

FORMULACIÓN DE SALES DE REHIDRATACIÓN LIPOSOMAL

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo tecnológico de las sales de rehidratación de administración oral mejoradas. En particular se refiere a las sales de rehidratación oral liposomales.

Estado de la técnica

No es abundante en la literatura las referencias de sales de rehidratación oral en forma de liposomas. Existen intentos de desarrollar productos de este tipo aislados que no han prosperado.

Cabe mencionar la solicitud de patente US20050008685, abandonada, que describe el uso de liposomas para la elaboración de sales de rehidratación oral, sin embargo logra una relación de inclusión porcentual de sales (sales retenidas dentro de dichos liposomas/sales totales) del 25 %, lo que a pesar de mejorar la palatabilidad sigue provocando rechazos en el paciente o consumidor.

Por otra parte existen reportes de los beneficios de la administración de sales de rehidratación liposomales, tales como la publicación: "Absorption of Water and Electrolytes from a Liposomal Oral Rehydration Solution: An in vivo Perfusion Study of Rat Small Intestine" de P.K. Bardhan, A.S.M. Hamidur Rahman, Rifaat, and D.A. Sack - ICDDR,B: Centre for Health and Population Research, GPO Box 128, Dhaka 1000, Bangladesh, publicado en diciembre del 2003. En este documento se hace referencia a la mejora en la palatabilidad y a un mecanismo de absorción mejorado de las sales de rehidratación por la presencia de los liposomas.

La presente invención provee de una formulación mejorada de liposomas que retienen en su interior más de un 40 % de las sales totales, preferentemente más del 50%, más preferentemente al menos el 52 %, más preferentemente aún más del 56%, lo que provoca un efecto técnico que soluciona el mayor problema que presentan, en la actualidad, las sales de rehidratación oral que consiste en el rechazo de aquél que debe consumirlas.

Por otra parte la presente invención provee de un novedoso proceso de elaboración de formulaciones de sales de rehidratación oral, que haciendo uso de la ultrafiltración tangencial

permite obtener índices de retención de sales dentro de los liposomas nunca antes denunciados en la literatura. Estos índices permiten obtener una formulación de sales de rehidratación oral agradable y prácticamente sin generar rechazos por palatabilidad. Por otra parte, y también debido a la elevada inclusión de sales dentro de los liposomas es que se logra una rápida incorporación de las sales al organismo, sin la necesidad de altas concentraciones de glucosa en la formulación.

La concentración de sales recomendada por la OMS para sales de rehidratación es la siguiente:

Función	Componente	SRO		Concentración en mmol/L				
		g/L	Glucosa	Na+	K+	Cl-	Cit3-	
Sales de Rehidratación	Cloruro de Sodio	2,6		44,5		44,5		
	Cloruro de Potasio	1,5			20,1			
	Citrato de Sodio	2,9		29,6			9,9	
Endulzante	Glucosa	13,5	74,9					

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Se observan imágenes de TEM (Transmission electron microscopy) de una muestra los liposomas de la invención luego de la etapa final del proceso de elaboración.

Figura 2. Se presenta una distribución de diámetro de los liposomas de la formulación de la presente invención. Donde se aprecia la distribución de tamaños de partículas en un análisis de DLS (Dynamic Light Scattering).

Figura 3. Curva de calibrado para la medición de turbidez.

Figura 4. Representa la evolución de masa corporal de los animales machos del ejemplo 9

Figura 5. Representa la evolución de masa corporal de los animales hembras del ejemplo 9

Figura 6. Representa la evolución de la concentración de hematocritos de los animales machos del ejemplo 9

Figura 7. Representa la evolución de la concentración de hematocritos de los animales hembras del ejemplo 9

Figura 8. Representa la evolución de la concentración de Natremia (mmol/L) de los animales machos del ejemplo 9

Figura 9. Representa la evolución de la concentración de Natremia (mmol/L) de los animales hembras del ejemplo 9

Figura 10. Representa la evolución de la concentración de Kalemia (mmol/L) de los animales machos del ejemplo 9

Figura 11. Representa la evolución de la concentración de Kalemia (mmol/L) de los animales hembras del ejemplo 9

Breve descripción de la Invención

La formulación de sales de rehidratación liposomal, objeto de la presente invención, comprende fosfolípidos que pueden ser seleccionados entre: fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidilserinas (PSs), fosfatidiletanolaminas (PEs), fosfatidilgliceroles (PGs), fosfatidilinositoles (PIs), ácidos fosfatídicos (PAs) y sus mezclas, en una concentración de entre 1 y 60 g/l, preferentemente 50 g/l; y opcionalmente un antioxidante seleccionado entre fitosterol, tocoferol y sus mezclas en una concentración de entre el 0,2 y 0,5 % (P/V); agua; sales seleccionadas del conjunto comprendido por cloruro de sodio en una concentración de entre 0,7 y 2,8 g/l, preferentemente entre 2,3 y 2,8 g/l; citrato de potasio de entre 0,8 y 2,5 g/l, preferentemente entre 1,8 y 2,5 g/l; citrato de sodio en una concentración de entre 0,5 y 2,9 g/l, preferentemente entre 2,1 y 2,6 g/l; y sus mezclas; opcionalmente puede comprender además hidratos de carbono. Esta formulación de la invención comprende una relación de inclusión porcentual de sales (sales retenidas dentro de liposomas/sales totales) de al menos 40%, preferentemente al menos 50%, más preferentemente al menos 52%, y más preferentemente aún al menos 56 %. En una alternativa preferida de la presente invención dicha relación de inclusión porcentual es de 56 %. Donde dichos hidratos de carbono en una concentración de hasta 30 g/l, preferentemente hasta 6 g/l y son seleccionados del conjunto comprendido por glucosa, fructosa, dextrosa, jarabe de maíz de alta fructosa, miel, y sus mezclas, preferentemente glucosa. Además la formulación de la presente invención comprende una osmolaridad menor a 190 mmol/L.

Además los liposomas de la formulación de la invención se elaboran de un diámetro de partícula de entre 200 y 500 nm; preferentemente entre 225 y 450 nm.

La formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención es una infusión de administración oral para el reemplazo oral de fluidos y sales electrolíticas en el tratamiento de la deshidratación causada por la diarrea y vómitos, para prevenir la deshidratación severa, y mantener líquidos y electrolitos corporales. La presente invención además puede ser una infusión de administración oral de uso en actividades deportivas.

La formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención, en una forma preferida de realización comprende además: Stevia en concentración de entre 0,1 y 0,2 g/l; sacarosa en concentración de entre 20 y 50 g/l; ácido cítrico en una concentración de entre 3 y 4 g/l y saborizantes naturales en una concentración de entre 1 y 2 g/l y es una formulación para rehidratación infantil.

La formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención, en otra forma preferida de realización comprende además: sucralosa en una concentración de entre 0,1 y 1,5 g/l; Jarabe de Maíz de Alta Fructosa 55° Brix en una concentración de entre 20 y 50 g/l; ácido cítrico en una concentración de entre 3 y 5 g/l y saborizantes naturales en una concentración de entre 1 y 2 g/l; y comprende una fórmula pediátrica para deshidrataciones hipotónicas agudas.

La formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención, en otra forma preferida de realización comprende además: Stevia en una concentración de entre 0,1 y 0,2 g/l; sacarosa en una concentración de entre 20 y 25 g/l; ácido cítrico en concentración entre 3 y 4 g/l y saborizantes naturales en una concentración de entre 1 y 2 g/l; y comprende una formulación para rehidratación en actividades deportivas

El proceso de elaboración, de la formulación de la invención comprende los siguientes pasos:

a. se prepara una fase acuosa (FA) o buffer que comprende cloruro de sodio, citrato de potasio, citrato de sodio disueltos en agua destilada;

b. por separado se prepara una fase etanólica (FE), disolviendo fosfolípido seleccionado del conjunto comprendido por fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidilserinas (PSs), fosfatidiletanolaminas (PEs), fosfatidilglicerol (PGs), fosfatidilinositoles (PIs), ácidos fosfatídicos (PAs) y sus mezclas, en una concentración de entre 0,1 y 6 % (P/V), preferentemente entre 2,5 y 5 % (P/P); y dicho antioxidante en una concentración de entre 0,2 y 0,5 % (P/V), en alcohol, preferentemente etílico;

c. se induce la formación de liposomas mediante la inyección de dicha FE en dicha FA a temperatura ambiente, mientras se mantiene en agitación,

d. la solución liposomal obtenida en el paso "c" se somete a proceso de concentración por ultrafiltración tangencial (UFT), eliminando buffer conservando liposomas y lo que contienen en su interior, se reduce el volumen al menos 10 veces,

e. la solución liposomal obtenida en el paso "d" se somete a proceso de concentración por ultrafiltración tangencial (UFT), en el que se elimina el etanol y se reemplaza el buffer por una solución salina, conservando los liposomas y lo que contienen en su interior.

Donde en el paso "a" dicha fase acuosa (FA) o buffer comprende cloruro de sodio en una concentración de entre 6 y 20 mmol/l, preferentemente entre 15 y 20 mmol/l.; citrato de potasio entre 1 y 7 mmol/l, preferentemente entre 2 y 7 mmol/l.; citrato de sodio entre 2 y 5 mmol/l, preferentemente entre 3 y 5 mmol/l y agua destilada.

El proceso de la presente invención en el paso "e" dicha solución salina comprende una concentración de sodio entre 12 y 50 mmol/l, preferentemente entre 20 y 50 mmol/l.; potasio entre 3 y 14 mmol/l, preferentemente entre 5 y 14 mmol/l.; cloruro entre 5 y 40 mmol/l, preferentemente entre 15 y 40 mmol/l.; citrato entre 3 y 10 mmol/l, preferentemente entre 5 y 10 mmol/l y comprende además glucosa entre 17 y 45 mmol/l, preferentemente entre 35 y 45 mmol/l.

Además la proporción volumétrica entre las fases en el paso "c" FA:FE, es de al menos 10:3, preferentemente al menos 10:1; preferentemente al menos 10:0,5; más preferentemente al menos 10:0,4.

Dicho proceso de la presente invención comprende un proceso de flujo perpendicular, donde se agrega la Fase Etanólica sobre la Fase Acuosa a través de un acople perpendicular al flujo de la primera, y con una relación de velocidades lineales, VFE/VFA, no mayor a 1/200.

Otro objeto de la invención es el uso de la formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención que comprende la administración oral a humanos que padecen de deshidratación causada por la diarrea y vómitos.

Otro objeto de la presente invención es su uso para el consumo humano para prevenir la deshidratación severa, y mantener líquidos y electrolitos corporales.

Descripción detallada de la invención

La formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención contiene liposomas de fosfolípidos, preferentemente seleccionados del conjunto comprendido por fosfatidilcolinas (PCs), fosfatidilserinas (PSs), fosfatidiletanolaminas (PEs), fosfatidilgliceroles (PGs), fosfatidilinositoles (PIs), ácidos fosfatídicos (PAs) y sus mezclas, en una concentración menor a 6% (P/V); y opcionalmente un antioxidante seleccionado entre fitosterol, tocoferol y sus mezclas en una concentración de entre el 0,2 y 0,5 % (P/V); agua; sales seleccionadas del conjunto comprendido por cloruro de sodio en una concentración de entre 0,7 y 2,8 g/l, citrato de potasio de entre 0,8 y 2,5 g/l, citrato de sodio en una concentración de entre 0,5 y 2,9 g/l, y sus mezclas; opcionalmente puede comprender además hidratos de carbono, de los cuales se prefiere la glucosa.

Los mecanismos de absorción de sales a nivel de intestino son sistemas de cotransporte que poseen los enterocitos. Estos sistemas involucran el transporte de sales al interior del organismo acoplado al transporte de otras moléculas, dentro de las cuales la más importante es la glucosa. Es por esto que las formulaciones de sales de rehidratación destinadas a la hiponatremia tanto asociada a deporte como a diarrea aguda están conformadas por una mezcla de sales y glucosa. La concentración de sales debe ser superior a la del organismo de manera de que el transporte mediado por glucosa esté facilitado por un gradiente osmótico que tienda a la incorporación de sales a través de la membrana. Sin embargo el aporte de glucosa se ve restringido por el aporte calórico de esta molécula.

Los liposomas son nanopartículas formadas por una bicapa fosfolipídica, al igual que las membranas celulares de los enterocitos. Por distintos mecanismos los liposomas, y por lo tanto todo lo que sea transportado en su interior, poseen una elevada capacidad de ser absorbidos por las células del intestino delgado, elevando la biodisponibilidad del activo transportado. Las formulaciones de sales de rehidratación liposomales tienen como objetivo aportar el mecanismo de transporte de liposomas a los mecanismos básicos de las sales. Existen estudios in vivo en los que se demuestra que una formulación de SRO con concentraciones de sales de la OMS y encapsulada ejerce una hidratación 1,39 veces superior a la formula recomendada por la OMS en animales en condiciones normales; y una hidratación 1,45 veces superior a la formula recomendada por la OMS en animales infectados con cólera ("Absorption of Water From a Liposomal Oral Rehydration Solution: an In Vivo Perfusion Study of Rat Small Intestine Exposed to Cholera Toxin" Gastroenterology - Volume 142, Issue 5, Supplement 1, Pages S-21, May 2012 - Pradip K. Bardhan, Nasirul Islam, Rifat Faruqui)

Es por ello que la presente invención presenta como una enorme ventaja el uso de concentraciones menores de hidrato de carbono, del orden de entre 0 y 6 g/l, lo que mejora la palatabilidad y tolerancia de la formulación. Además sería posible reemplazar la glucosa por una mezcla de hidratos de carbono tales como fructosa, dextrosa, jarabe de maíz de alta fructosa y sus mezclas e incluso por endulzantes artificiales como sucralosa. La baja concentración de glucosa es muy importante en bebidas deportivas. Incluso es posible lograr una rehidratación eficiente en ausencia de glucosa, lo cual permitiría que la formulación sea consumida por personas diabéticas.

Además, y debido también a la menor concentración de glucosa, la formulación de la presente invención presenta una osmolaridad disminuida con respecto a las que se utilizan en el mercado y menor a 190 mmol/L, esto implica la posibilidad de lograr una rehidratación efectiva sin correr el riesgo de inducir hipernatremia en el paciente.

Por otra parte, una de las innovaciones que presenta esta invención es el hecho de que mejora notablemente la relación de inclusión porcentual de sales (sales retenidas dentro de dichos liposomas/sales totales) con respecto a las conocidas en el estado de la técnica. Esta relación es de al menos 40%, preferentemente al menos 50%, más preferentemente al menos 52%. En una alternativa preferida de la presente invención dicha relación de inclusión porcentual es de al menos 56 %. Estos valores de relaciones de inclusión no han sido divulgados previamente en el estado de la técnica y permiten el diseño de formulaciones que contienen menores concentraciones de sales con efectos de rehidratación mejorados, tales como las de la presente invención. Esta relación de inclusión se logra gracias a la utilización del método de ultrafiltración tangencial. Este método es conocido, pero nunca fue aplicado para aumentar la proporción de sales de rehidratación oral encapsuladas dentro de los liposomas en relación a la cantidad total de sales de la formulación, y de esta manera resolver el problema técnico del rechazo que provocan las sales de rehidratación oral por su mal sabor.

Se ha demostrado en el ejemplo 4 que el encapsulamiento mayor al 50% de las sales de la formulación de la presente invención hace que el mal sabor propio de las sales sea casi imperceptible. Esto facilita el consumo en niños menores a 12 años, que constituyen la población más afectada por la deshidratación aguda.

Además los liposomas de la formulación de la invención se elaboran de un diámetro de partícula de entre 200 y 500 nm; preferentemente entre 225 y 450 nm, tal como se puede ver en la figura 2.

La formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención es una infusión de administración oral para el reemplazo oral de fluidos y sales electrolíticas en el tratamiento de la deshidratación causada por la diarrea y vómitos, para prevenir la deshidratación severa, y mantener líquidos y electrolitos corporales. La presente invención además puede ser una infusión de administración oral de uso en actividades deportivas.

El proceso de elaboración, de la formulación de la invención comprende los siguientes pasos:

- a. se prepara una fase acuosa (FA) o buffer que comprende cloruro de sodio, citrato de potasio, citrato de sodio disueltos en agua destilada;
- b. por separado se prepara una fase etanólica (FE), disolviendo dicho fosfolípido en una concentración de entre 0,1 y 6 % (P/V) y opcionalmente un antioxidante en una concentración de entre 0,2 y 0,5 % (P/V), en alcohol, preferentemente etílico;
- c. se induce la formación de liposomas mediante la inyección de dicha FE en dicha FA a temperatura ambiente, mientras se mantiene en agitación,
- d. la solución liposomal obtenida en el paso c se somete a proceso de concentración por ultrafiltración tangencial (UFT), eliminando buffer conservando liposomas y lo que contienen en su interior, se reduce el volumen al menos 10 veces,
- e. la solución liposomal obtenida en el paso d se somete a proceso de concentración por ultrafiltración tangencial (UFT), en el que se elimina el etanol y se reemplaza el buffer por una solución salina, conservando los liposomas y lo que contienen en su interior.

Donde en el paso a dicha fase acuosa (FA) o buffer comprende cloruro de sodio en una concentración de entre 6 y 20 mmol/l., citrato de potasio entre 1 y 12 mmol/l., citrato de sodio entre 2 y 5 mmol/l. y agua destilada.

El proceso de la presente invención en el paso e dicha solución salina comprende una concentración de sodio entre 12 y 50 mmol/l., potasio entre 3 y 36 mmol/l., cloruro entre 15 y 40 mmol/l., citrato entre 8 y 17 mmol/l., y comprende además glucosa entre 17 y 45 mmol/l.

Además la proporción volumétrica entre las fases en el paso c FA:FE, es de al menos 10:1; preferentemente al menos 10:0,5; más preferentemente al menos 10:0,4.

El proceso de la presente invención comprende un proceso de flujo perpendicular, donde se agrega la Fase Etanólica sobre la Fase Acuosa a través de un acople perpendicular al flujo de la primera, y con una relación de velocidades lineales, V_{FE}/V_{FA} , no mayor a 1/200.

Ejemplos de aplicación

Ejemplo 1

Preparación de la formulación de sales de rehidratación liposomal de la invención.

a) Preparación de la Fase Etanólica (FE).

Se agregan 25 g de fosfatidilcolina de soja purificada con 0,5 L de Etanol. Se calienta a 65°C y se agita hasta obtener disolución completa. Se agregan tocoferoles mixtos, ascorbil palmitato y D-Alfa-Tocoferol en cantidad total 2,5 g como antioxidante. Se deja que la solución alcance temperatura ambiente.

b) Preparación de Fase Acuosa (FA) Salina.

Se disuelven 4,33 g de Cloruro de Sodio, 3,42 g de Citrato de Potasio y 4,83 g de Citrato de Sodio en 4,5 L de agua. Se agita a temperatura ambiente hasta disolución total.

c) Producción de Liposomas.

Se agrega lentamente 0,5 L de Fase Etanólica sobre los 4,5 L de Fase acuosa en continua agitación circular. Este puede hacerse también con el proceso de Cross-Flow o flujo perpendicular, donde se agrega la Fase Etanólica sobre la Fase Acuosa a través de un acople perpendicular al flujo de la primera, y con una relación de velocidades lineales, VFE/VFA, no mayor a 1/200. La figura 1 muestra los liposomas formados con ambos procedimientos. En la figura 2 se muestran los resultados de distribución de tamaños de partículas en un análisis de DLS (Dynamic Light Scattering).

d) Aumento de eficiencia de encapsulación.

Se ultrafiltra, sin recirculación, mediante flujo tangencial, con el objeto de eliminar solutos en fase acuosa, no encerrados en liposomas. Este proceso termina luego de la eliminación del 90% del volumen de la dispersión liposomal anterior.

e) Sustitución de buffer.

Se ultrafiltra mediante flujo tangencial con el objeto de eliminar etanol de la solución de sales liposomales. A medida que transcurre el proceso la solución se alimenta a una velocidad igual que la velocidad de permeado con una solución acuosa de Cloruro de Sodio (1,05 mg/ml), Citrato de Potasio (0,83 mg/ml), Citrato de Sodio (1,17 mg/ml) y Glucosa (6,75 mg/ml).

Se obtiene así la formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención con las siguientes características:

Relación de inclusión porcentual de sales (sales retenidas dentro de liposomas/sales totales) de 56,48%

Concentración de Cloruros: 39,7 mmol/L

Concentración de Citratos: 16 mmol/L

Concentración de Potasio: 17,9 mmol/L

Concentración de Sodio: 69,7 mmol/L

Concentración de glucosa: 33,0 mmol/L

Ejemplo 2

Proceso de elaboración de la formulación de la presente invención con una relación de inclusión porcentual de sales del 56%

• Etapa a

Se prepara una solución de 4,5 L de agua destilada con sales a la siguiente concentración:

	Concentración (mmol/L)				
	Glucosa	Na	K	Cl	Cit
Cloruro de Sodio		14,82		14,82	
Citrato de Potasio			6,70		2,23
Citrato de Sodio		11,23			3,74
Glucosa	-				

• Etapa b

Por otro lado se prepara una disolución de Fosfatidilcolina en 500 ml Alcohol Etilico al 5% (P/V).

- Etapa c

Se induce la formación de liposomas mediante la inyección de la solución etanólica en la fase acuosa mientras esta se mantiene en agitación. Aquí se encapsula el 15% de las sales, por lo tanto las concentraciones internas y externas de sales son las siguientes:

	Interna	Externa
Na	3,91	22,14
K	1,00	5,70
Cl	2,23	12,60
Cit	0,895	5,074
Glucosa	0	0

- Etapa d

Los 5 Litros de ORS liposomales se someten a proceso de concentración por Ultrafiltración Tangencial. Este proceso permite eliminar buffer sin descartar liposomas y lo que contienen en su interior. Este proceso se realiza hasta reducir el volumen 10 veces. Al final el proceso se obtienen 500 ml de sales liposomales con la siguiente concentración.

	Interna	Externa
Na	39,1	22,14
K	10,0	5,70
Cl	22,3	12,60
Cit	8,95	5,074
Glucosa	0	0

- Etapa e

En esta etapa se realiza una sustitución de buffer utilizando nuevamente el proceso de UFT. En este caso se reduce el volumen total 10 veces y se reemplaza con una solución acuosa con la siguiente concentración de sales:

	Concentración (mmol/L)
Na	31,57
K	8,13
Cl	17,96
Cit	7,24
Glucosa	40,70

De esta manera se obtienen 500 ml de una solución de ORS Liposomales con la siguiente concentración de sales:

	Interna	Externa	TOTAL
Na	39,1	30,64	69,74
K	10,0	7,88	17,88
Cl	22,3	17,45	39,75
Cit	8,95	7,02	15,97
Glucosa	0	33,03	33,03

La formulación obtenida posee igual concentración de sales que la formulación recomendada por la OMS con una eficiencia de encapsulamiento de alrededor del 56,05%. Otras características recomendadas por la OMS y UNICEF en su declaración conjunta emitida en Mayo del 2004 y logradas en este desarrollo son, contenido reducido de glucosa y menor osmolaridad.

Se obtiene así la formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención con las siguientes características:

Relación de inclusión porcentual de sales (sales retenidas dentro de liposomas/sales totales) de 56,05 %

Concentración de Cloruros: 39,75 mmol/l

Concentración de Citratos: 15,97 mmol/l

Concentración de Potasio: 17,88 mmol/l

Concentración de Sodio: 69,74 mmol/l

Concentración de glucosa: 33,03 mmol/l

Ejemplo 3

Eficiencia de encapsulación por el método de turbidez de Sulfato de Bario

Se prepararon dos soluciones etanólicas de Fosfatidilcolina, una llamada FE1 con una concentración de 2% de Fosfatidilcolina (igual que la utilizada en la formulación TLEC de la patente US20050008685), y otra llamada FE2 con una concentración de Fosfatidilcolina de 5% (igual a la utilizada en la presente invención).

Por otro lado se preparó una solución acuosa (FA) de Sulfato de Amonio 56,23 mM (esta concentración reproduce la Fuerza Iónica de las sales de rehidratación OMS).

Luego se prepararon dos soluciones liposomales por el método de inyección de fase etanólica. En el cual 10 ml de FE1 y FE2 se inyectaron por separado en dos fracciones de 90 ml de FA en agitación magnética a 300 rpm y a 25°C. De esta manera se obtuvieron 100 ml de dos formulaciones liposomales:

*1:10 (v/v) FE1:FA (LIPO-1)

*1:10 (v/v) FE2:FA. (LIPO-2)

La formulación LIPO-2 fue sometida al proceso de ultrafiltración tangencial utilizando un cartucho de fibra hueca con un cut off de 300 KDa, sin retroalimentación. La ultrafiltración continuó hasta reducir 10 veces el volumen. Este es el procesamiento que realizamos en nuestro desarrollo para obtener mayor eficiencia de encapsulamiento.

Se tomaron muestras de ambas soluciones finales.

A continuación se tomaron 10 ml de cada formulación (LIPO-1 y LIPO-2) y se ultrafiltraron utilizando el mismo sistema pero retroalimentando cada formulación con un buffer acuoso de sacarosa 126 mM. De esta manera se eliminó de cada solución los iones Sulfato no encapsulados en liposomas y se sustituyó por una solución con la misma osmolaridad a fin de garantizar la integridad de las membranas liposomales.

Luego se tomaron 5 ml de cada formulación antes y después del proceso de ultrafiltración, y a cada una se agregó surfactante Triton X-100 al 10%, a fin de romper las membranas lipídicas. Esta solución se mantuvo en agitación a 25°C durante 1 hora.

Medición de Turbidez

Los sulfatos solubles precipitan en presencia de cloruro de bario en forma de sulfato de bario (BaSO_4) como sólido blanco. La medición de la disminución de la Transmitancia como consecuencia de la presencia de sulfato de bario, a una determinada longitud de Onda en un Espectrómetro UV/Vis permite determinar la concentración de iones sulfato en solución acuosa.

Para la determinación experimental se realizó una curva de calibrado utilizando 50 ml de patrones de sulfato de amonio con las siguientes concentraciones: 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM y 1 mM. A cada solución se agregó un exceso de 31,23 mg (3 mM) de cloruro de bario. Luego se determinó la transmitancia de cada solución por triplicado utilizando un espectrómetro UV/VIS (Jenway 7315). En la Figura 3 se muestra la curva de calibrado.

Luego se tomó 0,1 ml de la solución incógnita LIPO-1 antes y 1 ml de la solución después de ultrafiltración, ambas ya tratadas con surfactante y se agregó el mismo exceso de cloruro de bario (3 mM). La transmitancia de la muestra antes de la ultrafiltración fue de $49,22\% \pm 0,17\%$ lo cual corresponde a $[\text{Sulfato}] = 0,5273 \text{ mM}$. Teniendo en cuenta las diluciones, la concentración total de sulfato, antes de la ultrafiltración es de 52,73 mM. La transmitancia de la muestra luego de la ultrafiltración fue de $48,25\% \pm 0,32\%$, lo cual corresponde a $[\text{Sulfato}] = 0,5091 \text{ mM}$. Teniendo en cuenta las diluciones la concentración de sales luego de la ultrafiltración es de 5,091 mM. Esto indica que la proporción de Sulfato encapsulado en la formulación realizada con la concentración de Fosfatidilcolina de la Patente US20050008685 fue de 10,59%.

De la misma manera se tomó 0,1 ml de la solución incógnita LIPO-2 antes de la ultrafiltración y 0,1 ml de la solución después de la ultrafiltración, ambas ya tratada con surfactante y se agregó el mismo exceso de cloruro de bario (3 mM). La transmitancia de la muestra antes de la ultrafiltración fue de $73,19\% \pm 0,19\%$ lo cual corresponde a $[\text{Sulfato}] = 0,9818 \text{ mM}$. Teniendo en cuenta las diluciones, la concentración total de sulfato,

antes de la ultrafiltración es de 98,18 mM. La transmitancia de la muestra luego de la ultrafiltración fue de $50,66\% \pm 0,24\%$, lo cual corresponde a $[\text{Sulfato}] = 0,5545 \text{ mM}$. Teniendo en cuenta las diluciones la concentración de sales luego de la ultrafiltración es de 55,45 mM. Esto indica que la proporción de Sulfato encapsulado en la formulación de la presente invención fue de 56,48%.

Nota: Los resultados son directamente proporcionales a las sales de rehidratación encapsuladas, ya que todas las sales tienen una elevada y similar solubilidad en agua. Luego el grado de encapsulamiento por el método de formación de liposomas por inyección de fase etanólica es estadístico, y será similar en compuestos con similar solubilidad en agua.

Ejemplo 4

Ensayo de palatabilidad multicéntrico, aleatorizado y simpleciego

Sales de Rehidratación Liposomales

Muestras:

Formula A: Formulación de sales de rehidratación liposomal de la presente invención del ejemplo 3.

Formula B: Sales de Rehidratación Liposomales según ejemplo 3 de la solicitud de Patente N° 2005/0008685 A1

Metodología

Se incluyeron individuos sanos, de 21 a 40 años inclusive. Se excluyeron individuos con enfermedad cardíaca o renal, diabéticos, individuos con diarrea el mes previo al ensayo e individuos con proceso de rinitis o en tratamiento con antibióticos o hierro.

La selección de individuos se realizó en cuatro centros comerciales distintos de la ciudad de Santa Fe, Argentina. Tras la explicación de la prueba y la firma del consentimiento de cada individuo o por parte de los padres o tutores legales (en caso de los menores), se aleatorizaban los individuos. La aleatorización indica el orden en el que se probarían las dos formulaciones. Para familiarizarse con el tipo de sabores, se probaron con un pequeño sorbo las 2 formulaciones y se enjuagaba posteriormente la boca con un trozo de pan sin sal. Luego, se probaban las 2 formulaciones, en el orden indicado por la aleatorización, y se solicitaba al individuo que eligiera cual de los 2 prefería. Esta misma prueba se repitió por segunda vez con ambas formulaciones, tras nuevo enjuague bucal con agua y trozos de pan. Se les ofrecía

cada formulación en cantidades menores de 20 ml en total, en vasos de plástico rojo (para evitar la influencia del color en la decisión). Las formulaciones se administraron a temperatura ambiente, no refrigeradas.

Cada individuo hizo la prueba de ambas formulaciones de forma repetida (2 veces la primera cata y 2 veces la segunda cata); para comprobar la concordancia en las 2 veces que se hacía cada cata, se utilizó el estadístico kappa(k) (URL: www.graphpad.com/quickcalcs/kappa2.cfm) y su IC del 95%.

Resultados

Se estudiaron 120 individuos; de ellos 4 no cumplían los criterios de inclusión (fuera de edad), por lo que la cohorte final del estudio fue de 116 individuos, con una edad media de 30-32 años. La distribución de los individuos por centro comercial fue similar: entre 27 y 30 por cada centro comercial. Hubo 59 individuos de sexo femenino (50,9%).

Respecto a los resultados obtenidos, encontramos una concordancia muy alta entre las puntuaciones de las 2 pruebas con las mismas formulaciones, tanto en la primera cata (k de 0,91; IC del 95%: 0,85-0,98), como en la segunda cata (k de 0,87; IC del 95%: 0,80 - 0,94). Por esto, se decidió utilizar para el análisis estadístico los resultados de la segunda vez que se puntuó cada una de las 2 catas.

Los 116 individuos, de los cuales 97 prefirieron el sabor de la formula A, 2 prefirieron el sabor la formula B. Hubo 17 individuos que no pudieron definir cuál de ellos preferían, y no se contabilizaron.

Ejemplo 5

Proceso de elaboración de la formulación de la presente invención con una relación de inclusión porcentual de sales del 56% deportiva.

- Etapa a

Se prepara una solución de 4,5 L de agua destilada con sales a la siguiente concentración:

	Concentración (mmol/L)				
	Glucosa	Na	K	Cl	Cit
Cloruro de Sodio		6,01		6,01	
Citrato de Potasio			3,86		1,29
Citrato de Sodio		6,02			2,01
Glucosa	-				

- Etapa b

Por otro lado se prepara una disolución de fosfatidiletanolamina en 500 ml Alcohol Etilico al 4% (P/V).

- Etapa c

Se induce la formación de liposomas mediante la inyección de la solución etanólica en la fase acuosa mientras esta se mantiene en agitación. Aquí se encapsula el 15% de las sales, por lo tanto las concentraciones internas y externas de sales son las siguientes:

	Interna	Externa
Na	1,57	10,46
K	0,50	3,36
Cl	0,78	5,23
Cit	0,49	2,81
Glucosa	0	0

- Etapa d

Los 5 Litros de ORS liposomales se someten a proceso de concentración por ultrafiltración tangencial(UFT). Este proceso permite eliminar buffer sin descartar liposomas y lo que contienen en su interior. Este proceso se realiza hasta reducir el volumen 10 veces. Al final el proceso se obtienen 500 ml de sales liposomales con la siguiente concentración.

	Interna	Externa
Na	15,7	10,56
K	5,04	3,46
Cl	7,84	5,23
Cit	4,90	2,81
Glucosa	0	0

- Etapa e

En esta etapa se realiza una sustitución de buffer utilizando nuevamente el proceso de UFT. En este caso se reduce el volumen total 10 veces y se reemplaza con una solución acuosa con la siguiente concentración de sales:

	Concentración (mmol/L)
Na	12,56
K	3,65
Cl	5,65
Cit	3,04
Glucosa	17,80

Este buffer además contiene Stevia (Reb A 97 – PureCircle) en concentración 0,15 g/L; Sacarosa en concentración 28,5 g/L; Acido Cítrico en concentración 3,6 g/L y Saborizantes Naturales en concentración 1,5 g/L.

De esta manera se obtienen 500 ml de una solución de ORS Liposomales que contiene 40 g/l de fosfolípido y la siguiente concentración de sales:

	Interna	Externa	TOTAL
Na	15,7	12,35	28,05
K	5,04	3,62	8,66
Cl	7,84	5,61	13,45
Cit	4,90	3,02	7,92
Glucosa	0	16,02	16,02

La formulación del presente ejemplo es de utilidad para la gente con necesidad de hidratación debido a la exposición al sol, enfermedad, embarazo, las largas horas de avión, resaca, estrés mental, trabajo extenuante o simplemente vida activa, y puede elaborarse con gustos a naranja, fresa, manzana, pera, manzana, arándanos, frambuesa, entre otros.

Ejemplo 6

Proceso de elaboración de la formulación de la presente invención con una relación de inclusión porcentual de sales del 56%. Formulación de rehidratación pediátrica.

- Etapa a

Se prepara una solución de 4,5 L de agua destilada con sales a la siguiente concentración:

	Concentración (mmol/L)				
	Glucosa	Na	K	Cl	Cit
Cloruro de Sodio		14,82		14,82	
Citrato de Potasio			6,70		2,23
Citrato de Sodio		11,23			3,74
Glucosa	-				

- Etapa b

Por otro lado se prepara una disolución de fosfatidilserina en 500 ml Alcohol Etílico al 3% (P/V).

- Etapa c

Se induce la formación de liposomas mediante la inyección de la solución etanólica en la fase acuosa mientras esta se mantiene en agitación. Aquí se encapsula el 15% de las sales, por lo tanto las concentraciones internas y externas de sales son las siguientes:

	Interna	Externa
Na	3,91	22,14
K	1,00	5,70
Cl	2,23	12,60
Cit	0,895	5,074
Glucosa	0	0

- Etapa d

Los 5 Litros de ORS liposomales se someten a proceso de concentración por Ultrafiltración Tangencial. Este proceso permite eliminar buffer sin descartar liposomas y lo que contienen en su interior. Este proceso se realiza hasta reducir el volumen 10 veces. Al final el proceso se obtienen 500 ml de sales liposomales con la siguiente concentración.

	Interna	Externa
Na	39,1	22,14
K	10,0	5,70
Cl	22,3	12,60
Cit	8,95	5,074
Glucosa	0	0

- Etapa e

En esta etapa se realiza una sustitución de buffer utilizando nuevamente el proceso de UFT. En este caso se reduce el volumen total 10 veces y se reemplaza con una solución acuosa con la siguiente concentración de sales:

	Concentración (mmol/L)
Na	31,57
K	8,13
Cl	17,96
Cit	7,24
Glucosa	40,70

Este buffer además contiene Sucralosa en concentración 0,12 g/L; Jarabe de Maíz de Alta Fructosa 55° Brix en concentración 33,3 g/L; Acido Cítrico en concentración 4,0 g/L y Saborizantes Naturales en concentración 1,7 g/L.

De esta manera se obtienen 500 ml de una solución de ORS Liposomales con 30 g/l de fosfatidilserina y la siguiente concentración de sales:

	Interna	Externa	TOTAL
Na	39,1	30,64	69,74
K	10,0	7,88	17,88
Cl	22,3	17,45	39,75
Cit	8,95	7,02	15,97
Glucosa	0	33,03	33,03

La formulación del presente ejemplo es de utilidad para niños que experimentan vómitos o diarrea con riesgo de deshidratación, y puede elaborarse con gustos a naranja, fresa, manzana, pera, manzana, arándanos, frambuesa, entre otros.

Ejemplo 7

Proceso de elaboración de la formulación de la presente invención con una relación de inclusión porcentual de sales del 56%

- Etapa a

Se prepara una solución de 4,5 L de agua destilada con sales a la siguiente concentración:

	Concentración (mmol/L)				
	Glucosa	Na	K	Cl	Cit
Cloruro de Sodio		6,01		6,01	
Citrato de Potasio			3,86		1,29
Citrato de Sodio		6,02			2,01
Glucosa	-				

- Etapa b

Por otro lado se prepara una disolución de Fosfatidilcolina en 500 ml Alcohol Etilico al 5% (P/V).

- Etapa c

Se induce la formación de liposomas mediante la inyección de la solución etanólica en la fase acuosa mientras esta se mantiene en agitación. Aquí se encapsula el 15% de las sales, por lo tanto las concentraciones internas y externas de sales son las siguientes:

	Interna	Externa
Na	1,57	10,46
K	0,50	3,36
Cl	0,78	5,23
Cit	0,49	2,81
Glucosa	0	0

- Etapa d

Los 5 Litros de ORS liposomales se someten a proceso de concentración por Ultrafiltración Tangencial. Este proceso permite eliminar buffer sin descartar liposomas y lo

que contienen en su interior. Este proceso se realiza hasta reducir el volumen 10 veces. Al final el proceso se obtienen 500 ml de sales liposomales con la siguiente concentración.

	Interna	Externa
Na	15,7	10,46
K	5,04	3,46
Cl	7,84	5,23
Cit	4,90	2,81
Glucosa	0	0

• Etapa e

En esta etapa se realiza una sustitución de buffer utilizando nuevamente el proceso de UFT. En este caso se reduce el volumen total 10 veces y se reemplaza con una solución acuosa con la siguiente concentración de sales:

	Concentración (mmol/L)
Na	12,56
K	3,65
Cl	5,65
Cit	3,04
Glucosa	17,80

Este buffer además contiene Stevia (Reb A 97 – PureCircle) en concentración 0,13 g/L; Sacarosa en concentración 22,2 g/L; Acido Cítrico en concentración 3,4 g/L y Saborizantes Naturales en concentración 1,5 g/L.

De esta manera se obtienen 500 ml de una solución de ORS Liposomales con la siguiente concentración de sales:

	Interna	Externa	TOTAL (mmol/L)
Na	15,7	12,35	28,05
K	5,04	3,62	8,66
Cl	7,84	5,61	13,45
Cit	4,90	3,02	7,92
Glucosa	0	16,02	16,02

Esta formulación puede ser útil para ser consumida por deportistas.

Ejemplo 8

Proceso de elaboración de la formulación de la presente invención con una relación de inclusión porcentual de sales del 56% para deportistas de alto rendimiento.

• Etapa a

Se prepara una solución de 4,5 L de agua destilada con sales a la siguiente concentración:

	Concentración (mmol/L)				
	Glucosa	Na	K	Cl	Cit
Cloruro de Sodio		6,01		6,01	
Citrato de Potasio			3,86		1,29
Citrato de Sodio		6,02			2,01
Glucosa	-				

- Etapa b

Por otro lado se prepara una disolución de fosfatidilinositol en 500 ml Alcohol Etilico al 5% (P/V).

- Etapa c

Se induce la formación de liposomas mediante la inyección de la solución etanólica en la fase acuosa mientras esta se mantiene en agitación. Aquí se encapsula el 15% de las sales, por lo tanto las concentraciones internas y externas de sales son las siguientes:

	Interna	Externa
Na	1,57	10,46
K	0,50	3,36
Cl	0,78	5,23
Cit	0,49	2,81
Glucosa	0	0

- Etapa d

Los 5 Litros de ORS liposomales se someten a proceso de concentración por ultrafiltración tangencial(UFT). Este proceso permite eliminar buffer sin descartar liposomas y lo que contienen en su interior. Este proceso se realiza hasta reducir el volumen 10 veces. Al final el proceso se obtienen 500 ml de sales liposomales con la siguiente concentración.

	Interna	Externa
Na	15,7	10,46
K	5,04	3,46
Cl	7,84	5,23

Cit	4,90	2,81
Glucosa	0	0

• Etapa e

En esta etapa se realiza una sustitución de buffer utilizando nuevamente el proceso de UFT. En este caso se reduce el volumen total 10 veces y se reemplaza con una solución acuosa con la siguiente concentración de sales:

	Concentración (mmol/L)
Na	12,56
K	3,65
Cl	5,65
Cit	3,04
Glucosa	0

Este buffer además contiene Jarabe de maíz de Alta Fructosa 55° Brix 3,22 g/L; Vitamina B1 en concentración 0,002 g/L; Vitamina B5 en concentración 0,011 g/L; Vitamina B6 en concentración 0,011 g/L; Acido Cítrico en concentración 3,6 g/L y Saborizantes Naturales en concentración 1,5 g/L.

De esta manera se obtienen 500 ml de una solución de ORS Liposomales con 50 g/l de fosfatidilinositol y la siguiente concentración de sales:

	Interna	Externa	TOTAL
Na	15,7	12,35	28,05
K	5,04	3,62	8,66
Cl	7,84	5,61	13,45

Cit	4,90	3,02	7,92
Glucosa	0	16,02	16,02

Esta formulación puede ser útil para ser consumida por deportistas de alto rendimiento.

Ejemplo 9

Ensayo preclínico de la formulación de sales de rehidratación de la presente invención.

Se compara un lote de producto terminado de Sales de Rehidratación Liposomal Pediátrica de la presente invención, del ejemplo 6, con el producto comercial Pedialyte de laboratorios Abbott que se tomó como sustancia de referencia. Dicha comparación abarcó el desarrollo de un modelo de diarrea osmótica en ratas para la evaluación de su eficacia.

Diseño experimental:

Se desarrolló un modelo experimental de diarrea osmótica de acuerdo a lo descrito por Wapnir et al., 1988,1991 (Am.J.Clin. Nutr. 1988; 4784-90; J. Pediatr. 1991; 118:S53-61). Se utilizaron 4 grupos experimentales de animales de 10 animales (5 machos y 5 hembras) cada uno. A los grupos 1, 2 y 3 se les indujo diarrea mediante el reemplazo del agua de bebida de una solución oral de Citrato de Magnesio (USP XXII) al 50% durante 5 días. Al grupo 4 no se le indujo diarrea y recibió agua de bebida durante dicho período. Una vez transcurrida la inducción, el grupo 1 fue tratado con la sustancia de ensayo, el grupo 2 con la sustancia de referencia, el grupo 3 recibió solución fisiológica mientras que el grupo 4 no recibió ningún tratamiento. Se analizaron variables de peso corporal, Natremia, Kalemia y Hematocrito durante el tratamiento y hasta 12 horas de finalizado. Se utilizaron ratas de cepa Wistar, con certificación genética, hembras y machos jóvenes. Fueron alojados en jaulas por subgrupos e identificados con un número entero correlativo.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones ambientales controladas: temperatura entre $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo controlado (12hs de luz/12hs de oscuridad) y libre acceso a alimento comercial y agua. Se utilizaron sistemas de estantes microventilados marca Allentown Inc. modelos Europeo Tipo IIIH (POE GC-065).

Se utilizaron 40 animales los que fueron divididos en cuatro grupos experimentales (5 machos y 5 hembras cada uno).

Grupo 1: (5 machos y 5 hembras). Se distribuyó en 2 subgrupos: 1-M; 1-H, cada uno de 5 animales de un mismo sexo. Los que fueron sometidos a la inducción de diarrea osmótica y tratados con la sustancia de ensayos.

Grupo 2: (5 machos y 5 hembras). Se distribuyó en 2 subgrupos: 2-M; 2-H, cada uno de 5 animales de un mismo sexo. Los que fueron sometidos a la inducción de diarrea osmótica y tratados con la sustancia de referencia.

Grupo 3: (5 machos y 5 hembras). Se distribuyó en 2 subgrupos: 3-M; 3-H, cada uno de 5 animales de un mismo sexo. Los que fueron sometidos a la inducción de diarrea osmótica y tratados con solución fisiológica.

Grupo 4: (5 machos y 5 hembras). Se distribuyó en 2 subgrupos: 4-M; 4-H, cada uno de 5 animales de un mismo sexo. No fueron sometidos a ningún tratamiento.

Tratamiento:

Inducción de diarrea osmótica:

En los grupos 1, 2 y 3 se desarrolló un modelo experimental de diarrea osmótica de acuerdo a lo descrito por Wapnir et al., 1988,1991 (Am.J.Clin. Nutr. 1988;4784-90; J. Pediatr. 1991;118:S53-61).

Sustancias de Ensayo:

Sales de Rehidratación Liposomales - Formulación Pediátrica del ejemplo 6 de la presente invención .

Sustancia de referencia: Sales de Rehidratación Pedialyte - Formulación Pediátrica. Producidas por Laboratorios Abbott.

Dosis y administración:

Los grupos 1, 2 y 3 recibieron una dosis total de 125 ml/kg/día por vía oral de las diferentes sustancias de ensayo, distribuidos en 12 administraciones separadas 1 hora. La dosis se seleccionó tomando en cuenta las indicaciones de Pedialyte que recomienda dosis de 100 a 150 ml/kg. El volumen de administración fue calculado de acuerdo al promedio de pesos de machos y hembras obtenido el día 5 por la mañana, en el momento de retiro de la solución de citrato de magnesio e inicio del tratamiento, determinando dosis diferenciales para machos y hembras.

El volumen correspondiente a cada administración se cálculo de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$V \left(\frac{ml}{animal} \right) = \frac{P \times 125}{12 \times 1000}$$

Siendo P el peso promedio en gramos ya sea de machos o hembras según corresponda.

Las administraciones se realizaron cada una hora comenzando a las 9 horas del día 5.

Determinación de hematocrito:

Mediante la extracción de una gota de sangre se realizó un microhematocrito, utilizando microtubos heparinizados. Las muestras se tomaron en los siguientes momentos:

Día 5: 08:00hs, 12:00hs, 16:00hs y 20:00hs.

Las muestras recolectadas también fueron destinadas a la determinación de Natremia y Kalemia.

Análisis de datos_Se realizó un análisis comparativo entre las diferentes formulaciones, realizando estadística descriptiva y análisis de varianza de 2 vías (ANOVA), seguida del test de comparaciones múltiples de Tukey para identificar diferencias entre diferentes tiempos. Estas operaciones se efectuaron con el software GraphPad Prism 6.0

RESULTADOS.

Recuperación de masa corporal

	1M		2M		3M		4M	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Día 0	137,2	3,44093	137,8	2,332381	134,2	2,2	138,4	1,805547
Día 1	133,8	2,61534	134	2,387467	130,6	2,357965	143,4	2,014944
Día 2	128,2	2,374868	128	1,760682	123,8	3,168596	143,8	1,714643
Día 3	122,8	2,596151	124,4	3,091925	120,6	3,37046	146,2	2,853069
Día 4	112,8	4,465423	113,8	2,477902	110,6	3,17175	149,6	2,088061
Día 5 (8 hs)	108,6	3,613863	105	2,258318	103,4	2,158703	153,4	3,249615
Día 5 (12 hs)	115,8	4,140048	110,4	1,939072	109	2,50998	153,4	2,501999
Día 5 (16 hs)	124,8	4,476605	115,6	1,122497	114	2,097618	155,8	2,557342
Día 5 (20 hs)	133,4	4,905099	121,4	0,6	119,6	2,249444	156,6	2,61916
Día 6	137,1	5,416641	125,4	1,939072	124,4	3,043025	157,8	2,416609

	1H		2H		3H		4H	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Dia 0	118,4	0,9273618	120,4	1,50333	120	0,9486833	119,4	2,521904
Dia 1	112,6	1,536229	114,6	1,469694	115	1,264911	121,2	2,709244
Dia 2	105,6	1,28841	109,6	1,28841	107,8	2,034699	123,8	2,61534
Dia 3	98,8	1,714643	102	1,30384	102,8	1,907878	124,4	2,785677
Dia 4	93,4	1,249	93,6	1,939072	96	0,8944272	126,8	2,2
Dia 5 (8 hs)	92,8	1,939072	89,8	1,827567	93,2	2,437212	128,6	2,135416
Dia 5 (12 hs)	106,4	1,6	103	2,213594	107,8	0,9695359	127	1,949359
Dia 5 (16 hs)	112,6	1,4	101,6	1,860107	108,6	1,886796	126	2,073644
Dia 5 (20 hs)	116,6	1,886796	102,6	1,469694	113,2	1,157584	123,4	2,420743
Dia 6	118,6	2,420743	102,6	1,16619	110	1,449138	126,8	2,332381

Ver figuras 4 y 5

Concentración de Hematocrito:

	1M		2M		3M		4M	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Dia 5 (8 hs)	54,6	1,029563	54	0,83666	52,4	0,4	44,4	0,6
Dia 5 (12 hs)	48,6	0,4	50,8	0,374166	50,6	0,6	46,2	0,583095
Dia 5 (16 hs)	46,6	0,4	49,2	0,374166	48,4	0,509902	45	0,316228
Dia 5 (20 hs)	45	0,547723	48,4	0,678233	45,2	0,860233	43	0,632456
Dia 6	44,4	1,32665	48	1,516575	46,6	2,249444	44	0,948683

	1H		2H		3H		4H	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Dia 5 (8 hs)	55,6	1,32665	54,8	0,734847	53	0,547723	46,6	0,4
Dia 5 (12 hs)	47,2	0,2	50,4	0,678233	50,6	0,509902	47,2	0,583095
Dia 5 (16 hs)	45,8	0,2	49,6	0,6	47,8	0,2	45,4	0,979796
Dia 5 (20 hs)	44,4	0,509902	47,8	0,374166	45,8	1,2	44,8	0,860233
Dia 6	43,2	0,374166	45,4	1,630951	41,4	1,860107	42,2	1,772004

Ver Figuras 6 y 7

Natremia (mmol/L)

	1M		2M		3M		4M	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Dia 5 (8 hs)	200,8	3,624914	194,6	5,1049	193	4,312772	175	1,341641
Dia 5 (12 hs)	178,4	1,32665	191,2	1,655295	192,4	3,893584	169,4	3,059412
Dia 5 (16 hs)	175,2	1,655295	190,4	1,363818	192	1,923538	173,4	2,420743
Dia 5 (20 hs)	175,6	1,50333	187,2	0,7348469	189,2	1,933908	173,2	1,496663
Dia 6	175,2	1,593738	185,2	1,714643	187	1,48324	174,4	2,088061
	1H		2H		3H		4H	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Dia 5 (8 hs)	190,2	4,97393	194,8	3,15278	185,6	1,8868	175,2	1,06771
Dia 5 (12 hs)	173,6	1,46969	192,4	2,01494	180,2	1,06771	172,6	1,36382
Dia 5 (16 hs)	169,8	1,35647	189,4	2,37907	177,2	1,15758	171,2	3,77359
Dia 5 (20 hs)	173,2	1,35647	188,4	1,43527	172	1,09545	174,4	2,37907
Dia 6	171,4	3,58608	185,2	1,88149	171,8	1,98494	174,6	1,20831

Ver Figuras 8 y 9

Kalemia (mmol/L)

	1M		2M		3M		4M	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Dia 5 (8 hs)	5,06	0,478121	4,87	0,4895406	5,62	0,3527038	8,48	0,2009974
Dia 5 (12 hs)	6,76	0,552811	5,75	0,2792848	5,64	0,3187475	8,4	0,2167949
Dia 5 (16 hs)	7,94	0,143527	6,56	0,2466778	6,1	0,1294218	8,139	0,1363817
Dia 5 (20 hs)	8,16	0,129807	7,33	0,1299999	6,79	0,1372953	8,36	0,1784657
Dia 6	8,23	0,128062	7,5	0,1695582	7,55	0,2720294	8,4	0,0935415
	1H		2H		3H		4H	
	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM	Media	SEM
Dia 5 (8 hs)	5,06	0,26429	5,75	0,57619	4,9	0,54106	8,34	0,14
Dia 5 (12 hs)	6,52	0,69401	6,46	0,52617	5,81	0,12288	8,42	0,08456
Dia 5 (16 hs)	8,58	0,09028	7,02	0,157	6,47	0,20224	8,309	0,11662
Dia 5 (20 hs)	8,38	0,10794	7,41	0,17986	6,88	0,12806	8,51	0,12787
Dia 6	8,42	0,10794	7,51	0,11225	7,19	0,19261	8,43	0,11023

CONCLUSIONES:

El modelo de diarrea osmótica se desarrolló tal cual lo descrito en la bibliografía, generando una disminución significativa en el peso y un incremento en el hematocrito, producto de la deshidratación.

Durante el proceso de deshidratación por excreción de heces se produce una pérdida significativa de líquido extracelular. La concentración de sodio en este fluido es aproximadamente 30 veces superior a la de potasio. Durante el proceso de pérdida de fluido también existe una pérdida significativa de solutos, entre ellos los iones sodio y potasio, encargados de regular la restitución de líquido en el organismo. Sin embargo el porcentaje de pérdida de potasio es mayor que el de sodio. Esto sumado a la disminución de líquido hace que el cuadro inicial de deshidratación sea valores de concentración de sodio en plasma superior a la de los animales que no sufrieron deshidratación y concentraciones de potasio en plasma inferiores a la de los animales no deshidratados.

Los resultados del análisis de masa corporal indican que como consecuencia de la inducción de diarrea todos los grupos experimentales al inicio del tratamiento habían perdido aproximadamente el 20% de su masa corporal. Luego los resultados comparativos demostraron diferencias significativas entre la recuperación de peso en el grupo tratado con la formulación del ejemplo 6 de la presente invención y el grupo tratado con Pedialyte®. Tanto en machos como en hembras luego de 24 horas de tratamiento la formulación de la presente invención indujo la recuperación de la masa corporal promedio del grupo experimental.

El hematocrito es el porcentaje del volumen total de la sangre compuesta por glóbulos rojos. La pérdida de hematocrito durante la deshidratación por heces es despreciable. Esto implica que la disminución del líquido extracelular perteneciente al plasma hace que el hematocrito aumente.

En el cuadro al inicio del tratamiento se puede observar que todos los grupos que fueron inducidos poseen un nivel de hematocritos superior al 50%, cuando los valores normales siempre están entre 40%-50%. Los resultados del tratamiento indican la recuperación en el nivel de hematocritos en el grupo tratado con la formulación de la presente invención fue significativamente más rápida que la lograda por Pedialyte®. En machos el nivel normal se alcanzó luego de 24 horas de tratamiento, mientras que en hembras la acción fue significativamente más efectiva, recuperando el nivel normal luego de 8 horas de tratamiento.

Los análisis de Natremia y Kalemia se ven fuertemente influenciados por la recuperación de líquido extracelular. La disminución en la concentración de sodio en todos los grupos experimentales no significa que haya una pérdida del catión, sino que hay una disminución

en su concentración. Esto significa que el organismo absorbe sodio y recupera un mayor porcentaje de líquido, en consecuencia su concentración baja. Los resultados experimentales revelaron que tanto en machos como en hembras la velocidad de recuperación de los niveles normales de sodio y potasio fue significativamente mayor para la formulación de la presente invención en comparación con Pedialyte®.