventes no recomendados por solventes verdes, con el objetivo ideal de utilizar agua. Por esto y en función del estudio de la solubilidad, fue seleccionado el polímero Eudragit NM30D, co-polímero de metacrilato, con ésteres neutros como grupo funcional. Suma a sus requerimientos la posibilidad de prescindir de agentes plastificantes, disminuyendo costos y pasos en el proceso de producción.

Del estudio bibliográfico de pre formulación considerando los parámetros de selección de solventes verdes, se concluye que:

El grupo de polímeros Eudragit®, presenta las mejores características para el diseño de los STT. Se trata de co-polímeros derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico cuyas propiedades fisicoquímicas son determinadas por sus grupos funcionales. Se encuentran disponibles en diferentes formas físicas (dispersiones acuosas, soluciones orgánicas, gránulos y polvos). Su uso se encuentra reconocido por la USP-NF (Farmacopea de Estados Unidos), BP (Farmacopea Británica), PhEur (Farmacopea Europea) y en el Manual de excipientes farmacéuticos (Handbook of Pharmaceutical Excipients). **Kadian, et al., 2009, Patra et al., 2017.**

De los ingredientes farmacéuticos no activos estudiados como posibles matrices de soporte seleccionamos a Neocel, combinación de CMC y CMCNa. Neocel permitirá el diseño de una matriz estable, no disgregable, inerte y con bajo índice de hinchamiento.

Para generar un índice de hinchamiento controlado y de liberación continua, se combinarán en menor proporción, dos polímeros de elevado índice de hinchamiento: nanocelulosa y carbomer. Esta combinación resiste altas temperaturas, es transparente, flexible, muy fácil de modificar químicamente, se puede trabajar también en suspensión, tiene baja densidad, alta porosidad y es biocompatible. Todo eso sin generar residuos contaminantes.

Aunque presenta un comportamiento Tixotrópico, a bajas concentraciones de nanocelulosa, la viscosidad es poca. Su sensibilidad a las fuerzas cizallantes es un dato importante a considerar ya que la viscosidad se anula en la presencia de estas.

El análisis profundo de las interacciones entre los IFNAs y solventes, suma datos para optimizar el proceso de producción.

4.2.2. Desarrollo de STT de aplicación tópica para UCMI de elevado volumen de exudado.

Dadas las ventajas tecnológicas y terapéuticas enumeradas previamente, se optó por los parches transdérmicos de liberación de tipo matricial. Los STT presentan ventajas productivas como simplicidad en el proceso de fabricación, transporte y conservación. Estas características suman ventajas por tratarse de productos que no necesitan condiciones especiales de transporte y conservación, resultando en una opción económica y con gran aceptación en el ámbito tecnológico farmacéutico. **Janßen , et al 2013, Morales, et al 2011.**

Los Ingredientes Farmacéuticos No Activos (IFNA) utilizados en la producción de este tipo de matrices incluyen polímeros formadores de película, polímeros formadores de la matriz hidrofílica, potenciadores de permeación y el sistema de solventes. Un mismo polímero puede funcionar como formador de película y/o matriz y como regulador de la velocidad de liberación. **Kusum, et al 2003, Mutalik et al 2004.** El manejo de la composición polimérica permite manipular las características clave de los films, como la tasa de liberación, las propiedades muco-adhesivas y la resistencia mecánica, etc. **Karki, et al 2016.**

En contraste con los parches, los films producen menos irritación debido a que permiten el intercambio de gases y vapor de agua y no dejan sensación pegajosa en el sitio de aplicación. **Guo, et al, 2011, Trivedi, et al 2017.** Por su naturaleza hidrófila, poseen propiedades muco-adhesivas. En contacto con la superficie biológica, los films se hinchan y forman enlaces con la mucina. **Morales, et al 2011, Karki, et al,2016.**

En consonancia con la filosofía de producción más limpia y los procesos 4R, implementamos rudimentos de Química verde en el diseño de los prototipos de STT que se presentan en este trabajo, entendiendo a la Química verde como: “la utilización eficiente de materias primas (preferiblemente renovables), incluyendo los recursos energéticos, en la fabricación y empleo de productos químicos” y “el reemplazo de disolventes y reactivos tóxicos o peligrosos en la fabricación y empleo de productos químicos”. **Sheldon, 2000, Sheldon, 2017.**

La premisa de este estudio de pre-formulación es entonces, “bueno desde el diseño”. Incorporando conceptos y métodos de economía atómica, el uso de compuestos menos peligrosos, la reducción del número de pasos, el énfasis en la seguridad del producto y en su biodegradabilidad. **Clark, 2016.**

4.2.3. Estudio y selección del método de elaboración

El método de elaboración elegido fue el de evaporación de solvente. La mezcla polimérica se ubica y moldea en un sustrato adecuado, se deja secar a temperatura ambiente con corriente de aire para permitir que el solvente se evapore. Esto resulta en una película flexible que vehiculiza al medicamento. **Patel, et al, 2011, Irfan, et al, 2016.**

La **Figura 10** presenta un esquema del mejor protocolo de elaboración de los films, desde la selección de los solventes hasta el empaquetado. Simultáneamente, indica cuales son los parámetros de control de calidad a considerar en cada etapa.

Para la selección de los ingredientes farmacéuticos no activos y sus proporciones en cada formulación se utilizó el siguiente criterio.

Se seleccionó celulosa microcristalina grado coloidal (CM-Neocel) como mayoritario en la formulación por tratarse de un polímero insoluble, con baja capacidad de hinchamiento, elevada fluidez y gran capacidad de carga de IFA y por sus propiedades: diluyente, aglutinante y desintegrante.

Como polímeros hidrofílicos se utilizaron carbómeros, con elevada capacidad de hinchamiento por el entrecruzamiento de monómeros in situ, en dispersiones de pH básico. Estos polímeros de ácido acrílico reticulados son solubles en alcohol y disolventes polares. La estructura molecular de los carbómeros es rica en grupos de ácido carboxílico. Dispersadas en el agua, las moléculas de los carbómeros desarrollan cierto grado de viscosidad.

La Trietanolamina al 85% es una amina terciaria viscosa con ligero olor amoniacal. Por sus grupos funcionales amina y alcohol posee una gran versatilidad para formar sales, jabones, aminas o éster. La Trietanolamina se utiliza principalmente como un emulsionante y tensoactivo. La Trietanolamina neutraliza

los ácidos grasos, ajusta y amortigua el pH, solubiliza los aceites y otros ingredientes que no son completamente miscibles. Se utilizó en esta formulación como agente neutralizante para facilitar el entrecruzamiento del carbomer en el proceso de polimerización.

NM30D está en forma de dispersión acuosa al 30%, no requiere plastificante y es altamente flexible, es insoluble, presenta baja permeabilidad y su capacidad de hinchamiento es independiente del pH, aportando versatilidad a los STT diseñados en este trabajo, pudiendo utilizarse para todos los estados de una injuria tisular.

Para generar un índice de hinchamiento controlado y de liberación continua, se combinaron dos polímeros de elevado índice de hinchamiento: nanocelulosa y carbomer. Esta combinación, resultó en un producto transparente, flexible, químicamente modificable, se puede trabajar también en suspensión, tiene baja densidad, alta porosidad y es biocompatible.

4.2.4. Control de calidad farmacotecnológicos.

4.2.4.1. Evaluación de las propiedades tecnológicas de las STT diseñados.

La estabilidad de un medicamento está definida como la capacidad, de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil. La estabilidad depende de los factores ambientales como: temperatura, humedad y luz ambiental, así como de factores propios del producto como: propiedades físicas y químicas del IFA y de los IFNAs, forma farmacéutica, proceso de fabricación, naturaleza del sistema de cierre del envase, así como de las propiedades de los materiales de envase. Los estudios de estabilidad son una parte fundamental de todo el proceso de investigación y desarrollo, que debe hacerse previamente a un producto farmacéutico que será comercializado, con el fin de determinar el tiempo durante el cual mantiene sus especificaciones de calidad.

4.2.4.2. Características físicas de los films diseñados.

Todos los ingredientes farmacéuticos no activos compatibilizaron en las proporciones propuestas, en las proporciones establecidas, aportaron la ventaja de la versatilidad a un elevado rango de pH. Los STT diseñados en este trabajo, pueden utilizarse para todos los estados de una injuria tisular. En todos los casos, los parches mostraron las características tecnológicas esperadas para este tipo de forma farmacéutica. La dispersión acuosa al 30%, del polímero NM30D no requirió la incorporación de plastificante. Por sus características de flexibilidad, insolubilidad en agua y su capacidad de hinchamiento es independiente del pH, se mostró como el candidato ideal en este diseño.

4.2.4.3. Características Organolépticas.

La **Tabla 17** muestra las características organolépticas registradas por observación directa de los STT obtenidos.

Tabla 17: *Resultados de las características organolépticas de los STT diseñados.*

Formulación	Apariencia M/B	Flexibilidad Si/No	Burbujas Pres/Aus	Color Opaco/ Trans	Integridad Si/No	Resistencia
Bco1	M	Si	A	O	Si	Si
Bco2	M	Si	A	O	Si	Si
Bco/G	M	Si	A	O	Si	Si
LAPS₀	M	Si	A	T	Si	Si
LAPS_A	M	Si	A	T	Si	Si
LAPS_B	M	Si	A	T	Si	Si
LAPS_C	M	Si	A	T	Si	Si

Todas las formulaciones diseñadas y sus controles, fueron testeados organolépticamente en el tiempo T=0 y T=30 días.

En todos los casos, los parches mostraron las características tecnológicas esperadas para este tipo de forma farmacéutica.

4.2.4.4. Capacidad de Hinchamiento.

La capacidad de hinchamiento se contrastó entre las dos formulaciones blanco. Esto se debe a que los parámetros que se desea evaluar, tienen que ver únicamente con los excipientes utilizados.

La **Figura 10** muestra los estudios de capacidad de hinchamiento o capacidad de absorción de agua. Para este ensayo utilizamos como solvente PBS pH= 7,2 (5 mL) y parches íntegros de 2,25 cm². Se registró la capacidad de hinchamiento como aumento de peso del parche a las 4, 6, 24, y 48 h.

El índice de hinchamiento se calculó como:

$$S = (Pf - Pi) / Pi (*)$$

En donde, Pi es el peso registrado antes del hinchamiento y Pf el peso registrado al final del ensayo.

Con este ensayo también se evaluó la estabilidad de las formulaciones en medio acuoso. Cuando los STT se colocaron en el medio de hinchamiento, se verificó que los mismos permanecieran íntegros y no se desintegrarán durante la manipulación experimental.

Con el valor del índice de hinchamiento promedio dentro de las 24 horas de ensayo, se calculó el volumen de agua absorbido por un cm² de parche en 24 horas.

La diferencia de absorción entre ambas formulaciones se calculó como el valor de S promedio en 24 horas de medición calculado por centímetro cuadrado de área del parche. Obteniéndose valores de **0,8773 S/cm²** para el parche con la

formulación original y un valor promedio de $1,4219 \text{ S/cm}^2$. Además, se comprobó que la formulación diseñada con el añadido de celulosa, es capaz de retener la humedad, al menos por 24 horas luego del estudio, mientras que el parche con la formulación original se deshidrata completamente en el mismo periodo de tiempo. Esta es una característica tecnológicamente deseable ya que, al momento de retirar el parche del área injuriada, la humedad del parche facilita el desprendimiento sin dolor.

Cuando se calculó el % de retención de PBS del parche diseñado con NCB, su capacidad de retención fue superior en un **62% a la capacidad de absorción** del parche original. Se encuentra reportado en literatura que la celulosa a escala nano, producida por bacterias, es capaz de retener hasta 200 veces su peso en agua (**Karki, et al., 2016**).

2.3.1.1. Liberación *in vitro* del Ingrediente Farmacéutico Activo desde la matriz portadora.

Las medidas se tomaron considerando que la concentración original en la solución aceptora fue de 26 mg/mL.

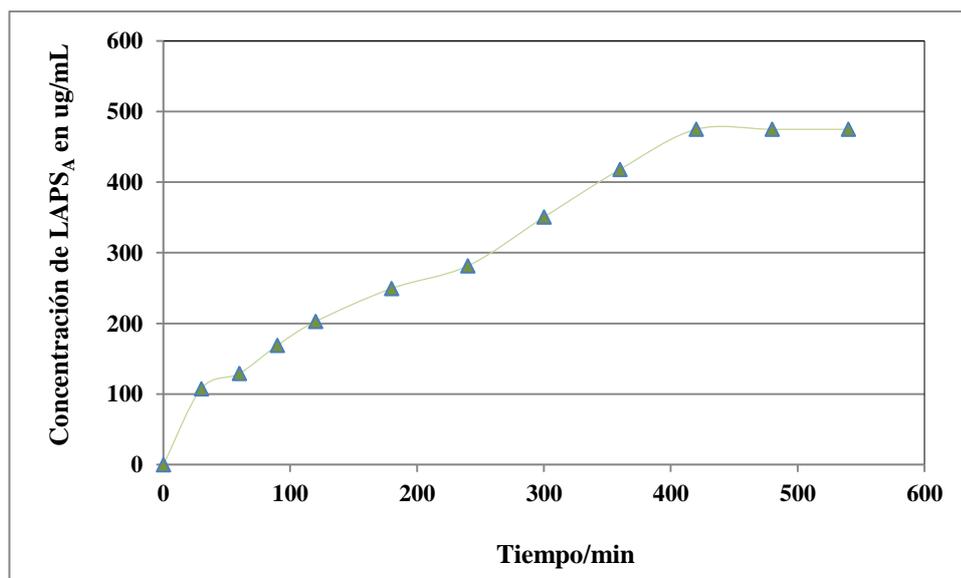


Figura 10. Muestra los estudios de capacidad de hinchamiento o capacidad de absorción de agua de LAPS_A.

Tabla 18: *Concentración de LAPS_A liberado desde la matriz portadora en función del tiempo en hora.*

Tiempo / min	Concentración LAPS_A µg/mL
0	0
30	107,675
60	129,296
90	169,161
120	202,675
180	249,567
240	281,459
300	350,378
360	418,08
420	474,702
480	474,702

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- **Para la elaboración del ingrediente activo farmacéutico.**

El proceso diseñado permitió escalar la producción de LAPS bajo las condiciones requeridas por la normativa para un Ingrediente Farmacéutico Activo estéril.

Se obtuvo un Ingrediente Farmacéutico Activo con características homogéneas, conservando las actividades antibacterianas-antipatogénicas y propiedades físicas previamente reportadas.

La escala alcanzada en condiciones de esterilidad, fue apropiada para obtener la cantidad suficiente de medicamento para realizar los estudios de pre formulación *in vitro*.

La validación del proceso de producción se verificó a partir del cumplimiento de los parámetros de calidad previamente establecidos.

La metodología de P+L implementada facilitó el proceso de producción, al identificar los Puntos críticos de control del proceso.

La planificación consciente aplicando filosofía de producción más limpia desde el planteo de este trabajo, permitió identificar los sub procesos donde se generaba residuos susceptibles de reutilización.

Como parte de esta metodología, la estrategia de aprovechamiento consistió en el diseño de nuevos medios de cultivo, con potencial de ser reingresados en la línea de elaboración de LAPS. Ampliando la oferta tecnológica, y presentando una solución sustentable al problema de los residuos.

Se demostró *in vitro* que los LAPS obtenidos a partir de los medios modificados podrían utilizarse en el tratamiento de heridas crónicas, ya que conservan las propiedades antimicrobianas y antipatogénicas reportadas para LAPS original.

- **Para la elaboración del medicamento biológico.**

La determinación de las características de funcionalidad de los ingredientes Farmacéuticos No Activos, en cualquiera de sus niveles: como partícula, como conjunto de partículas y como parte de una mezcla de partículas en una formulación, permitió a los formuladores reducir las propiedades de interés de los IFNAs a

números tangibles. Los valores específicos de sus propiedades físicas, químicas y fisicoquímicas así como tecnológicas, que identifican la funcionalidad de los materiales, permitieron establecer parámetros de seguimiento y límites de corte para utilizarlos en el proceso. Esta información permitirá controlar la calidad y la consistencia entre los diferentes lotes del material que se fabriquen.

Operativamente, una comparación inicial de la funcionalidad de los materiales, proveedores y marcas comerciales, redujo el costo del proceso de pre formulación, en horas hombre, recursos renovables y no renovables. Su inclusión como parte fundamental en el proceso de diseño permitió al formulista predecir el comportamiento de cada material, dada su funcionalidad.

Los estudios de preformulación teóricos, brindaron la información suficiente para el diseño exitoso de un STT con nanocelulosa bacteriana.

La flexibilidad para combinar los diferentes polímeros de Eudragit con nano celulosa bacteriana permite obtener el perfil de liberación deseado.

Se plantearon varios parámetros exitosos en el campo de la química verde:

Se logró mejorar la técnica de producción implementando el método de evaporación de solventes cumpliendo con las premisas de economía atómica, simplicidad del proceso y de bajo costo. Se pudo reemplazar el lecho de mercurio por un lecho inerte de silicona, mejor la mezcla de solventes reemplazando en todos los pasos por solventes verdes, se optimizó el proceso de secado que puede realizarse a temperatura ambiente, desprendiendo el sustrato sin dañarse.

La versatilidad de los polímeros seleccionados en el estudio de pre formulación, posibilita la vectorización de IFAs en amplios rangos de pH.

Debido a su alta estabilidad química, biocompatibilidad y variabilidad fisicoquímicas los STT son una alternativa interesante, novedosa y versátil para la elaboración de matrices farmacéuticas.

Los STT que se obtienen por este método presentan buenas propiedades físicas y uniformidad de espesor y peso. Los métodos de empaque primario y almacenamiento permitieron su conservación en estante por 180 días.

La incorporación de CB como polímero hidrófilo demuestra su versatilidad aun en bajas concentraciones en el desarrollo de formas de administración para fármacos. Los ensayos realizados mostraron que la presencia de CB mejora las características tecnológicas del prototipo. La utilización de nano compuestos en tecnología farmacéutica abre una plétora de posibilidades en el desarrollo de nuevas formas de administración y nuevos vectores para fármacos.

- **Producción más limpia.**

La implementación de estrategias de P+L, posibilitó la metamorfosis de los esquemas estructurales que definían las responsabilidades y actividades a desarrollar dentro del laboratorio y su relación con el entorno.

Cada una de las estrategias de P+L se diseñaron en base de las actividades, del manejo en general del laboratorio y de los usos y costumbres de BPL con las que se trabajaba en el laboratorio de Estudios Farmacéuticos y Biotecnología Farmacéutica.

Este trabajo abordó el planteo de un sistema cíclico de investigación y desarrollo, que nos permitió avanzar en la mejora continua. Su concreción demandó una modalidad circular que imprimió dinamismo, al incorporar nuevas herramientas y modelos al método científico tradicional sin descartar lo alcanzado, pero sumando más y más instrumentos para contar con un panorama global del problema y de su abordaje exitoso. **¿Porque producción más limpia?** Porque se buscó un cambio del paradigma asociado al rigor científico. Porque podemos ser rigurosos en el planteo y en el monitoreo de los ensayos, repensando nuestros usos y costumbres de una manera sustentable, ecológicamente amigable, con menos riesgos de salud asociados a la manipulación de productos químicos para el operador.

Porque creemos que el fin no justifica los medios y fundamentalmente, creemos que podemos hacerlo mejor.

5.2.Recomendaciones

- Son necesarios estudios posteriores para escalar el proceso, con miras a pruebas en humanos.
- Realizar estudios de estabilidad en condiciones naturales a largo plazo. A fin de verificar el plazo de validez del medicamento.
- La realización de estudios preclínicos y clínicos, cuya diversidad a fin de evaluar la calidad, seguridad, eficacia y propiedades inmunogénicas del medicamento desarrollado.

ANEXOS

A1. Ficha técnica del caldo MRS

brtanla[^]

REF B0221305 REF B0221306

M.R.S. Caldo

IVD

USO

Medio de cultivo apropiado para el enriquecimiento de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas a partir de muestras clínicas y alimentos (especialmente productos lácteos).

FUNDAMENTO

El Caldo M.R.S. fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe, y por su formulación permite el adecuado desarrollo de lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas

La proteosa peptona, el extracto de carne, el extracto de levadura y la glucosa constituyen la fuente nutritiva ya que aportan nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales. El monoleato de sorbitán, las sales de sodio, magnesio y manganeso proveen cofactores para el crecimiento bacteriano y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0221305: envase x 100 g.

Código B0221306: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

PROTEOSA PEPTONA N° 3	10.0
EXTRACTO DE CARNE	10.0
EXTRACTO DE LEVADURA	5.0
GLUCOSA	20.0
SORBITÁN MONOLEATO	1 ml
FOSFATO DIPOTÁSICO	2.0
ACETATO DE SODIO	5.0
CITRATO DE AMONIO	2.0
SULFATO DE MAGNESIO	0.2
SULFATO DE MANGANESO	0.05
pH FINAL: 6.5 ± 0.2	

INSTRUCCIONES

Suspender 55,25 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición

durante 1 ó 2 minutos para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige, homogéneo, no presenta libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar oscuro.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 2-8 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra

Por inoculación directa del material a analizar.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C hasta 3 días ó a 30 °C hasta 5 días.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El crecimiento microbiano se evidencia por la presencia de turbidez.

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
Lactobacillus fermentum ATCC 9338	Satisfactorio
Lactobacillus casei ATCC 393	Satisfactorio
Escherichia coli ATCC 25922	Inhibido

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

M.R.S. Caldo

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.
- No utilizar el producto si al recibirlo su envase está abierto o dañado.
- No utilizar el producto si existen signos de contaminación o deterioro, así como tampoco si ha expirado su fecha de vencimiento.
- Utilizar guantes y ropa protectora cuando se manipula el producto.
- Considerar las muestras como potencialmente infecciosas y manipularlas apropiadamente siguiendo las normas de bioseguridad establecidas por el laboratorio.

- Las características del producto pueden alterarse si no se conserva apropiadamente.
- Descartar el producto que no ha sido utilizado y los desechos del mismo según reglamentaciones vigentes.

REFERENCIAS

- De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. (1960). A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23 (1), 130.
- MacFaddin. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
- Cory, J.E.L., Curtis, G.D.W, Baird, R.M. 2003. Handbook of Culture Media for Food Microbiology, volume 37, Elsevier Science.

INDICACIONES AL CONSUMIDOR

- Utilizar el producto hasta su fecha de vencimiento.
Conservar el producto según las indicaciones del rótulo.

A2. Ficha técnica del medio LB

A3. Ficha técnica del medio BHI Britania.

Britania[▲]

REF B0214605 REF B0214606

Cerebro Corazón Infusión

IVD

USO

Medio líquido altamente nutritivo que permite el desarrollo de microorganismos con escasos requerimientos nutricionales y nutricionalmente exigentes, aerobios y anaerobios.

FUNDAMENTO

Su alto valor nutritivo está dado por la infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona que constituyen la fuente de carbono, nitrógeno, aminoácidos, péptidos y vitaminas necesarias para el desarrollo de microorganismos. En el medio de cultivo, la glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer.

Esta infusión es apropiada para ser utilizada como base en la preparación de hemocultivos debido a que pueden desarrollar todas las especies de estreptococos excepto los tiol y piridoxal dependientes.

Con el agregado de 20 UI de Penicilina y 100 µg/ml de ampicacina se logra un medio selectivo para el cultivo de hongos patógenos porque estos antimicrobianos inhiben el desarrollo de la flora bacteriana que pudiera estar presente en la muestra.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0214605: envase x 100 g.
Código B0214606: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

INFUSIÓN DE CEREBRO DE TERNERA.....	200,0
INFUSIÓN CORAZÓN VACUNO.....	250,0
PEPTONA.....	10,0
CLORURO DE SODIO.....	5,0
GLUCOSA.....	2,0
FOSFATO DISÓDICO.....	2,5
pH FINAL: 7,4 ± 0,2	

INSTRUCCIONES

Suspender 37 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición hasta disolver completamente. Distribuir en tubos o en otros recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre desilazamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro, sin precipitado.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra

Por inoculación directa de la muestra o del microorganismo en estudio.

Incubación

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18 a 24 horas. Algunos microorganismos pueden requerir hasta 7 días de incubación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Examinar los tubos para evaluar el crecimiento por turbiedad.

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
Enterococcus faecalis	
ATCC 29212	Satisfactorio
Staphylococcus aureus	
ATCC 25923	Satisfactorio
Streptococcus pyogenes	
ATCC 19615	Satisfactorio
Streptococcus pneumoniae	
ATCC 6305	Satisfactorio
Streptococcus pneumoniae	
ATCC 49619	Satisfactorio
Candida albicans	
ATCC 10231	Satisfactorio

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

HOJA 1 DE 2

A4. Composición de Solución Fisiológica al 0,9%.

Componentes	Cantidad para tinciones con Cristal Violeta	Cantidad para ensayos de inhibición y disrupción (*)
NaCl	2,25 g	1,35 g
Agua destilada	250 mL	150 mL

(*)Fue autoclavada por 8 minutos.

A5. Protocolo de Producción de LAPS.

A5.1. Activación de la cepa de *L. plantarum*

1. Tomar 10 μ L del cultivo de estante y sembrar en un tubo de 10 mL con MRS. Trabajar por duplicado. Rotular cada tubo con fecha, cultivo y numero de tubo.
2. Incubar a 37 °C durante 8 horas.

Nota: si se parte de una cepa refrigerada, realizar la inactivación de la cepa dos veces consecutivas.

3. Medir la DO a 600nm del cultivo iniciador, debe alcanzar $DO_{600}=0,1$. De ser necesario realizar una dilución en MRS caldo (aprox. 1:20, 500 μ L de cultivo en 9,5 mL MRS caldo).
4. Registrar todas las observaciones en el cuaderno o planilla correspondiente.

A5.2. Preparación del cultivo principal u overnight.

1. Medir el pH del MRS caldo antes de realizar la siembra. Registrar.
2. Replicar 1000 μ L del cultivo de activación aprobado en 1L de MRS.
3. Incubar a 37 °C durante 12 horas.
4. Colocar el cultivo en tubos falcón, de manera que cada una de ellas contenga la misma cantidad. Trabajar en condiciones de esterilidad. El cultivo no debe superar el 70 % de la capacidad de los mismos.
5. Introducir los tubos en la centrifuga. Centrifugar a 8000 rpm, durante 10
6. – 12 minutos.
7. Retirar los tubos y trasladarlos cuidadosamente.

8. Transferir en condiciones de esterilidad el sobrenadante a los envases limpios antes de realizar la filtración.

Nota: En caso de resuspensión de masa celular, centrifugar el cultivo por segunda vez.

9. Ensamblar el equipo en condiciones de esterilidad. El filtro de membrana se ubicará con la cara cuadrícula hacia arriba (en el caso de membranas para cuantificación de UFC o el lado brillante hacia arriba, en el caso de membranas filtrantes). Colocar la membrana con el papel protector en contacto con el filtro poroso.

10. Verter cuidadosamente el contenido de los envases del punto 6 en el embudo. No verter el contenido directamente desde el tubo falcon.

11. Encender la bomba de vacío.

12. Una vez finalizada la filtración, desconectar la tubulada lateral de la trampa y trasladar el equipo completo (kitasato + adaptador del prefiltro + embudo + pinza) a la cabina.

13. Retirar la pinza, el embudo y el adaptador con el prefiltro cuidadosamente. Ubicarlos fuera de la cabina en canasta para lavado.

14. Trasvasar el sobrenadante filtrado a los envases de vidrio esterilizados para tal fin. Rotular.

Producto	N° de Lote	N° de frasco	Fecha	Responsable de ejecución
LAPS	Xxxx	xxxx	dd-mm-aa	Nombre y Apellido

15. Separar las contramuestras correspondientes. Medir el pH y registrar.

3. BIBLIOGRAFIA

- Achouri, D., Alhanout, K., Piccerelle, P., & Andrieu, V. (2013). Recent advances in ocular drug delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 39(11), 1599-1617.
- Agale, S. V., 2013. Chronic leg ulcers: epidemiology, aetiopathogenesis, and management.. *Ulcers*, Volumen 2013.
- Akhmetova, A. y otros, 2016. A comprehensive review of topical odor-controlling treatment options for chronic wounds. *Journal of Wound, Ostomy, and Continence Nursing*, 43(6), p. 598.
- Alexander, S. J., 2013. Time to get serious about assessing—and managing—psychosocial issues associated with chronic wounds. *Current opinion in supportive and palliative care*, 7(1), pp. 95-100.
- Bhyan, B., Jangra, S., Kaur, M., & Singh, H. (2011). Orally fast dissolving films: innovations in formulation and technology. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 9(2), 9-15.
- Bjarnsholt, T. y otros, 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*, 151(2), pp. 373-383.
- Bjarnsholt, T. et al., 2008. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound repair and regeneration*, 16(1), pp. 2-10.
- Brain, K. R., Walters, K. A. & Watkinson, A. C., 2002. Methods for studying percutaneous absorption. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, Volumen 119, pp. 197-270.

- Cabeza Mora A, López Cabañas A, Díaz Berenguer JA. Evolución de los Estudios de Utilización de Medicamentos: del consumo a la calidad de la prescripción. Cuadernos Económicos ICE. 2003; (67):162-89.
- Cabrera, C. A. et al., 2016. Novel topical formulation for ischemic chronic wounds. Technological design, quality control and safety evaluation. *Pharmaceutical development and technology*, 21(4), pp. 399-404.
- Cabrera, et al., 2019. Desarrollo Tecnológico de formas galénicas tópicas para vehicular Ingredientes Farmacéuticos Activos de Origen Biológico.
- Clark, J. H., 2016. Green and Sustainable Chemistry: An Introduction. In: L. Summerton, H. F. Sneddon, L. C. Jones & J. H. Clark, eds. *Green and Sustainable Medicinal Chemistry: Methods, Tools and Strategies for the 21st Century Pharmaceutical Industry*. s.l.: Royal Society of Chemistry, pp. 1-11.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2000;24:1250–1319.
- Da Silva, P. N., de Almeida, O. A. E. & Rocha, I. C., 2014. Terapia tópica en el tratamiento de las heridas crónicas. *Enfermería Global*, 13(33), pp. 33-45.
- Delavary, B. M. y otros, 2011. Macrophages in skin injury and repair. *Immunobiology*, 216(7), pp. 753-762.
- Demirdjian G. Manejo de Infección en Quemaduras. GAP. Hospital de Pediatría “Juan P. Garrahan”; 2010. 10.
- dos Santos, A. A. R., de Almeida Medeiros, A. B., Soares, M. J. G. O. & Costa, M. M. L., 2010. NURSING STUDENTS’ KNOWLEDGE OF WOUND EVALUATION AND TREATMENT.. *Rev. enferm. UERJ*, 18(4), pp. 547-552.

- Edmonds, M., 2006. Diabetic foot ulcers: practical treatment recommendations. *Drugs*, 66(7), pp. 913-930.
- Esuendale, D., & Gabriel, T. (2016). Cellulosic on Transdermal Drug Delivery System: A Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 6(5), 57-64.
- Dhivya, S., Padma, V. V. & Santhini, E., 2015. Wound dressings—a review. *BioMedicine*, 5(4).
- Farmacopea Europea 6ª edición, 2008; Farmacopea Europea 6ª edición, 2008. Estrasburgo: Dirección de Calidad de Medicamentos del Consejo de Europa.
- Fazli, M. y otros, 2009. Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds. *Journal of clinical microbiology*, 47(12), pp. 4084-4089.
- Flemming, H. C. & Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, Volumen 8, p. 623– 633.
- Frykberg, R. G. & Banks, J., 2015. Challenges in the treatment of chronic wounds. *Advances in wound care*, 4(9), pp. 560-582.
- Gandini A, Lacerda TM. From monomers to polymers from renewable resources: Recent advances. *Progress in Polymer Science*. 2015;48:1–39.
- Garala, K. C., Shinde, A. J., & Shah, P. H. (2009). Formulation and in-vitro characterization of monolithic matrix transdermal systems using HPMC/Eudragit S 100 polymer blends. *International Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 1(1), 108-120.

- Gjødtsbøl, K. C. J. J. y otros, 2006. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International wound journal*, 3(3), pp. 225-231.
- Gontcharova, V. y otros, 2010. A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. *The open microbiology journal*, 4(8).
- González E, Cerusico N, Moreno J, Sesto M, 2018. Bacterial nano cellulose as non-active pharmaceutical ingredient. *Advances and perspectives. MOJ Drug Des Develop Ther.* 2018;2(6):230-233. DOI: 10.15406/mojddt.2018.02.00067
- Green, J., Jester, R., McKinley, R. & Pooler, A., 2014. The impact of chronic venous leg ulcers: a systematic review. *Journal of wound care*, 23(12), pp. 601-612.
- Guo, R., Du, X., Zhang, R., Deng, L., Dong, A., & Zhang, J. (2011). Bioadhesive film formed from a novel organic–inorganic hybrid gel for transdermal drug delivery system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 79(3), 574-583.
- Guo, S. A. & Di Pietro, L. A., 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*, 89(3), pp. 219-229.
- Gupta, J. R. D., Irchiaya, R., Garud, N., Tripathi, P., Dubey, P., & Patel, J. R. (2009). Formulation and evaluation of matrix type transdermal patches of Glibenclamide. *Int J Pharm Sci Drug Res*, 1(1), 46-50.
- Holban, A. M. C. M. C. y otros, 2013. Virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital-acquired infections occurred in patients with underlying cardiovascular disease. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(6), p. 8843.

- Ibarz, M. Introducción a los Productos Biológicos y Biotecnológicos. Curso Regulación Sanitaria de Biológicos y Biotecnológicos. Campus de Salud Pública. OPS.2017.
- ICH. Guideline Pharmaceutical Development. Q8(R2). August 2009 http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/05/WC500127803.pdf
- Irfan, M., Rabel, S., Bukhtar, Q., Qadir, M. I., Jabeen, F., & Khan, A. (2016). Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 537-546.
- Janßen, E. M., Schliephacke, R., Breitenbach, A., & Breitreutz, J. (2013). Drug-printing by flexographic printing technology—A new manufacturing process for orodispersible films. *International journal of pharmaceutics*, 441(1-2), 818-825.
- Järbrink, K. y otros, 2016. Prevalence and incidence of chronic wounds and related complications: a protocol for a systematic review. *Systematic reviews*, 5(1), p. 152.
- Joshi, M. 2013. Role of eudragit in targeted drug delivery. *Int J Curr Pharm Res*, 5(2), 58-62.
- Jurado Gámez, H., Orbes Villacorte, A. E., & Mesias Pantoja, Laura N. (2017). Evaluación in vivo de *Lactobacillus plantarum* con características probióticas mediante química sanguínea, inmunohistoquímica y microscopía electrónica en *Cavia porcellus*. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 15(2), 11-21. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(15\)11-21](https://doi.org/10.18684/BSAA(15)11-21)
- Kadian, S. S., & Harikumar, S. L. (2009). Eudragit and its pharmaceutical significance. *Eudragit Pharm. Signif.*

- Kalan, L. y otros, 2016. Redefining the chronic-wound microbiome: fungal communities are prevalent, dynamic, and associated with delayed healing. *MBio*, 7(5), pp. e01058-16.
- Kamm B, Gruber PR, Kamm M. Biorefineries–industrial processes and products. *Ullmann’s encyclopedia of industrial chemistry*. 2007.
- Kamoun, E. A., Kenawy, E. R. S. & Chen, X., 2017. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *Journal of advanced research*, 8(3), pp. 217-233.
- Kargarzadeh H, Marian M, Gopakumar D, et al. Advances in cellulose nanomaterials. *Cellulose*. 2018;1–39.
- Karki, S., Kim, H., Na, S. J., Shin, D., Jo, K., & Lee, J. (2016). Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 11(5), 559-574.
- Kavitha, K. & Rajendra, M. M., 2011. Design and evaluation of transdermal films of lornoxicam.. *International Journal of Pharma and Bio Sciences.*, 2(2), pp. 54-62.
- Kathe, K., & Kathpalia, H. 2017. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian journal of pharmaceutical sciences*, 12(6), 487-497.
- Klemm D, Heublein B, Fink HP, et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005;44(22):3358–3393.
- Klemm D, Cranston ED, Fischer D, et al. Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today’s state. *Materials Today*. 2018;21(7):720–748.

- Kokabi, M., Sirousazar, M. & Hassan, Z. M., 2007. PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European polymer journal*, 43(3), pp. 773-781.
- Kolar, S. L. y otros, 2013. Extracellular proteases are key mediators of *S taphylococcus aureus* virulence via the global modulation of virulence-determinant stability. *Microbiologyopen*, 2(1), pp. 18-34.
- Kusum Devi, V., Saisivam, S., Maria, G. R., & Deepti, P. U. (2003). Design and evaluation of matrix diffusion controlled transdermal patches of verapamil hydrochloride. *Drug development and industrial pharmacy*, 29(5), 495-503.
- Leaper, D. J. y otros, 2012. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years?. *International wound journal*, Volumen 9, pp. 1-19.
- Ligresti, C. & Bo, F., 2007. Wound bed preparation of difficult wounds: an evolution of the principles of TIME. *International wound journal*, 4(1), pp. 21-29.
- Lindon, S. et al., 2016. Biotechnological design to optimize the production of bioactive *Lactobacillus plantarum* by-products: novel chronic wound treatment. *Int J of Pharm Sci and Rev*, Volume 7.
- Liu, Y., Fang, L., Zheng, H., Zhao, L., Ge, X., & He, Z. (2007). Development and in vitro evaluation of a topical use patch containing diclofenac diethanolamine salt. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 106-113.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J., 2004. Relaciones Hospedador –Parásito en Humanos. Brock. Biología de los Microorganismos. Decima edición ed. Madrid: Pearson Educacion, S. A..
- Malic, S. y otros, 2009. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology*, 155(8), pp. 2603-2611.
- Mediavilla A, Flórez J, García-Lobo JM. Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociaciones de antibióticos. En: Flórez J. Farmacología humana. 3a ed. Barcelona: Masson Multimedia; 1997.
- Mihai, M. M. y otros, 2014. Identification and phenotypic characterization of the most frequent bacterial etiologies in chronic skin ulcers. *Rom J Morphol Embryol*, 55(4), pp. 1401-1408.
- Mihai, M. M. y otros, 2015. Microbial biofilms: impact on the pathogenesis of periodontitis, cystic fibrosis, chronic wounds and medical device-related infections. *Current topics in medicinal chemistry*, 15(16), pp. 1552-1576.
- Morales, J. O., & McConville, J. T. (2011). Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(2), 187-199.
- Morton, L. M. & Phillips, T. J., 2016. Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 74(4), pp. 589-605.

- Mutalik, S., & Udupa, N. (2004). Glibenclamide transdermal patches: physicochemical, pharmacodynamic, and pharmacokinetic evaluations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 93(6), 1577-1594.
- Oliveira, B., J.B.A., C. & Granjeiro, J., 2013. Panorama epidemiológico e clínico de pacientes com feridas crônicas tratados em ambulatório. *Rev. enferm. UERJ*, 21(1), pp. 612-617.
- Patel, V. F., Liu, F., & Brown, M. B. (2011). Advances in oral transmucosal drug delivery. *Journal of controlled release*, 153(2), 106-116.
- Patra, C. N., Priya, R., Swain, S., Jena, G. K., Panigrahi, K. C., & Ghose, D. (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 33-45.
- Peral, M. C., Huaman Martinez, M. A. & Valdez, J. C., 2009. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. *International Wound Journal*, 6(1), pp. 73-81.
- Peral, M. C. et al., 2010. Interleukin-8 production by polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic infected leg ulcers treated with *Lactobacillus plantarum*. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(3), pp. 281-286.
- Percival, S. L., McCarty, S., Hunt, J. A. & Woods, E. J., 2014. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound Repair and Regeneration*, 22(2), pp. 174-186.
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C. & Donelli, G., 2015. Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology*, 64(4), pp. 323-334.

- Pillai, S. S., Kumar, K. S., Panneerselvam, T., Shabaraya, A. R., & Muneer, T. K. (2011). Effect of polymeric activity on transdermal patches of Glipizide. *Research in Pharmacy*, 1(2).
- Pillai, S. S. et al., 2015. Effect of polymeric activity on transdermal patches of Glipizide.. *Research in Pharmacy.*, 1(2).
- Rajabalaya, R. 2010. Studies on effect of plasticizer on in-vitro release and ex-vivo permeation from eudragit e100 based chlorpheniramine maleate matrix type transdermal delivery system. *Journal of Excipients and Food Chemicals*, 1(2), 3-12.
- Rajan, R., Sheba Rani, N. D., Kajal, G., Sanjoy Kumar, D., Jasmina, K., & Arunabha, N. 2010. Design and in vitro evaluation of chlorpheniramine maleate from different eudragit based matrix patches: Effect of plasticizer and chemical enhancers.
- Ramos, A. y otros, 2015. Curar o paliar: ¿qué cuesta más? Análisis de costes del tratamiento de una herida crónica en función de su finalidad. *Medicina Paliativa*, 22(2), pp. 45-51.
- Ramos, A. N. et al., 2015. Compounds from *Lactobacillus plantarum* culture supernatants with potential pro-healing and anti-pathogenic properties in skin chronic wounds. *Pharmaceutical biology*, 53(3), pp. 350-358.
- Ramos, A. N. et al., 2012a. Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa*: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(4), pp. 552-562.
- Ramos, A. N. et al., 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Pseudomonas aeruginosa* culture supernatants on polymorphonuclear damage

and inflammatory response. *International immunopharmacology*, 10(2), pp. 247-251.

- Rasmussen, T. y otros, 2005b. Screening for quorum sensing inhibitors using a novel genetic system the QSI selector. *J Bacteriol*, Volumen 187, pp. 1799-1814.
- Rasmussen, T. y otros, 2005a. Identity and effects of quorum sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiolog*, Volumen 151, pp. 1325-1340.
- Rhoads, D. D. y otros, 2012. Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. *BMC infectious diseases*, 12(1), p. 321.
- Real Farmacopea Española 3ª edición., 2005. s.l.:Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad. España.
- Rhoads, D. D. y otros, 2012. Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. *BMC infectious diseases*, 12(1), p. 321.
- Salleras Sanmartí L. Tecnologías de producción. *Inves. Pract.* 2002; 1:29-33.
- Sánchez, R., Damas, R., Domínguez, P., Cerezo, P., Salcedo, I., Aguzzi, C., & Viseras, C. (2010). Uso de la Hidroxi Propil MetilCelulosa (HPMC) en liberación modificada de fármacos. *Farmaespaña Ind*, 48-51.
- Serra, R. y otros, 2015. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert review of anti-infective therapy*, 13(5), pp. 605-613.

- Sesto Cabral, M. E. et al., 2015a. Formulation and quality control of semi-solid containing harmless bacteria by-products: chronic wounds pro-healing activity. *Pharmaceutical development and technology*, 20(8), pp. 911-918.
- Schaefer, U. F. y otros, 2008. Models for skin absorption and skin toxicity testing. En: *In Drug absorption studies*. Boston, MA.: Springer, pp. 3-33.
- Schaper, N. C., Apelqvist, J. & Bakker, K., 2003. The international consensus and practical guidelines on the management and prevention of the diabetic foot. *Current diabetes reports*, 3(6), pp. 475-479.
- Schultz, G., Mozingo, D., Romanelli, M. & Claxton, K., 2005. Wound healing and TIME; new concepts and scientific applications. *Wound repair and regeneration*, Volumen 13, pp. S1-S11
- Sheldon, R. A. (2017). Metrics of green chemistry and sustainability: past, present, and future. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(1), 32-48.
- Sheldon, R. A. (2000). Atom utilization, E factors and the catalytic solution. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series IIC-Chemistry*, 3(7), 541-551.
- Singer, A. J. & Clark, R. A., 1999. Cutaneous wound healing. *New England journal of medicine*, 341(10), pp. 738-746.
- Singh, S., Neelam, S. A., & Singla, Y. P. (2015). An overview of multifaceted significance of eudragit polymers in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 8(5), 1-6.
- Thakral, S., Thakral, N. K., & Majumdar, D. K. (2013). Eudragit®: a technology evaluation. *Expert opinion on drug delivery*, 10(1), 131-149.

- To, E. y otros, 2016. The effectiveness of topical polyhexamethylene biguanide (PHMB) agents for the treatment of chronic wounds: a systematic review. *Surg Technol Int*, Volumen 29, pp. 45-51. 110
- Trache D. Nanocellulose as a promising sustainable material for biomedical applications. *AIMS Materials Science*. 2018;5(2): 201–205.
- Trivedi, R. V., Borkar, J. H., Taksande, J. B., Awandekar, N. B., Wadher, K. J., & Umekar, M. J. (2017). Development and characterization of stomach specific mucoadhesive drug de-livery system of Baclofen. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 608-615.
- Troche M, Maidana de Larrosa G, Lugo G, Vera Z, Samaniego L. Utilización de antibióticos en el Centro Nacional del Quemado, Paraguay. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 2017; 15(2): 97-103.
- Ullah H, Santos HA, Khan T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. *Cellulose*. 2016;23(4):2291–2314.
- Upton, D., Hender, C. & Solowiej, K., 2012. Mood disorders in patients with acute and chronic wounds: a health professional perspective. *Journal of wound care*, 21(1), pp. 42-48.
- USP 32, 2009. Unites States Pharmacopoeia 31 and National Formulary 27. Rockville: Pharmacopoeial Convention.
- Vijaya, R. et al., (2015). Study of the hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) combinations in the development of transdermal film for amitriptyline HCl and their in-vitro characterization. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 5(3).

- WHO. Regulation and Licensing of biological products in countries with newly developing regulatory authorities. Technical Report Series N° 858, 1995 Annex1.
- World Health Organization WHO. Guidelines to assure the quality, safety and efficacy TRS941, Annex3. <http://www.who.int/entity/biologicals/publications/trs/areas/vaccines/rotavirus/Annex%203%20rotavirus%20vaccines.pdf?ua=1>
- ZAPATA, Sandra; MUÑOZ, Juliana; RUIZ, Orlando S; MONTOYA, Olga I; GUTIÉRREZ, Pablo A AISLAMIENTO DE *Lactobacillus plantarum* LPBM10 Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE SU BACTERIOCINA Vitae, vol. 16, núm. 1, enero, 2009, pp. 75-82 Universidad de Antioquia Medellín, Colombia.