



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

**"CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE GELES DE
LIBERACIÓN MODIFICADA Y SU CUANTIFICACIÓN EN
SUERO"**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANA KAREN LUGO ESPINOSA

DIRECTOR DE TESIS

**DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD
BERNAD**

ASESOR DE TESIS

M. EN F. LETICIA HUERTA FLORES



JUNIO DEL 2014

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a dios por iluminarme en esta loca historia que llamamos vida, por darme la oportunidad de vivir y por todas las bendiciones que han caído sobre mí y sobre todo por bendecirme con la gran familia que me brindo de la cual me siento muy orgullosa.

A mis padres por ser el motor de mi vida, por todas las enseñanzas, consejos, regaños, alegrías, por sacar adelante a mis hermanos y a mí, porque no importa si hace frio, calor o llueve ustedes siempre tan trabajadores y sonrientes a la vida para que no nos falte nada , por todos los valores inculcados, por confiar en mí y por convertirme en la mujer que soy ahora porque sin ustedes, sin su apoyo y sobre todo sin su amor mi vida no sería igual; por inculcarnos y enseñarnos que el amor y unión de la familia es lo más importante ya que es lo único seguro que tenemos. Recuerden que estoy muy orgullosa de ser su hija, dios no pudo elegir mejores padres para mí, los amo mucho.

A mis hermano Luis, Diego, Aldo y Alex porque a pesar de nuestras diferencias siempre estamos juntos apoyándonos, por ser parte de mi vida y porque la vida sin ustedes no sería igual los quiero mucho y estoy muy orgullosa de cada uno de ustedes, gracias por las alegrías, los consejos, los enojos y sobre todo por el cariño que me tienen.

A mi mejor amigo, mi confidente, mi apoyo, mi novio... Jorge gracias por todas las palabras, el apoyo, por amarme en mis peores momentos, por los ánimos, el tiempo y por creer en mi incluso cuando yo no lo hacía, te amo y me encanta que seas parte de mi vida y porque este logro también es tuyo... TAMDS.

A mi familia, mis tíos, primos, sobrinos, abuelito...porque este no es solo un logro mío es de toda la familia, gracias por las palabras y por creer en mí. Gracias a mi futura ahijada Azul por darme un motivo más y poder ser un ejemplo para ti. Gracias familia Lugo y familia Espinosa.

A la memoria de tres grandes angelitos mi abuelito Rey, mi tío Ray y mi abuelita Lupe porque sé que les hacía mucha ilusión este logro en mi vida y aunque ya no están con nosotros les quiero dar las gracias por los ánimos en su momento y tío Ray lo logre, lo queremos y lo extrañamos mucho.

A la Dra. Josefa Bernad por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por los consejos, y las grandes enseñanzas pero sobre todo por enseñarme que en la vida se lucha contra cualquier obstáculo, la admiro mucho no solo académicamente sino como mujer, la quiero.

A la M. en F. Leticia Huerta por apoyarme y guiarme en este camino por ser un gran pilar para mí, gracias por los consejos y por preocuparse por mí, la admiro mucho, gracias por las pláticas y los consejos no solo académicos también personales gracias por la confianza brindada, la quiero.

A mis sinodales la Dra. Leticia Cruz, M. en F. Martha Ugalde y Mtra. Isabel Garduño por el tiempo invertido en mi tesis y los consejos de cada una.

Al Dr. Luis Medina por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo, gracias por los consejos y ayuda que me brindo en mi estancia en CU.

A mi maravillosa Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza” por darme el honor de estudiar mi carrera en esta maravillosa institución.

A mis amigas que han estado conmigo desde siempre Rossy, Lety, Nery y Viri porque hace ya 10 años empezamos este camino juntas y poco a poco vamos avanzando en nuestros logros, nuestras metas, pero sobre todo seguimos juntas con esta amistad que es para siempre las quiero y gracias por estar conmigo cuando más lo necesito. A mis amigos de la carrera que me acompañaron desde el comienzo de esta aventura no solo en los momentos académicos, estresándonos por tareas, trabajos, exámenes pero saliendo juntos adelante; además de los momentos fuera de clase, por las risas, las pláticas, las fiestas, pero sobre todo por hacer estos cinco años tan divertidos gracias. Y finalmente y no menos importante a todos mis amigos en general de la casa, del trabajo, todos los que han estado apoyándome y desde que me conocen han creído en mí gracias.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.”

Marie Curie

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. MARCO TEÓRICO	2
1.1 REOLOGÍA.....	2
1.1.1 Definición.....	2
1.1.2 Flujo y deformación	3
1.1.3 Velocidad de deformación y esfuerzo en flujo de cizalla	3
1.1.4 Viscoelasticidad	4
1.1.5 Análisis de viscoelasticidad	6
1.1.6 Análisis oscilatorio de baja amplitud	7
1.2 GELES.....	12
1.2.1 Hidrogeles	13
1.3 POLOXÁMEROS	16
1.3.1 Estructura condensada del poloxámero.....	18
1.3.2 Fórmula general.....	18
1.3.3 Forma estructural.....	18
1.3.4 Usos del poloxámero	18
1.3.5 Características principales.....	18
1.3.5.1 Aspecto	18
1.3.5.2 Solubilidad.....	19
1.4 QUITOSANO	19
1.4.1 Relación entre sus propiedades y su estructura.....	21
1.5 KOLLICOAT GRADO MAE	22
1.5.1 Estructura química y composición	22
1.5.2 Solubilidad, miscibilidad, dispersión	23
1.6 GELES <i>IN SITU</i>	23
1.6.1 Formación <i>In situ</i> basada en estimulaciones fisiológicas.....	24
1.6.1.1 Temperatura.....	24
1.6.1.2 pH	25
1.6.1.3 Formación <i>in situ</i> basada en un mecanismo físico -Hinchamiento-	26
1.6.1.4 Difusión	26
1.6.2 Formación <i>in situ</i> basada en reacciones químicas.....	26
1.6.3 Reticulación iónica.....	26
1.6.4 Entrecruzamiento enzimático	26
1.6.5 Foto-polimerización	27

1.7	PROGESTERONA	27
1.8	APLICACIÓN DE LOS GELES DE PROGESTERONA EN BOVINOS	28
1.8.1	Proceso reproductivo de bovinos	28
1.8.2	El ciclo estral	29
1.8.3	Presentaciones comerciales	30
1.9	CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA	31
1.9.1	Aplicaciones	33
1.9.2	Tipos de cromatografía	34
1.9.2.1	Líquido-Sólido	34
1.9.2.2	Líquido-Líquido	35
1.9.2.3	Filtración en gel	35
1.9.2.4	Fase normal	35
1.9.2.5	Fase reversa	35
1.9.2.6	Supresión iónica	36
1.9.2.7	Formación de pares iónicos	36
1.9.2.8	De Intercambio iónico	36
1.9.2.9	Afinidad	37
1.9.3	Elución	37
1.9.3.1	Elución isocrática	37
1.9.3.2	Elución en gradiente	37
1.10	FLUORESCENCIA	38
1.10.1	El proceso de fluorescencia	38
1.10.1.1	Etapa 1: Excitación	38
1.10.1.2	Etapa 2: Estado de vida excitado	39
1.10.1.3	Etapa 3: Emisión de fluorescencia	39
1.10.2	Análogos fluorescentes de moléculas bioactivas	39
1.10.3	Unión covalente de etiquetas fluorescentes	40
1.11	EL CROMÓFORO BODIPY: ESTRUCTURA, PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS Y APLICACIONES	42
1.11.1	Estructura básica	42
1.11.2	Propiedades espectroscópicas del cromóforo BODIPY	43
1.11.3	Aplicaciones	44
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	45
3.	OBJETIVOS	46
4.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	47
5.	MATERIAL	48
5.1	Material	48

5.2	Instrumentos	48
•	Balanza analítica Adventurer TM Ohaus	48
•	Micropipetas Transferpette® Brand 10-100 µL.....	48
•	Micropipeta Eppendorf Research 100-1000 µl	48
•	Micropipeta Eppendorf Research 0.5-10 µl	48
5.3	Reactivos	49
5.4	Equipo	49
5.5	Diagrama de flujo de la metodología realizada para la Caracterización reológica de geles de liberación modificada y su cuantificación en suero.	50
6.	METODOLOGÍA	51
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	55
8	CONCLUSIONES.....	69
9	PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	70
10	ANEXOS	70
11	BIBLIOGRAFÍA.....	71

INTRODUCCIÓN

Los fármacos de liberación controlada son de gran interés en el desarrollo de nuevos productos de mejor eficacia, fiabilidad y seguridad. Este interés ha sido impulsado por las ventajas, entre otras, mostradas por los sistemas poliméricos de formación *in situ* tales como: la facilidad y reducción en la frecuencia de administración al paciente. Así pues, la elaboración de geles de liberación controlada debe de cumplir condiciones fisiológicas para que puedan servir como un sistema de suministro del fármaco por gelación *in situ*, es decir, una formulación inyectable parenteral que se transforme en un gel a condiciones fisiológicas. En este trabajo se desarrolló la formación de complejos gelificantes con 5 formulaciones utilizando Kollicoat al 10% en dos formulaciones variando la concentración del disolvente (etanol-agua) y PEG 6000 al 20 % (p/v); seguido de tres formulaciones con Poloxámero F-127 al 15% (p/v), Quitosano 80 al 0.5% (p/v) y una mezcla de ambos. Se caracterizaron los sistemas mediante pruebas reológicas a fin de describir el comportamiento termomecánico del polímero utilizado, obteniendo como resultado que las formulaciones compuestas de estos polímeros son geles débiles, y para el caso del Quitosano y el poloxámero la respuesta en los espectros mecánicos dinámicos de baja amplitud de deformación de los modulo elástico, (G') y viscoso (G'') exhibió un comportamiento del tipo líquido viscoelástico ($G'' > G'$) en todo el intervalo de flujo; sin embargo para el caso de las formulaciones compuestas de PEG 6000, kollicoat, progesterona y etanol-agua, su comportamiento cinético muestra que $G' > G''$ por lo que conservan sus propiedades de gel débil.

Por otra parte, desde la década de los 40 se comprobó la utilidad de la Progesterona (P4) para el control del ciclo estral en los rumiantes. Aplicando inyecciones diarias en cantidades suficientes (100 mg de P4 en el bovino y 50 mg P4 en el ovino) por 14 días se simulaba un cuerpo lúteo artificial, de modo que cuando se suprimía el tratamiento se creaba la sincronización del estro y la ovulación (Wolfbang 1995). En este trabajo se propuso una reacción de derivatización entre la progesterona y el 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-Bora-3a, 4a-diaza-s-indaceno-3-propiónico, hidrazida (BODIPY) para poder ser cuantificado en el HPLC con detector fluorescente, y así se llevó a cabo la construcción de una curva estándar para la progesterona-BODIPY y la propuesta de extracción de la progesterona del suero de bovinos para posteriores estudios.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 REOLOGÍA

1.1.1 Definición

El término “reología” es derivado del griego *rheos* que significa corriente o flujo. La reología estudia el flujo y deformación de los materiales y esta definición es aceptada por la American Society of Rheology fundada en 1929. ⁽¹⁾

La reología es por definición, la ciencia de la deformación y el flujo de materia. El comportamiento reológico de los polímeros implica fenómenos muy diversos que pueden relacionarse con diferentes mecanismos moleculares. Estos fenómenos y sus principales mecanismos asociados son los siguientes:

- *Flujo viscoso*, es la deformación en masa irreversible del material polimérico asociada al deslizamiento irreversible, unas sobre otras, de las cadenas moleculares².
- *Elasticidad de los cauchos y afines*, en las que se conserva la libertad de movimiento local asociada a los movimientos de cadena a pequeña escala, pero están impedidos los movimientos a gran escala (flujo) por la restricción de una estructura reticular difusa. ⁽²⁾
- *Viscoelasticidad*, en la que la deformación de la muestra de polímero es reversible pero depende del tiempo y está asociada (como la elasticidad en el caucho) con la distorsión de cadenas de polímero a partir de sus conformaciones de equilibrio, por un movimiento activado de los segmentos que implican rotación alrededor de los enlaces químicos. ⁽²⁾
- *Elasticidad de Hooke*, en la que el movimiento de los segmentos de la cadena está drásticamente restringido y probablemente solo implica alargamiento de los enlaces de deformación de los ángulos de enlace: el material se comporta como un cristal. ⁽²⁾

1.1.2 Flujo y deformación⁽³⁾

En el campo de la reología, existen varios términos que son comúnmente usados, entre los cuales se encuentran el flujo y la deformación. Cuando se habla de flujo, intrínsecamente se habla de deformación, y se hace referencia a los puntos adyacentes en el fluido que se mueven relativamente uno con el otro. La deformación comúnmente es representada por el símbolo γ .

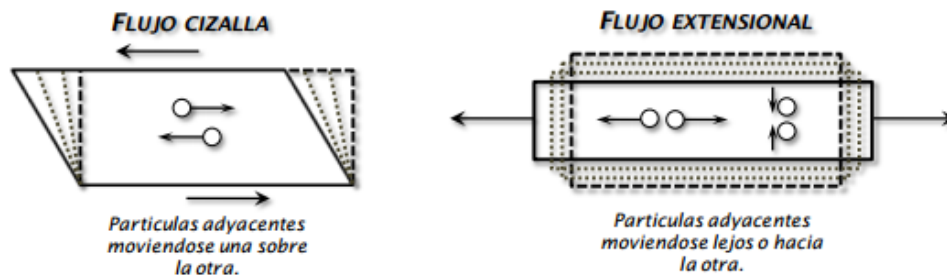


Figura 1 Movimiento de las partículas en flujos cizalla y elongacional.

Hay dos tipos de flujo básicos conocidos como, flujo de cizalla (shear flow) y flujo elongacional (extensional flow). En la figura 1 se puede observar que el flujo de cizalla es el movimiento continuo de partículas de fluido una sobre la otra; mientras que en el flujo extensional las partículas se mueven lejos o hacia la otra.

Todos los flujos son resistidos por la viscosidad. Para una velocidad dada la fuerza resultante aumenta cuando la viscosidad se incrementa, en tanto que para una fuerza dada, la velocidad se reduce cuando la viscosidad se incrementa.

1.1.3 Velocidad de deformación y esfuerzo en flujo de cizalla⁽³⁾

El flujo de cizalla simple se representa mediante un modelo hipotético de capas que se deslizan una con respecto a la otra (figura 2). Siguiendo este modelo, el caso más simple que se puede encontrar es cuando la velocidad con que se mueve cada capa de material incrementa linealmente con respecto a su vecina, ubicada más abajo; de modo que la capa al doble de la distancia de cualquier capa estacionaria se mueve al doble de la velocidad de

la misma. Este gradiente de velocidad en la dirección perpendicular al flujo es llamado “Velocidad de Deformación” (shear rate), y la fuerza por unidad de área creada o producida por el flujo es llamada “Esfuerzo” (shear stress). Generalmente, la velocidad de deformación es denotada por el símbolo $\dot{\gamma}$, mientras que el esfuerzo es simbolizado por τ .

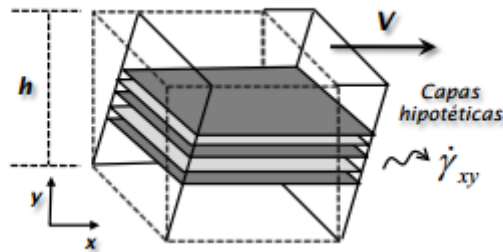


Figura 2 Modelo hipotético de capas en flujo cizalla.

1.1.4 Viscoelasticidad

Hace cuatrocientos años todo pudo ser engañosamente simplificado a las leyes de Newton y Hooke, y de hecho, durante dos siglos el comportamiento de los materiales fue satisfactoriamente descrito con la ley de Hooke para los sólidos y la ley de Newton para los líquidos. Sin embargo, comenzaron a aparecer dudas y casos donde las leyes de Hooke y Newton no representaban satisfactoriamente el comportamiento de algunos materiales. Diversos estudios condujeron a la aparición de la “viscoelasticidad”, que considera intrínsecamente la existencia simultánea de propiedades viscosas y elásticas en un material. Al hablar de viscoelasticidad es necesario hacer referencia a un tiempo de relajación característico del material. Esto debido a que la respuesta particular de una muestra en un experimento dado depende de la escala del tiempo de observación del proceso en relación a este tiempo de relajación. Si el experimento es relativamente lento, la muestra puede parecer más viscosa que elástica, mientras que, si el experimento es relativamente rápido, esta puede parecer más elástica que viscosa. De la coexistencia de ambas observaciones a escalas de tiempo intermedio, donde la muestra puede parecer tanto elástica como viscosa, es de donde se obtiene un comportamiento viscoelástico. En otras palabras, si se aplica un rango muy amplio de esfuerzo sobre un espectro de tiempo muy amplio, o frecuencia, y se realizan medidas reológicas, es posible observar tanto propiedades líquidas como sólidas o viceversa.⁽³⁾

Tal como se menciona antes, todos los materiales pueden comportarse como líquidos o sólidos, dependiendo de la escala de tiempo del experimento reológico. En tiempos muy largos los materiales "sólidos" fluyen como líquidos bajo un estrés constante. Por ejemplo el cristal de la ventana no es un sólido en absoluto, sino un fluido muy viscoso ($\eta = 10^{12}$ Pa s). Por el contrario, en tiempos muy cortos (o, equivalentemente, a frecuencias muy altas), por ejemplo, menos de 10^{-8} s, el agua se comporta como un sólido. Por lo tanto, prácticamente todos los materiales son viscoelástico. La escala de tiempo de la deformación determina la proporción de viscosidad (líquidos) a elasticidad (sólidos) en las propiedades de un material dado. ⁽⁴⁾

La descripción de la respuesta viscoelástica de los polímeros amorfos a pequeñas tensiones se simplifica grandemente por la aplicación de los tres principios generales siguientes que son ampliamente aplicables a estos sistemas. ⁽²⁾

El principio de superposición de Boltzmann. Establece que la deformación es una función lineal de la tensión, de modo que el efecto total de aplicar varias tensiones es la suma de los efectos de aplicar cada una de ellas separadamente. La aplicación de este principio de superposición hace posible predecir la respuesta mecánica de un polímero amorfo a una amplia gama de condiciones de carga a partir de una cantidad limitada de datos experimentales. El principio se aplica tanto a las tensiones estáticas como a las dependientes del tiempo. ⁽²⁾

Equivalencia tiempo-temperatura. Un aumento en la temperatura acelera el movimiento molecular y segmental, llevando al sistema rápidamente al equilibrio o equilibrio aparente y acelerando todos los tipos de procesos viscoelásticos. Una forma conveniente de formular este efecto de la temperatura es en términos de la relación a_T de la constante de tiempo (tiempo de relajación) de una respuesta particular, τ , a una temperatura T , a su valor τ_0 a una temperatura conveniente de referencia T^0 . El tiempo y la temperatura afectan a la viscoelasticidad solamente a través del producto a_T y del tiempo real, y a_T se llama un factor de desplazamiento. ⁽²⁾

Relajación de tensión. Si el alargamiento se detiene durante la determinación de la curva tensión-deformación de un polímero, la fuerza o tensión decrece con el tiempo a medida que el espécimen se aproxima al equilibrio o quasi-equilibrio, bajo la deformación impuesta. La observación directa y medición de este fenómeno constituye el experimento de relajación de tensión. Usualmente, la muestra se deforma rápidamente hasta una deformación especificada, y la tensión para esta deformación se observa durante periodos que van de varios minutos a varios días o aún más tiempo.⁽²⁾

Se ha demostrado, tanto experimental como teóricamente, que el comportamiento de relajación de tensión de los polímeros tipo caucho puede descomponerse en producto de funciones independientes de la deformación y del tiempo. Para pequeñas deformaciones, la función tensión-deformación es casi lineal y puede representarse por un módulo de elasticidad dependiente del tiempo $G(t)$.⁽²⁾

1.1.5 Análisis de viscoelasticidad

Hay varias formas de medir la respuesta viscoelástica de un material. Una de las más simples es la aplicación repentina de un esfuerzo constante al material que está siendo estudiado, y monitorear la deformación resultante. Este tipo de prueba es llamada “creep testing”. De manera análoga, si se aplica repentinamente una deformación constante y se monitorea el esfuerzo consecuente, se tiene la prueba de esfuerzo de relajación (stress relaxation test). Otro método frecuentemente usado es la prueba oscilatoria (oscillatory testing), que consiste en aplicar un esfuerzo o deformación oscilatoria de entrada sobre la muestra y monitorear la deformación o esfuerzo oscilatorio de salida. También se tiene la prueba llamada “start-up” que consiste en la aplicación de una velocidad de deformación constante y el seguimiento del esfuerzo resultante. Estas pruebas son mostradas en la figura 3.⁽³⁾

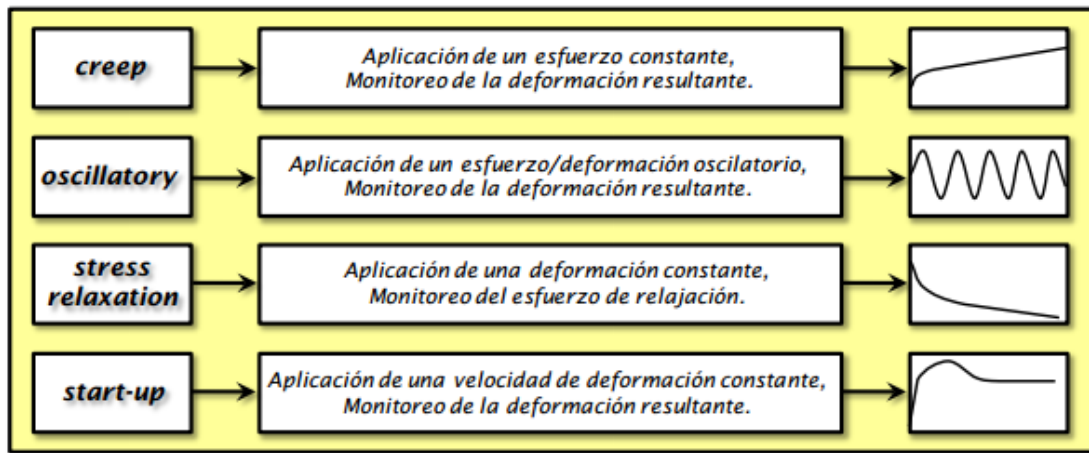


Figura 3 Pruebas de análisis de viscoelasticidad.

1.1.6 Análisis oscilatorio de baja amplitud⁽³⁾

Los análisis oscilatorios son frecuentemente el tipo de prueba viscoelástica más utilizado. Esta prueba consiste en someter un fluido a un esfuerzo (τ) o deformación (γ) sinusoidal de una frecuencia dada (ω). Durante este movimiento periódico, el esfuerzo y la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) evolucionan sinusoidalmente en función del tiempo con la misma pulsación, pero presentando un cierto desfase (ϕ) una con respecto a la otra. Es importante resaltar, que en gran parte de la literatura se utiliza el desfase denotado por el símbolo " δ ", que está dado por el desfase entre el esfuerzo y la deformación (Coussot y Grossiord, 2001). Ambos desfases están relacionados por la ecuación:

$$\delta = \left(\frac{\pi}{2}\right) - \phi \quad (1)$$

Las propiedades como un sólido de un fluido a cualquier frecuencia son representadas por el módulo elástico (G'), mientras que como líquido son descritas por el módulo viscoso (G''). Las unidades de ambos módulos son pascal (Pa) en el Sistema Internacional y están definidos por las ecuaciones:

$$G' = G^* \cdot \cos \delta \quad (2)$$

$$G'' = G^* \cdot \sin \delta \quad (3)$$

Donde G^* representa el módulo complejo de cizallamiento. A partir de estas ecuaciones, el desfase (δ) se puede relacionar al módulo elástico y viscoso por la ecuación:

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'} \quad (4)$$

Con la ecuación (4) se demuestra que el ángulo de desfase tiene un valor que varía entre 0° (para un sólido elástico, $G'' = 0$) y 90° (para un líquido viscoso, $G' = 0$). En este sentido, si el ángulo de desfase es un indicador de la presencia de propiedades elásticas o viscosas de un fluido, se puede establecer que si el valor de δ está comprendido entre 0° y 45° el fluido tiene un comportamiento más elástico que viscoso, o viceversa, cuando δ está comprendido entre 45° y 90° .

La deformación sinusoidal que se impone sobre el fluido y que varía en el transcurso del tiempo con la frecuencia, puede ser representada por la ecuación:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot e^{i\omega t} \quad (5)$$

Donde, $\gamma(t)$ es la deformación del material a un tiempo t , γ_0 es la amplitud de la deformación aplicada, ω es la frecuencia (rad/s), t es el tiempo (s) y i es una unidad imaginaria. Como se mencionó anteriormente, el esfuerzo que acompaña esta deformación presenta en general un desfase (δ) y viene dado por:

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot e^{i(\omega t + \delta)} \quad (6)$$

Donde, $\tau(t)$ es el esfuerzo aplicado a un tiempo t y τ_0 es el esfuerzo aplicado (Pa). A partir de las ecuaciones del esfuerzo y de la deformación a un tiempo t , se define el módulo complejo de cizallamiento por:

$$G^* = \frac{\tau(t)}{\gamma(t)} = \frac{\tau_0 \cdot e^{i(\omega t + \delta)}}{\gamma_0 \cdot e^{i\omega t}} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} e^{i\delta} = \frac{\tau_0}{\gamma_0} (\cos\delta + i \cdot \sin\delta) \quad (7)$$

Donde $G^* = G' + i \cdot G''$, con:

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} (\cos \delta) \quad (8)$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} (\sen \delta) \quad (9)$$

Todas estas propiedades reológicas varían con respecto al fluido considerado y a la temperatura. Además, en algunos casos dependen también de la frecuencia (ω) de cizallamiento. Por lo tanto, un fluido puede tener un comportamiento muy viscoso a una cierta frecuencia o un comportamiento elástico a otra frecuencia.

Lo que nos permite representar la respuesta del material en la figura 4:

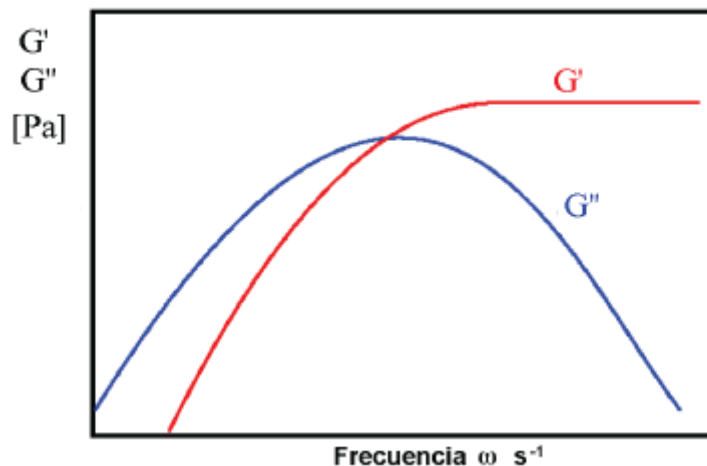


Figura 4 Respuesta de un material ideal (Modelo de Maxwell) sometido a un ensayo oscilatorio⁽⁵⁾

Como podemos observar en la figura 4, a bajas frecuencias G'' es mayor que G' lo que implica que el material se comporta como un líquido. Al aumentar la frecuencia esta tendencia se invierte y cuando G' es mayor que G'' el material se comportara como un sólido. La frecuencia en la cual G' y G'' se intersectan da lugar al tiempo característico o tiempo de respuesta del material, el cual profundizaremos más adelante. Este

comportamiento “ideal” puede observarse en soluciones acuosas de surfactantes que forman micelas tipo esponja.⁽⁵⁾

Es interesante observar cual sería el comportamiento de un material real ante el mismo ensayo oscilatorio, para esto, observemos directamente la figura 5:

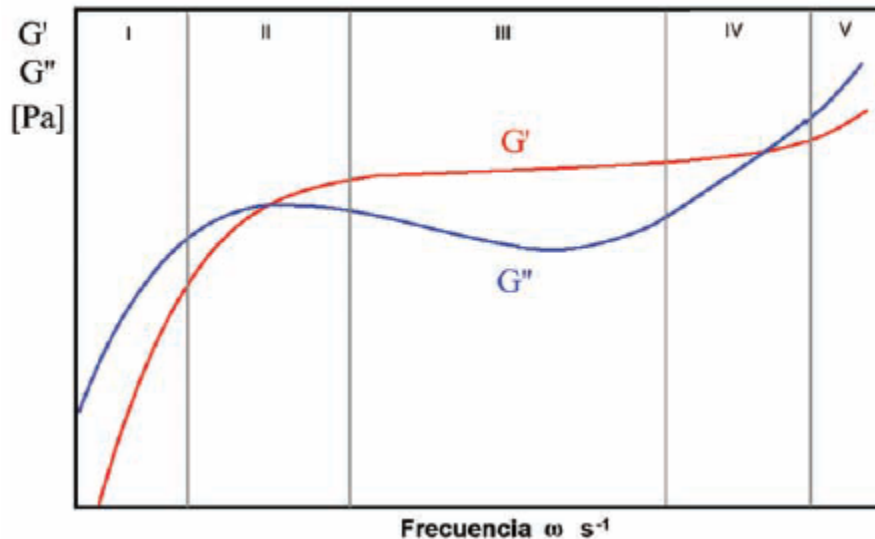


Figura 5 Respuesta de un material real sometido a un ensayo oscilatorio⁽⁵⁾

En este caso vemos que el material pasa por múltiples transiciones. Inicialmente tenemos la zona I conocida como la zona de flujo o terminal donde G'' predomina, y tal como habíamos expresado anteriormente esto indica un comportamiento viscoso, es decir, el material fluye. Todos los materiales, incluso los sólidos, exhiben esta zona pero en algunos casos la frecuencia necesaria para ponerla de manifiesto es tan pequeña que la mayoría de los instrumentos de medida no pueden determinarla. En esta zona G'' aumenta linealmente con la frecuencia mientras que G' lo hace al cuadrado de la frecuencia.⁽⁵⁾

La zona II, que es la zona de transición al flujo recibe este nombre porque si se observa a partir de frecuencias elevadas, cuando aún $G' > G''$, encontraremos el punto de intersección entre los módulos que marca el comienzo del comportamiento viscoso, el inverso de esta frecuencia de corte corresponde al tiempo de respuesta del material (λ), tal como el que se calcula por el modelo de Maxwell.⁽⁵⁾

La zona III, o zona gomosa, indica la “meseta” exhibida por G' , que puede considerarse esencialmente constante en ese rango de frecuencia. El comportamiento elástico predomina y el material se comporta como un sólido. En algunos casos cuando la pendiente según la cual disminuye G'' es suficientemente pequeña, es posible considerar que esta zona se aproxima a un comportamiento viscoelástico lineal.⁽⁵⁾

La zona IV corresponde a la zona de transición vítrea, G'' comienza a aumentar rápidamente y se produce otro corte entre los módulos, lo cual representa un segundo tiempo característico del material.⁽⁵⁾

Finalmente, la zona V corresponde a la región cristalina donde G'' predomina.⁽⁵⁾

En una experiencia típica usualmente se pueden observar dos zonas de las mencionadas anteriormente, dependiendo del tiempo de respuesta del material. Sin embargo, existen sistemas, como las soluciones de poliestireno de bajo peso molecular, donde todas las zonas están bien definidas. Experimentalmente, una manera de visualizar todas las zonas de comportamiento de un material complejo es aprovechando la dependencia de los módulos G' y G'' con la temperatura, lo que se conoce como el principio de superposición tiempo-temperatura.⁽⁵⁾

Otros ejemplos típicos de materiales viscoelásticos incluyen la masa de pan, polímeros fundidos y geles naturales o artificiales.⁽⁵⁾

1.2 GELES

Un gel es un semisólido que contiene un agente gelificante que le proporciona rigidez a la solución o dispersión coloidal. ⁽⁶⁾

La definición propuesta en 1993 por Almdal et al, ⁽⁷⁾ que un gel es un sólido suave, sólido o material tipo sólido que consiste al menos de dos componentes, uno del cual es un líquido presente abundantemente. El carácter elástico y resistente puede ser observado por el ojo humano, es consecuencia, en escala de tiempo en segundos, un gel no muestra un flujo bajo la influencia de su propio peso. La característica de un gel está definida en términos de dos mecanismos dinámicos: un módulo elástico (o de almacenamiento), $G'(\omega)$, que cuando se grafica con el tiempo (o frecuencia), exhibe una pronunciada meseta extendiéndose por el tiempo al menos en orden de segundos, y un módulo viscoso (o de pérdida), $G''(\omega)$ que es considerablemente menor que el módulo elástico en la región de la meseta. (Figura 6). ⁽⁸⁾

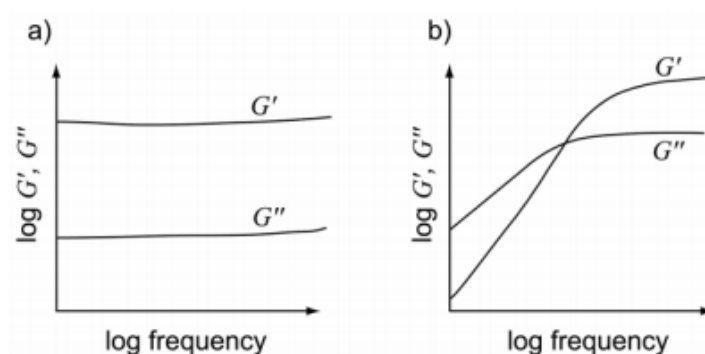


Figura 6 Espectro mecánico dinámico típico de una solución polimérica (sin entrecruzamiento se muestra en (a) y entrecruzamiento de un gel polimérico para comparación en (b)) ⁽⁸⁾

Los geles poliméricos son producto del entrecruzamiento de cadenas poliméricas, por la formación de enlaces covalentes (entrecruzamiento químico) o enlaces no covalentes (entrecruzamiento físico), (Figura 7). ⁽⁸⁾

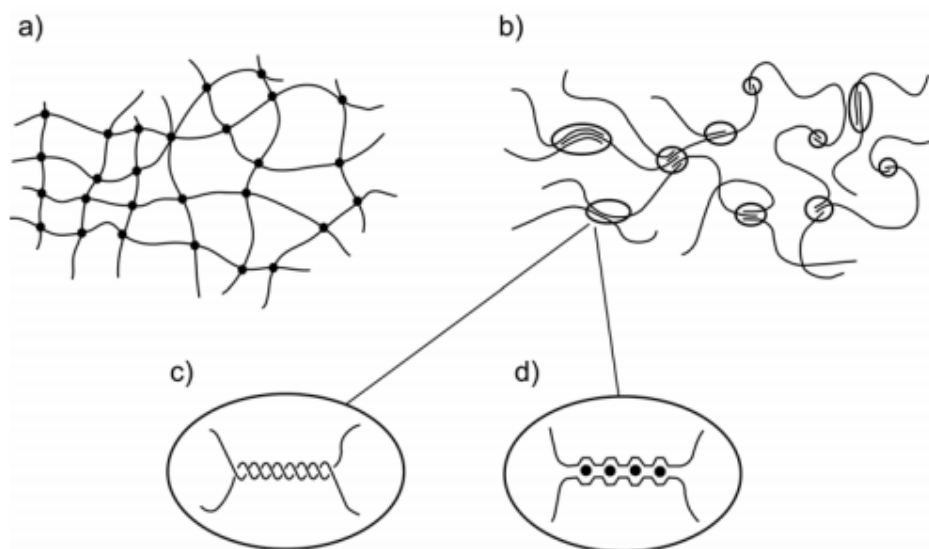


Figura 7 Ilustración esquemática de (a) entrecruzamiento químico (covalente) y (b) entrecruzamiento físico (no covalente) en geles poliméricos. Ejemplos de entrecruzamientos físicos son (c) formación de hélice por enlaces de hidrogeno, por ejemplo carragenina y agares; y (d) quelación de cationes (•), por ejemplo alginatos⁽⁸⁾

1.2.1 Hidrogeles

Un gel es una estructura polimérica entrecruzada, que por acción de un líquido experimenta hinchamiento permaneciendo insoluble sin perder su forma original. La conservación de la forma es el resultado de un balance entre las fuerzas intermoleculares dispersivas y cohesivas (dentro de las cuales se incluye la absorción del disolvente). Si el hinchamiento se produce por acción del agua se obtienen los denominados hidrogeles.⁽⁹⁾ Estos poseen un carácter hidrófilo debido a la presencia en su estructura molecular de grupos afines al agua (-OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, -SO₃H), la existencia de una red polimérica los hace insolubles en agua, y su suavidad y elasticidad se asocian con la hidrofiliicidad de los monómeros y la densidad de entrecruzamiento.⁽¹⁰⁾

La gran mayoría de las investigaciones en el área de los hidrogeles se ubican dentro de tres categorías: síntesis y caracterización del gel, modelamiento teórico del hinchamiento y aplicaciones. El desarrollo de estos materiales comenzó en 1960, cuando Wichterle y Lim publicaron los resultados obtenidos en aplicaciones biomédicas con hidrogeles de poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) y sus derivados. Actualmente, los hidrogeles son ampliamente

utilizados gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, naturaleza inerte, buenas propiedades mecánicas, y resistencia química y térmica, siendo particularmente útiles para la liberación controlada de productos farmacéuticos⁽⁹⁾ y fertilizantes agrícolas.⁽¹¹⁾

El gel puede contener partículas suspendidas así como contener un vehículo acuoso o alcohólico y también un agente gelificante que puede ser un almidón derivado de la celulosa, carbómeros, poloxámeros, silicatos de aluminio o magnesio, goma de xantana o sílica coloidal, entre otros.⁽⁶⁾ Muchos polímeros tienen una tendencia a formar agregados en soluciones moderadamente concentradas. Con los cambios de temperatura, las moléculas de polímero se mueven libremente en una distribución espacial al azar en solución siendo ligados por entrecruzamientos no-covalentes para la formación del gel.^{(12), (13) y (14)} Estos geles físicos que tienen la capacidad de formar, romper y/o modificar los enlaces responsables de mantener a la red polimérica unida, en función de un cambio de temperatura son llamados geles termorreversibles.^{(15) y (16)} En el régimen de viscoelasticidad lineal (pequeña deformación) cuando los módulos elásticos (G'), y viscoso (G''), son independientes de la frecuencia, ($G' > G''$), este comportamiento es típico de geles “verdaderos”, en donde se muestra una región de meseta del espectro viscoelástico del material.⁽¹⁷⁾ Por otro lado, algunas sustancias pueden fluir fácilmente, por lo que no pueden ser consideradas como geles verdaderos, por lo que se utiliza el término de gel “débil”.⁽¹⁸⁾ Se consideran geles débiles a aquellos materiales que se encuentran entre el gel verdadero y soluciones poliméricas o coloidales concentradas que tienen ordenamiento topológico de baja energía y corta duración.⁽¹⁹⁾

Muchos polímeros tienen una tendencia a formar agregados en soluciones diluidas o geles en soluciones moderadamente concentradas, Con los cambios de temperatura, las moléculas de polímeros se mueven libremente en una distribución espacial al azar en solución siendo ligados por entrecruzamientos no-covalentes para la formación de gel.⁽²⁰⁾

El punto de gel se define como el instante en el cual la estructura más grande del polímero se extiende a través de la muestra entera. El polímero en el punto del gel se llama un “gel crítico” la cual no es una estructura del equilibrio. La red continúa creciendo y este proceso de continuación de la gelificación se conoce como envejecer físico. En el cual el gel continúa

madurando, y los puntos de vinculación adicionales se hacen más fuertes con la difusión y la reorientación de las cadenas macromoleculares.⁽²⁰⁾

En la transformación de solución a gel (también llamado gelificación termoreverso) se puede repetir muchas veces el punto de gel. Cuando más alta es la concentración del polímero en la solución, mayor es el número de interacciones en la red física.⁽²⁰⁾

Los geles generalmente se forman a bajas temperaturas, pero existen excepciones que se comportan de manera inversa, el comportamiento de éstos es formarse a altas temperaturas y ser líquidos a bajas temperaturas (gelación inversa). Estos geles son más solubles en agua fría que en agua caliente como resultado de un incremento en la solvatación y la formación de puentes de hidrógenos a bajas temperaturas. En soluciones acuosas en un intervalo de concentración entre el 20 y el 30% p/p (en el caso particular de los poloxámeros) poseen la característica que los hacen peculiares y es la de presentar la gelación térmica- reversa, es decir que las soluciones en este intervalo de concentraciones son líquidas a temperaturas entre 4 y 5 °C observándose la formación de gel a temperatura ambiente o mayores.⁽²⁰⁾

A bajas temperaturas en solución acuosa las moléculas del polímero son rodeadas por una capa de hidratación. Sin embargo cuando la temperatura se incrementa, las cadenas hidrofílicas del copolímero se desolvatan como resultado del rompimiento de los puentes de hidrógeno que habían sido establecidas entre el solvente y estas cadenas. Este fenómeno favorece las interacciones hidrofóbicas entre las regiones, lo que genera la formación del gel. Debido a este proceso de deshidratación, los grupos hidroxilo se vuelven más accesibles y se piensa que el gel es de naturaleza micelar. Un líquido micelar es estable a bajas temperaturas y es transformado en un arreglo cúbico si se incrementa la temperatura para finalmente formar una fase de cilindros hexagonales a temperaturas elevadas. Esto es lo que sucede en la formación de un gel termoreverso.⁽²⁰⁾

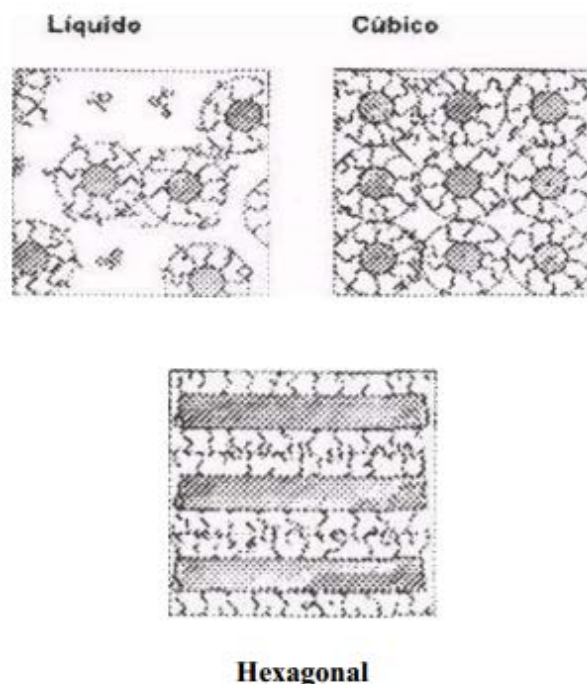


Figura 8 Arreglos que pueden presentar el polímero formador de gel al irse incrementando la temperatura

Varios polímeros biodegradables que se utilizan para la formulación de geles *in situ* incluyen goma de gelano, ácido algínico, xiloglucano, pectina, quitosano, poli (ácido DLlactico), poli (DL-lactida-co-glicolida), poloxámeros, kollicoat, eudragit y poli-caprolactona. Las formulaciones poliméricas de geles *in situ* ofrecen varias ventajas como una acción sostenida en comparación con los sistemas convencionales de administración de fármacos. Desde el punto de vista de la fabricación, la producción de tales dispositivos es menos complejo y por lo tanto disminuye la inversión y costo de fabricación.⁽²¹⁾

1.3 POLOXÁMEROS

Los poloxámeros son compuestos sintéticos que parten de un bloque de copolímero no iónico de polioxietileno-polioxipropileno, este tipo de polímeros se encuentran micronizados presentando un tamaño de partícula aproximado de 50 μm , la viscosidad de los poloxámeros se puede ver afectada por la adición de electrolitos, humectantes, alcoholes, tensoactivos aniónicos o valores de pH bajos.

Los copolímeros de tres bloques como son los poloxámeros sólidos porosos que tienden a ser ligeramente elásticos. Los geles físicos o reversibles como éstos tienen la capacidad de formar, romper o modificar los enlaces responsables de mantener a la red polimérica unida, ya que estas redes poseen las propiedades cohesivas de un sólido y las características difusivas de transporte de un líquido.

Las soluciones acuosas de poloxámero son estables en presencia de ácidos, bases e iones metálicos. Los poloxámeros más comúnmente utilizados incluyen el grado al cual son solubles con agua y con la designación “F” en cada uno se refiere a la forma de su hojuela. Ejemplo: poloxámero 188 (grado F-68) o el poloxámero 407 (grado F-127).

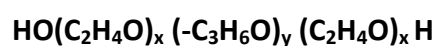
Los poloxámeros son más solubles en agua fría que en agua caliente, como resultado de un incremento en la solvatación y de la formación de puentes de hidrógeno a bajas temperaturas. Soluciones acuosas en un intervalo de concentraciones entre el 20 y el 30% p/p poseen una característica que los hace peculiares y que es la de presentar la gelación térmica reversa, es decir que son soluciones en ese intervalo de concentración a temperaturas entre 4 y 5 °C, pero la formación de un gel es apreciada a temperatura ambiente. Este proceso en el que se forma el gel es reversible al enfriar el gel.

A bajas temperaturas en soluciones acuosas, las moléculas de los poloxámeros son rodeadas por una capa de hidratación, sin embargo cuando la temperatura se incrementa, las cadenas hidrofílicas del copolímeros se desolvatan como resultado del rompimiento de los puentes de hidrógeno que habían sido establecidos entre el solvente y estas cadenas etilénicas. Debido a este proceso de deshidratación, los grupos hidroxilo se vuelven más accesibles y se piensa que el gel es micelar. Un líquido en fase micelar es estable a bajas temperaturas y es transformado en un arreglo cúbico si se incrementa la temperatura, para finalmente formar una fase de cilindros hexagonales.

1.3.1 Estructura condensada del poloxámero



1.3.2 Fórmula general



1.3.3 Forma estructural

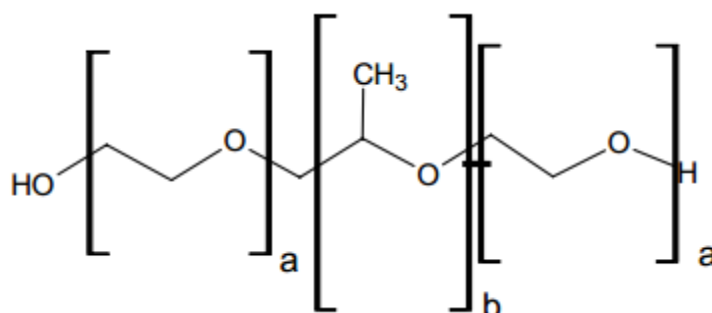


Figura 9 Estructura del poloxámero

1.3.4 Usos del poloxámero

Se emplea en la industria farmacéutica para mejorar la disolución de principios activos, como agente de recubrimiento de tabletas, como agente de dispersión o lubricante entre otros. También se emplea para la formación de geles o en la industria cosmética en los geles colorantes para el cabello.

1.3.5 Características principales

Estos compuestos en si tienen la propiedad de que el material tiene la característica de ser termoreverso y de gelación inversa puesto que la máxima viscosidad de estos se da a temperaturas elevadas entre 60 y 75°C.

1.3.5.1 Aspecto

Esta sustancia tiene la forma de microesferas blancas a un ligero amarillo con un débil olor.

1.3.5.2 Solubilidad

El poloxámero es soluble en agua dándonos una solución opalescente, es soluble en etanol, insoluble en éter dietílico y ácidos grasos; la solubilidad es selectiva en solventes orgánicos por ejemplo, 40% en cloroformo, 20% en acetonitrilo y 2% en acetona.

1.4 QUITOSANO

La estructura molecular de la quitina (véase la Figura 10) presenta similitudes con la de la celulosa; la diferencia entre sus cadenas radica en el segundo carbono, el cual presenta un grupo acetamida en la quitina y un grupo hidroxilo en la celulosa.⁽²²⁾ Básicamente la quitina es un polímero de cadena lineal formado por poli[β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-Dglucopiranosas], con un peso molecular alto.⁽²³⁾

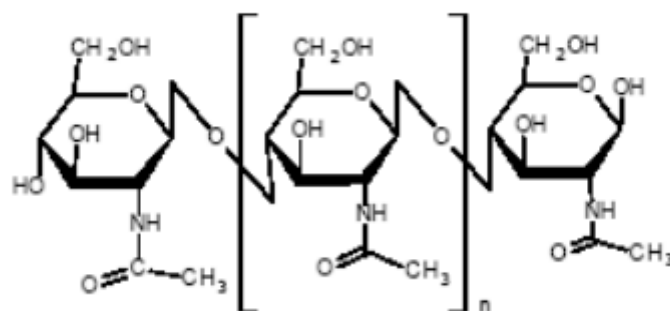


Figura 10 Estructura molecular de la quitina

Por otra parte, el quitosano (Figura 11) es el producto parcialmente desacetilado de la quitina. Es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de β -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranosas (D-glucosamina) y β -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranosas (Nacetil-D-glucosamina);⁽²⁴⁾ presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada mediante enlaces de hidrógeno entre los monómeros que lo forman.⁽²⁵⁾

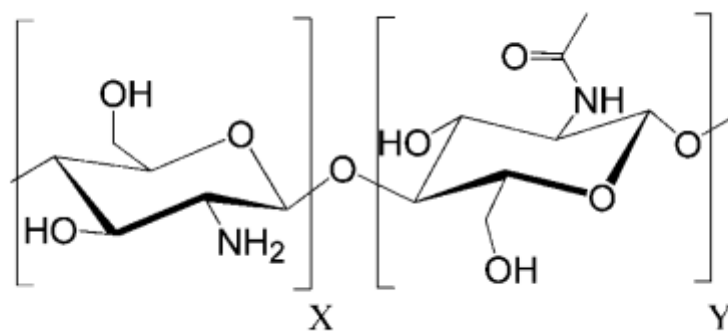


Figura 11 Estructura molecular del quitosano

La capacidad del quitosano de formar películas o soportes ha permitido su aplicación dentro de los campos de ingeniería de tejidos y liberación de fármacos, debido tanto a sus propiedades mecánicas como a su biodegradación.⁽²⁶⁾ Los soportes de quitosano pueden servir para mantener, reforzar y en algunos casos organizar la regeneración tisular; como matriz puede ser utilizada para liberar materiales bioactivos o influenciar directamente el crecimiento celular. En aplicaciones que involucran cultivo celular se requiere la incorporación de matrices poliméricas biodegradables, las cuales deben contar con una microestructura porosa y compatibilidad con las células en crecimiento.⁽²⁵⁾

Las condiciones usadas para la desacetilación determinan el peso molecular del polímero y el grado de desacetilación (DD). Los grupos amino primarios en la molécula que son reactivos, proporcionan sitios para una variedad de fijación grupo lateral empleando condiciones de reacción suaves (Fig. 11). Además, los rasgos característicos de quitosano tales como ser catiónico, hemostático e insolubles a pH alto, se pueden invertir por sulfatación de la amina que hace que la molécula sea aniónica y soluble en agua, con la introducción de propiedades anticoagulantes. Los grupos laterales unidos en quitosano proporcionan materiales versátiles con una funcionalidad específica, alterar las propiedades biológicas o modificar las propiedades físicas.⁽²⁷⁾

1.4.1 Relación entre sus propiedades y su estructura

El quitosano tiene su principal diferencia estructural en la proporción relativa de N- acetyl-D- glucosamina y residuos de D- glucosamina, que proviene específicamente de los cambios estructurales. Esta diferencia en la estructura da lugar a varios lotes de quitosano que se distinguen sobre la base de su DD y peso molecular. El DD y el peso molecular afectan directamente a las propiedades químicas y biológicas del polímero (Tabla 1).⁽²⁷⁾

Tabla 1 Relación entre parámetros estructurales y propiedades⁽²⁷⁾

Propiedad	Característica estructural
Solubilidad	↑DD
Cristalinidad	↓DD
Biodegradabilidad	↓DD, ↓Peso molecular
Viscosidad	↑DD
Biocompatibilidad	↑DD
Mucoadesion biológica	↑DD, ↑ Peso molecular
Analgésico	↑DD
Antimicrobiano	↑DD, Peso molecular
Aumento en los efectos de Permeación	↑DD
Antioxidante	↑DD, ↓ Peso molecular
Hemostático	↑DD

↑Directamente proporcional a la propiedad - ↓Inversamente proporcional a la propiedad

La quitina es insoluble en la mayoría de disolventes orgánicos, el quitosano es fácilmente soluble en soluciones ácidas diluidas por debajo de pH 6,0, debido a la cuaternización de los grupos amino que tienen un valor de pKa de 6,3 haciendo al quitosano un polielectrolito catiónico soluble en agua. La presencia de los grupos amino indica que el pH altera sustancialmente el estado de carga y las propiedades del quitosano. A pH bajo, estas aminas consiguen protonarse y se cargan positivamente y hace del quitosano un polielectrolito catiónico soluble en agua. Por otra parte, cuando el pH aumenta por encima de 6, las aminas de quitosano se desprotonan y el polímero pierde su carga y se convierte en insoluble. La transición soluble en insoluble se produce en su valor de pKa alrededor de pH entre 6 y 6,5.

El valor de pKa depende en gran medida el grado de N-deacetilación, la solubilidad del quitosano es dependiente del DD y el método de desacetilación utilizado. Aparte de DD, el peso molecular es también un parámetro importante que afecta significativamente la solubilidad y otras propiedades. La viscosidad de la solución de quitosano aumenta con un aumento en la concentración de quitosano, disminución de la temperatura y con el aumento del DD. ⁽²⁷⁾

1.5 KOLLIKOAT GRADO MAE

Los grados de Kollicoat MAE comprenden dos tipos que difieren en composición y forma de la disponibilidad. Kollicoat MAE 30DP es una dispersión acuosa y Kollicoat MAE 100P un polvo para la preparación de dispersiones acuosas o soluciones en disolventes orgánicos. ⁽²⁸⁾

1.5.1 Estructura química y composición

La estructura química de ambos grados de Kollicoat MAE consiste en un copolímero de ácido metacrílico- acrilato de etilo, los dos monómeros están unidos en la relación molar de 1:1. Este es un copolímero aniónico que puede ser neutralizado por bases tales como hidróxido de sodio. La figura 12 ilustra la estructura química. El peso molecular medio (Mw) es de aproximadamente 250.000. ⁽²⁸⁾

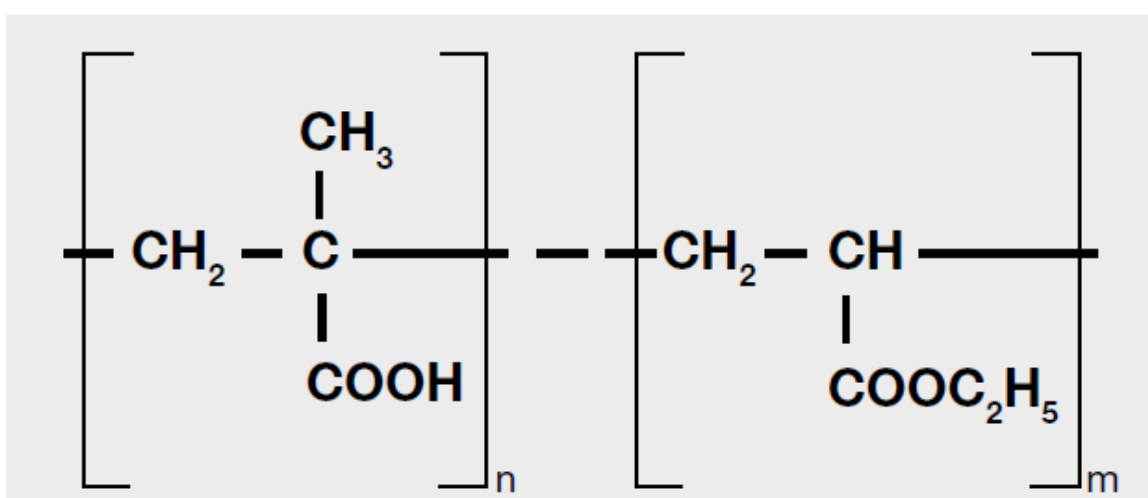


Figura 12 Estructura química del polímero Kollicoat grado MAE ⁽²⁸⁾

La dispersión acuosa Kollicoat MAE 30DP tiene un contenido de sólidos de 30%. Además del copolímero ácido metacrílico-acrilato de etilo, que contiene dos estabilizadores; esta constelación impide la sedimentación y la separación de los copolímeros. La composición exacta se muestra en la Tabla 2. Los componentes grasos de los dos estabilizadores son de origen vegetal. ⁽²⁸⁾

Tabla 2 Composición del Kollicoat MAE 30DP ⁽²⁸⁾

Componentes	Contenido
Copolímero ácido metacrílico-acrilato de etilo (1:1)	27.0%
Polisorbato 80	2.3%
Sulfato lauril de sodio	0.7%
Agua	70%

1.5.2 Solubilidad, miscibilidad, dispersión

Kollicoat MAE 30DP es miscible en agua en cualquier proporción sin perder su aspecto lechoso, blanco. Kollicoat MAE 30DP también se disuelve fácilmente en una proporción de 1:5 (v/v) en 2-propanol, etanol y acetona, formando una solución clara a ligeramente opalescente. Cuando se añade inicialmente el disolvente orgánico, se forma un precipitado, sin embargo, esta se vuelve a disolver en la adición de más disolvente. ⁽²⁸⁾

1.6 GELES *IN SITU*

Los fármacos de liberación controlada y sostenida se han convertido en un estándar moderno de diseño farmacéutico y una intensa investigación en la consecución de productos de mejor eficacia, fiabilidad y seguridad. Este interés ha sido impulsado por las ventajas mostradas por estos sistemas, como la facilidad de administración y la frecuencia reducida de administración, el cumplimiento del paciente y su comodidad. Entre los sistemas de liberación modificada pueden considerarse los geles y entre ellos han cobrado gran interés los de gelificación *in situ*. La formación de éstos depende de factores como la modulación de

la temperatura, cambio de pH, presencia de iones e irradiación ultravioleta. Así, se logra que se libere el fármaco de una manera sostenida y controlada. ⁽²¹⁾ Las soluciones que se someten a transformaciones sol-gel cuando reúnen las condiciones fisiológicas pueden servir como un sistema de suministro de fármaco de gelificación *in situ*, es decir, una formulación inyectable parenteral que se transforma en un sistema de administración de fármacos en gel en condiciones fisiológicas. Las alteraciones en el pH, fuerza iónica, disolvente o temperatura, pueden afectar la gelificación. La formación de complejos sistemas gelificantes *in situ* utilizando polietilenglicol (PEG), ácido polimetacrílico (PMA) o ácido poliacrílico (PAA), quitosano, poloxámeros, etc; como un sistema de suministro de fármacos inyectables es un sistema posible. A pH bajo, la solubilidad acuosa del complejo es mínimo, pero una solución viscosa clara se obtiene cuando una pequeña cantidad de etanol se añade. Cuando esta solución que contiene un fármaco modelo se inyecta en el medio fisiológico, la gelificación se inicia por una membrana formada alrededor del líquido inyectado causada por difusión de etanol y la infusión de líquidos. Como el tiempo avanza, el complejo se disocia en sus constituyentes polímeros solubles en agua, liberando el fármaco atrapado en el gel. Estos polímeros serán excretados por vía renal debido a su bajo peso y alta solubilidad en agua. ⁽²⁹⁾

Existen diversos mecanismos definidos en términos generales que provocan la formación de gel *in situ* de biomateriales: Estímulos fisiológicos (por ejemplo, temperatura y pH), cambios físicos en biomateriales (por ejemplo, intercambio de disolvente e hinchamiento), reacciones químicas (por ejemplo enzimáticos, químicos y polimerización foto-iniciada). ⁽²¹⁾

1.6.1 Formación *In situ* basada en estimulaciones fisiológicas

1.6.1.1 Temperatura

La sensibilidad a la temperatura de los hidrogeles es probablemente la clase más estudiada. El uso de biomaterial cuyas transiciones de sol-gel se activa por aumento de la temperatura es una forma atractiva de acercarse a la formación *in situ*. El intervalo de temperatura crítico ideal es el correspondiente a la temperatura ambiente y fisiológica, de tal manera que la manipulación clínica se facilite y ninguna fuente externa de calor distinta sea necesaria para activar la gelificación. ⁽²¹⁾

Por conveniencia, los hidrogeles sensibles a la temperatura se clasifican en termosensibles negativos, termosensibles positivos y geles termorreversibles. Los hidrogeles termosensibles negativos tienen una temperatura crítica de solución baja (LCST) y se contrae al momento de calentarse por encima de LCST. Los polímeros con baja temperatura crítica (LCST) presentan una transición entre la temperatura ambiente y la fisiológica. Uno de los polímeros más utilizado e investigado que presenta una LCST de transición útil es poly(Nisopropylacrynide)(PNIPAAm). Los hidrogeles termosensibles positivos tienen una temperatura de solución crítica superior (UCST). La contracción del hidrogel se da cuando se pone a enfriar por debajo de la UCST. Los polímeros empleados son poli (ácido acrílico) (PAA) y policrilamida (PAAm), etc; tienen una dependencia positiva a la temperatura de hinchamiento.⁽²¹⁾

Los geles más comúnmente utilizados son los termorreversibles, entre otros, pueden ser preparados a partir de poli (óxido de etileno)-b-poli (óxido de propileno)-b-poli (óxido de etileno) (Pluronic[®], Tetronics[®], poloxámero). La solución de polímero es un líquido a temperatura ambiente y geles a la temperatura corporal.⁽²⁹⁾ Cuando se inyecta como una solución en el cuerpo, el material forma un gel firme y estable dentro de minutos. Se mantiene en el sitio de la inyección y proporciona tiempos de absorción de menos de una semana a varios meses. Tal sistema sería fácil de administrar en la cavidad corporal deseada.⁽³⁰⁾

1.6.1.2 pH

Otra formación de gel *In situ* basada en estímulos fisiológicos es la formación de gel inducida por cambio en el pH. Todos los polímeros sensibles al pH contienen grupos ácidos o básicos que o bien aceptan o liberan protones en respuesta a cambios en el pH del medio ambiente. Los polímeros con un gran número de grupos ionizables son conocidos como poli electrolitos. El hinchamiento de hidrogel aumenta a medida que aumenta el pH externo en el caso de grupos débilmente ácidos (aniónicos), pero disminuye si el polímero contiene grupos débilmente básicos (catiónicos).⁽²¹⁾ Las mezclas de poli (ácido metacrílico) (PMA) y polietilenglicol (PEG) han sido usadas como sistemas de gelación sensibles al pH.⁽³¹⁾

1.6.1.3 Formación *in situ* basada en un mecanismo físico -Hinchamiento-

La formación *in situ* también se puede producir cuando el material absorbe el agua de los alrededores del ambiente y se expande en el espacio deseado.⁽³²⁾ Algunas sustancias empleadas son el myverol 18-99 (glicerol mono-oleato).⁽³³⁾

1.6.1.4 Difusión

Este método implica la difusión del disolvente de la solución de polímero en el tejido circundante y los resultados de la precipitación o la solidificación de la matriz de polímero (29). N-metilpirrolidona (NMP) ha sido usado para este tipo de sistemas.⁽³⁴⁾

1.6.2 Formación *in situ* basada en reacciones químicas

Las reacciones químicas que produce la gelificación *in situ* pueden implicar la precipitación de sólidos inorgánicos de soluciones iónicas sobresaturadas, procesos enzimáticos y procesos foto-iniciados.⁽²⁹⁾

1.6.3 Reticulación iónica

Los polímeros pueden experimentar una transición de fase en presencia de varios iones. Mientras α -carragenina forma geles rígidos y quebradizos en respuesta de una pequeña cantidad de K^+ , α -carragenina forma geles elásticos principalmente en presencia de Ca^{2+} . Goma xantana es un polisacárido aniónico que se somete en gelificación *in situ* en la presencia de cationes mono-y divalentes, incluyendo Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ .⁽³⁴⁾

1.6.4 Entrecruzamiento enzimático

La formación *in situ* catalizada por enzimas naturales no se ha investigado ampliamente, pero parece tener algunas ventajas sobre los enfoques químicos y fotoquímicos. Por ejemplo, un proceso enzimático opera de manera eficiente en condiciones fisiológicas sin necesidad de productos químicos potencialmente dañinos, tales como monómeros e

iniciadores. Polímeros catiónicos sensibles al pH que contienen insulina y glucosa oxidasa inmovilizada puede hincharse en respuesta al nivel de glucosa en sangre liberando la insulina atrapado en una manera pulsátil. Un ajuste en la cantidad de enzima también proporciona un mecanismo conveniente para controlar la velocidad de formación de gel, que permite a las mezclas ser inyectadas antes de la formación de gel. ⁽³⁴⁾

1.6.5 Foto-polimerización

La foto-polimerización se utiliza comúnmente para la formación *in situ* de los biomateriales. Una solución de monómeros o macrómeros reactivo y el iniciador se puede inyectar en un sitio de tejidos y la aplicación de la radiación electromagnética se usa para formar gel. Estos sistemas se pueden diseñar fácilmente para ser degradados por procesos químicos o enzimáticos. Las foto-reacciones proporcionan tasas rápidas de polimerización a temperatura fisiológica. Además, los sistemas se colocan fácilmente en volúmenes en forma de complejos que conducen a la formación de un implante. La quetona, tal es 2,2 dimetoxi-2-fenil acetofenona, es usada para la polimerización foto inicializada con UV. Estos sistemas pueden ser degradados por procesos enzimáticos, etc. ⁽³⁴⁾

1.7 PROGESTERONA

La progesterona, hormona progestacional fisiológica, es un derivado de pregnano y químicamente relacionado con los corticosteroides, sólo se diferencia de la corticosterona por un grupo hidroxilo que falta en el C-21. ⁽³⁵⁾

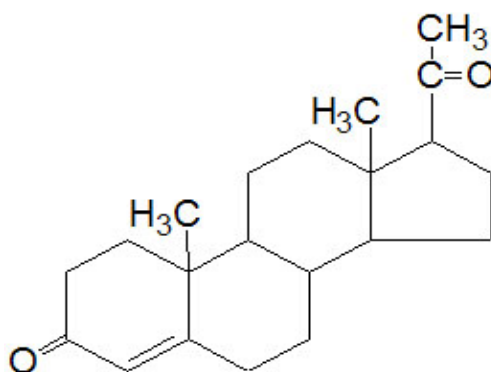


Figura 13 Estructura de la progesterona

La actividad progestacional de la progesterona se debe principalmente a que inicia el cambio de la fase proliferativa a la fase secretora del útero, disminuye la formación de moco en el cuello uterino y el aumento de viscosidad de la mucosidad cervical, inhibe la liberación de LH de la pituitaria y, por lo tanto, inhibe la ovulación, aumenta la temperatura basal del cuerpo y mantiene el embarazo en dosis altas, la progesterona también tiene efectos catabólicos.⁽³⁵⁾

La progesterona tiene una duración relativamente corta de actividad después de la administración parenteral y poca actividad después de una administración oral. En plasma la vida media es de aproximadamente 20 minutos.⁽³⁵⁾

1.8 APLICACIÓN DE LOS GELES DE PROGESTERONA EN BOVINOS

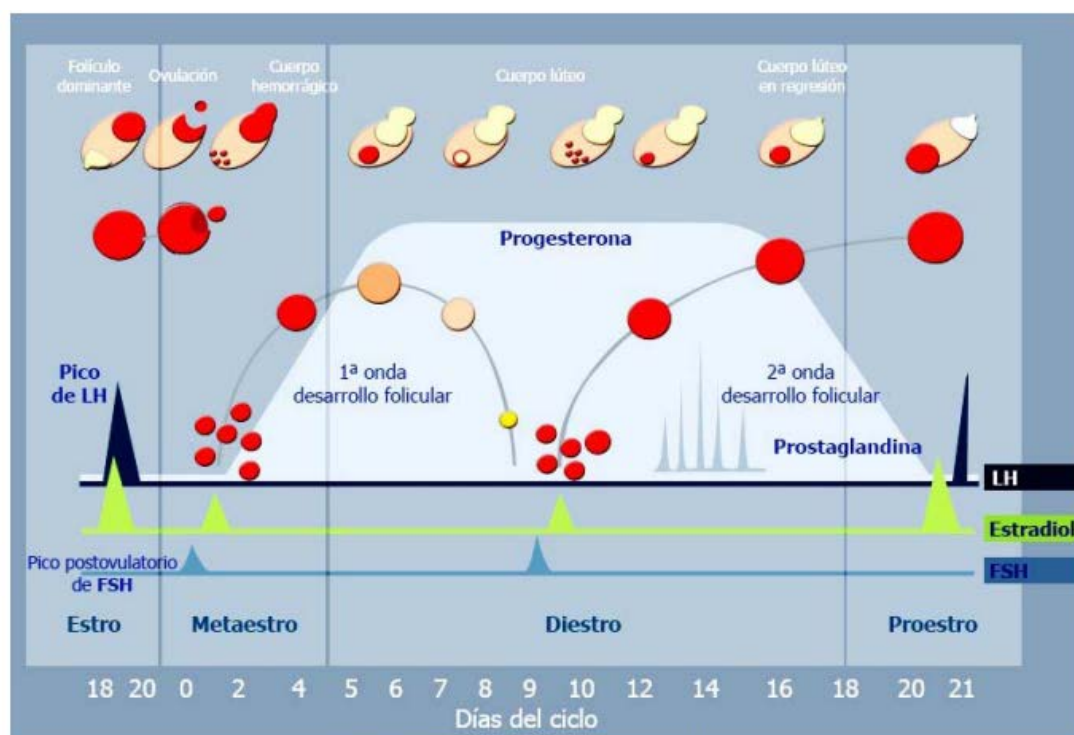
1.8.1 Proceso reproductivo de bovinos

El proceso reproductivo constituye la esencia de la renovación biológica en todas las especies. Una alta eficiencia reproductiva es requisito indispensable para el uso económico, tanto de la ganadería lechera como de la carne. La baja eficiencia reproductora se traduce en mermas directas en la producción láctea y cosecha de becerrada, e indirectamente en la producción anual de carne (menos becerros destetados). El proceso reproductivo está regulado por el sistema endocrino e influenciado fuertemente por las condiciones ambientales en que se desenvuelven los animales.⁽³⁶⁾

Una efectiva sincronización del celo ha sido la meta de muchos investigadores desde que la técnica de inseminación artificial está disponible. La administración de prostaglandina es el método más comúnmente utilizado para la sincronización de celo. Sin embargo, la detección de celo lleva mucho tiempo y mano de obra, depende de las influencias ambientales (Ej., mal piso e inclemencias climáticas) y suele ser ineficiente e imprecisa. Por lo tanto, en los últimos años se han desarrollado muchos protocolos para minimizar la necesidad de la detección de celos. El uso de progestágenos ha sido usado para extender la fase lútea, resultando en mayor cantidad de animales detectados en celos en un periodo más corto pero con menor fertilidad.⁽³⁷⁾

1.8.2 El ciclo estral

Los folículos ováricos en bovinos crecen en ondas (Fig. 8). Una onda folicular consiste en la emergencia sincrónica de un grupo de folículos antrales con un diámetro de 4-5 mm. Un folículo (dominante) se selecciona mientras el resto de los folículos (subordinados) se vuelven atrésicos.⁽⁵⁾ Los ciclos estrales en bovinos están compuestos de 2 ó 3 ondas foliculares. Tanto en ciclos de 2 ondas como en los de 3, la emergencia de la primera onda folicular ocurre el día de la ovulación (día 0). En ciclos de 2 ondas, la segunda onda emerge los días 9 ó 10. En ciclos de 3 ondas, la segunda onda emerge los días 8 ó 9 y la tercera onda emerge los días 15 ó 16. El ciclo estral tiene una duración entre 20 y 23 días en ciclos de 2 y 3 ondas respectivamente (por lo tanto, la duración “promedio” del ciclo de 21 días no es muy común). El folículo dominante presente al momento de la luteólisis se convierte en el folículo ovulatorio y la emergencia de la siguiente onda folicular se retrasa hasta la próxima ovulación.⁽³⁷⁾



Adaptado. Fuente: Dr. Joel Hernández Cerón y MVZ Víctor Manuel Martínez Torres.

Figura 14 Ciclo estral en bovinos⁽³⁶⁾

El reclutamiento de ondas foliculares y la selección de un folículo dominante se realizan sobre la base de la respuesta diferencial a la FSH y la LH (Ginther et al., 1996). Los picos en las concentraciones de FSH en plasma (Adams et al., 1992) son seguidas, 1 ó 2 días más tarde, con la emergencia de una nueva onda folicular. Luego la FSH es suprimida por productos de los folículos en crecimiento (Ej. estradiol e inhibina). Encada onda, el folículo que primero adquiere receptores de LH se convierte en el folículo dominante, mientras que los subordinados (que siguen dependiendo de la FSH) sufren atresia (Adams et al., 1993; Adams, 1998). La supresión de la LH, como consecuencia de la secreción de progesterona del cuerpo lúteo (CL) termina causando que el folículo dominante interrumpa sus actividades metabólicas lo cual lleva a la regresión, a un nuevo pico de FSH y a la emergencia de una nueva onda folicular. La regresión luteal permite que aumente la frecuencia de pulsos de LH. El crecimiento del folículo dominante aumenta y se eleva la concentración de estradiol lo cual resulta en una retroalimentación positiva del eje hipotalámico hipofisiario, un pico de LH y la ovulación.⁽³⁶⁾

1.8.3 Presentaciones comerciales

Existen liberadores subcutáneos de progestágenos (que es una sustancia de acción similar a la progesterona que favorece el curso normal de la gestación) por ejemplo los productos que comercialmente se denominan “CRESTAR®” Y “SINCROMATE®” a través de implantes combinados con soluciones inyectables que comprenden los compuestos de “norgestomet” y “valerato de estradiol”, existen otros productos como el denominado comercialmente “CIDR®” el cual libera en forma prolongada progesterona basado en un resorte de silicón impregnado de progesterona de aplicación vaginal y las funciones para las que se recomiendan en la sincronización de celos y no para favorecer la fertilidad. Existen también otros implantes de progesterona y estradiol de aplicación subcutánea “SYNOVEX B®” usados para la engorda de ganado bovino. Los implantes subcutáneos actuales con progestágenos y el liberador de silicón con progesterona intravaginal tiene como función la sincronización o se usan incluso hasta para la inducción del celo en vacas, mas no como favorecedores de la fertilidad.

También hay soluciones de Progesterona, “PROGESTERONA®” que se aplican a los animales, pero no presentan una liberación prolongada durante días de la sustancia activa, es decir, la

liberan en forma normal con circulación en niveles plasmáticos de 12 a 24 hrs. Otros productos en el mercado con progesterona inyectable combinada con vitaminas, “PROGESVIT A-E®”, “PROGESTYN®” Y “PROGESVIT A-E®” que se aplican a los animales, sin liberación prolongada a más de 24 hrs.

Existen también diversas aplicaciones veterinarias vaginales de liberación prolongada de progesterona, como son resortes de silicón impregnados de progesterona “CIDR-B®” o esponjas vaginales impregnadas también de progestágenos “CHRONO GEST®” que son utilizadas en la especie de ovinos y cabras para la sincronización de celos de las hembras en las que se aplican, pero la diferencia es que no son comprimidos y son utilizados para diferentes actividades zootécnicas de las que se utilizan los comprimidos.

1.9 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

La cromatografía es una antigua técnica instrumental que ha evolucionado enormemente en los últimos años, principalmente a partir de la década de los setenta, con lo que, inicialmente concebida como método de separación, ha llegado a convertirse en una fuente inagotable de métodos de análisis. Pocos métodos de análisis químico son tan específicos para un analito en particular, ya que tanto las fases previas de extracción como los procedimientos cromatográficos son llevados a cabo en función del tipo de molécula.⁽³⁸⁾

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es una técnica analítica extensamente usada en la industria. Es usada para separar y analizar los componentes a través de la transferencia de masa del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil. Esta técnica es utilizada en distintas actividades, como análisis de comida, fármacos y agroquímicos.⁽³⁹⁾

La técnica de HPLC utiliza como fase móvil un líquido que separa los componentes de la mezcla. Los componentes primero son disueltos en un solvente y después forzado a fluir (fase móvil) a través de la columna (fase estacionaria) bajo condiciones de alta presión. La interacción del soluto con la fase móvil y estacionaria pueden ser manipuladas a través de diferentes elecciones de solventes y fases estacionarias. Las unidades individuales que forman un sistema cromatográfica de HPLC son mostradas en la figura 15.⁽³⁹⁾

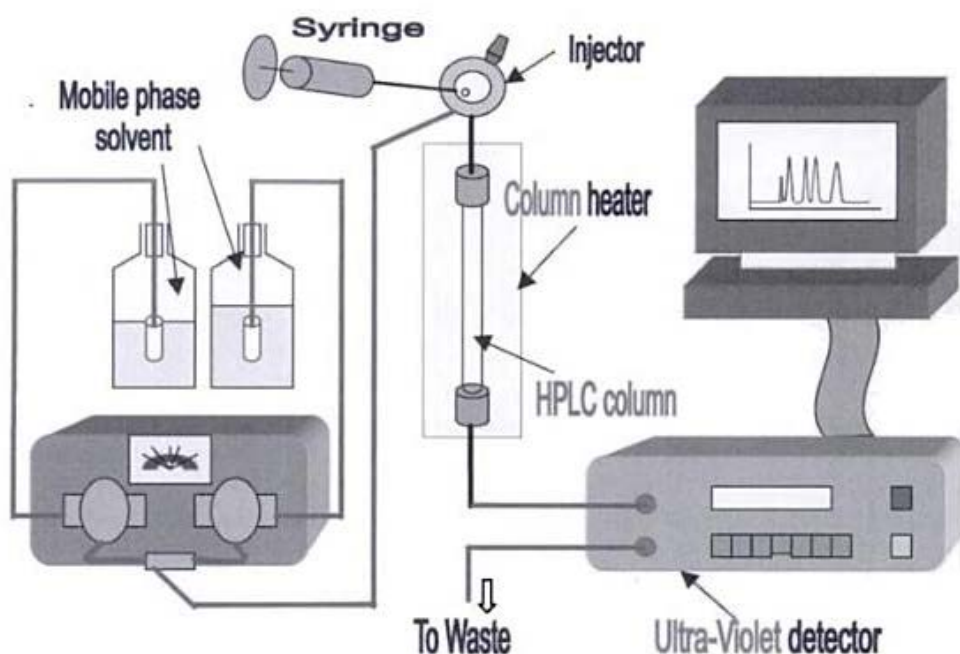


Figura 15 Diagrama de un cromatógrafo HPLC con detector UV⁽³⁹⁾

El proceso cromatográfico contempla la separación de los componentes de una mezcla, para ello, una muestra de la mezcla (o el extracto de una muestra) será disuelta en una fase móvil (en este caso un líquido). La fase móvil es impulsada a través de una fase inmóvil, que debe ser inmisible con ella, a la que se conoce como fase estacionaria, y que puede ser sólida o líquida (cromatografía líquido-sólido o cromatografía líquido-líquido –el líquido puede estar embebido o unido a partículas sólidas-). Las fases son escogidas de tal forma que los componentes de las muestras presenten diferencias en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas (solubilidad, tamaño, fuerza iónica, polaridad, afinidad, etc.) para cada fase. Las interacciones químicas entre la fase móvil y la muestra, y entre la muestra y la fase estacionaria, determinan el grado de migración y separación de los compuestos contenidos en la muestra. Un componente que interactúe más con la fase estacionaria realizará un "viaje" más largo a través de ella que otro componente que tenga más interacción con la fase móvil. Como resultado de estas diferencias en la movilidad de los componentes de una muestra estos se separarán uno de otro.⁽³⁸⁾

En la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil, donde es soluble, y es transportada a

través de una columna por el flujo continuo de fase móvil a alta presión. La fase estacionaria está formada por partículas de pequeño diámetro, por tanto, con una gran superficie de interacción, contenidas en la columna. Este proceso cinético es conocido con el nombre de elución. La velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna, con respecto a los demás presentes en la mezcla, está determinada por el tiempo que permanece en la fase móvil.⁽³⁸⁾

1.9.1 Aplicaciones⁽³⁸⁾

La HPLC se puede utilizar como técnica preparativa y como técnica analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado. La elección de la fase estacionaria y la fase móvil, del flujo al que se va a impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria e incluso de la temperatura a la que se va a realizar la cromatografía, permitirán una correcta separación del analito de otros compuestos.

Cada componente de una solución tiene unas características determinadas bajo ciertas condiciones cromatográficas, y debe conseguirse que la migración del componente y de los contaminantes a través de la columna sea lo suficientemente distinta para que dicho compuesto sea separado de los demás del extracto, para permitir su posterior identificación y cuantificación. A este proceso se le denomina purificación.

La identificación de compuestos es la parte más importante de muchos trabajos en HPLC. Para identificar compuestos se debe seleccionar un sistema de detección que mida diferentes propiedades físico-químicas de la molécula. Entra en juego el tipo de separación y la naturaleza de la detección, sea absorbancia, conductividad, fluorescencia, relación masa/carga, etc.

En la cromatografía líquida, la fase móvil eluye de la columna durante un tiempo determinado conteniendo cantidades muy diferentes de solutos que pasan a través de un sistema de detección. El instrumento detecta la presencia del soluto que es convertida en una señal eléctrica y ésta puede ser tratada por un procesador de datos. Se representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución, y al gráfico obtenido se le conoce como cromatograma. Los solutos se representan gráficamente como una serie de picos que

pueden identificarse por su anchura, altura o área. Para la cuantificación de compuestos se utiliza la señal del detector haciendo que sea proporcional a la cantidad o a la concentración inyectada de analito.

Es preciso confeccionar previamente una curva de calibración para establecer el factor de respuesta como la pendiente de la medida del detector frente a las concentraciones de los calibradores. Para ello se realiza la inyección de una serie de soluciones del compuesto con concentraciones conocidas para su detección. Los cromatogramas obtenidos muestran una serie de picos cuyas áreas se correlacionan con la concentración del compuesto inyectado. Se puede también trabajar con estandarización interna donde, tanto a los compuestos con concentraciones conocidas como a las muestras a cuantificar, se les añade una cantidad conocida de un segundo compuesto conocido como estándar interno. El área del estándar interno sirve para estandarizar puesto que las pérdidas sufridas durante todo el proceso analítico (extracción, cromatografía, etc.) son constantes para todos los compuestos. La representación de la relación del área o la altura del analito respecto a la del estándar interno frente a la concentración del analito proporciona una curva de calibración que corrige las pérdidas analíticas.

1.9.2 Tipos de cromatografía⁽³⁸⁾

El tipo de cromatografía en HPLC viene determinado por la fase móvil y, fundamentalmente, por la fase estacionaria. Existen diferentes tipos de fase estacionaria disponibles en forma de soportes de distintos materiales (polímeros, carbón, hidroxiapatita, agarosa o sílica) contenidos en una columna. Pueden ser de diferentes tamaños, diámetros, tamaños de poro, o que tengan unidos diferentes compuestos activos (antígenos, anticuerpos, grupos químicos, grupos polares).

1.9.2.1 Líquido-Sólido

Se basa en la polaridad. Los compuestos que poseen grupos funcionales capaces de producir enlaces fuertes de hidrógeno se unirán más fuertemente a la fase estacionaria que los

compuestos menos polares. Así, los compuestos menos polares eluirán de la columna más rápidamente que los altamente polares.

1.9.2.2 Líquido-Líquido

También se basa en la polaridad. Sin embargo, esta técnica es más apropiada para muestras de mediana polaridad que son solubles en disolventes de débil polaridad a polares orgánicos. La separación de noelectrolitos se consigue teniendo en cuenta las polaridades de muestra y fase estacionaria y usando una fase móvil que posea una polaridad marcadamente diferente.

1.9.2.3 Filtración en gel

Se basa en el tamaño molecular de los compuestos que van a ser analizados. La fase estacionaria está formada por partículas porosas (sílica, no-sílica). Los componentes de mayor tamaño serán excluidos del interior de las bolas y así eluirán primero. Los compuestos más pequeños podrán entrar en las partículas y eluirán de acuerdo con su capacidad para salir de los poros en los que fueron internados.

1.9.2.4 Fase normal

Se basa en la hidrofilia y la lipofilia usando una fase estacionaria polar y una fase móvil menos polar. Así, los compuestos hidrofóbicos eluyen más rápidamente que los hidrofílicos. La fase está constituida por una matriz de sílica a la que se unen grupos silanol, amino y nitrilo que le confieren polaridad relativa respecto a la fase móvil.

1.9.2.5 Fase reversa

También se basa en la hidrofilia y la lipofilia. La fase estacionaria consiste en una matriz de sílica empacada que lleva unida covalentemente una cadena alquílica de carbonos (por ejemplo, C-8 significa que se incorpora una cadena octil y C-18 una octadecil). La más hidrofóbica es, en este caso, la fase estacionaria, eluyendo los compuestos hidrofílicos más

rápidamente que los hidrofóbicos, que interaccionan con la fase estacionaria. También hay empaquetamientos poliméricos alternativos a la sílice que ofrecen similares características con mayor resistencia dinámica y más amplio rango de estabilidad de pH. Existen dos variantes de la cromatografía en fase reversa:

1.9.2.6 Supresión iónica

Se utiliza modificando el pH de la fase móvil para ácidos y bases débiles, de forma que el analito pasa a ser más lipófilo y se mejora la separación porque se establece más interacción con la columna.

1.9.2.7 Formación de pares iónicos

Se utiliza para compuestos que tienen grupos funcionales biológicos que serán unidos a un contraión. El contraión se asocia al analito y lo desplaza del par iónico normal (corrientemente Na^+ o Cl^-) mejorando su hidrofobicidad. Para analitos catiónicos se utilizan grupos alquil o aril sulfonatos y para analitos aniónicos aminas cuaternarias.

1.9.2.8 De Intercambio iónico

Se basa en el intercambio selectivo de iones de la muestra por sus diferencias en signo y magnitud de carga iónica frente a los contraiones de la fase estacionaria. Se trata de columnas que contienen grupos funcionales que soportan cargas unidos a una matriz polimérica. Los iones funcionales están permanentemente unidos a la columna y cada uno tiene su contraión unido. La muestra es retenida porque reemplaza los contraiones de la fase estacionaria con sus propios iones. La muestra es eluida de la columna por cambio en las propiedades (pH, fuerza iónica) de la fase móvil, haciendo que esta desplace los iones de la muestra de la fase estacionaria.

1.9.2.9 Afinidad

Usa biomoléculas inmovilizadas que tienen una afinidad específica hacia el compuesto de interés. La separación ocurre cuando la fase móvil y la muestra pasan a través de la fase estacionaria. El compuesto o compuestos de interés de la muestra son retenidos mientras el resto de las impurezas y la fase móvil pasa a través. Los compuestos son luego eluidos cambiando las condiciones de la fase móvil (fuerza iónica, pH, sustancias caotrópicas).

1.9.3 Elución⁽³⁸⁾

En función de la composición de la fase móvil inyectada a la columna, la elución de moléculas puede ser de dos tipos: isocrática y en gradiente. También existen casos en los que se cambia totalmente la fase móvil en el transcurso de la cromatografía y se conoce como elución politípica.

1.9.3.1 Elución isocrática

Los compuestos eluyen usando una fase móvil de composición constante durante toda la cromatografía. Todos los compuestos acaban migrando a través de la columna hasta el final. Sin embargo, cada uno migra con una velocidad diferente, resultando en una relación de elución más rápida o más lenta. Este tipo de elución es bastante simple y barato, pero la resolución de algunos compuestos es cuestionable y el eluido puede no ser obtenido en un plazo de tiempo adecuado.

1.9.3.2 Elución en gradiente

Los diferentes compuestos son eluidos modificando gradualmente la composición de la fase móvil durante el transcurso de la cromatografía (aumentando la fuerza iónica, modificando la polaridad, etc.). El resultado sobre la elución es un acortamiento de los tiempos de retención, el factor de retención disminuye conforme aumenta la variación de flujo del gradiente y el compuesto eluye. Este gradiente puede llevarse a cabo de forma lineal o escalonada o linealmente escalonada.

1.10 FLUORESCENCIA

1.10.1 El proceso de fluorescencia

La fluorescencia es el resultado de un proceso de tres etapas que se produce en ciertas moléculas (generalmente hidrocarburos poliaromáticos o heterociclos) llamados fluoróforos o colorantes fluorescentes. Una sonda fluorescente es un fluoróforo diseñado para localizarse dentro de una región específica de una muestra biológica o para responder a un estímulo específico. El proceso responsable de la fluorescencia de sondas fluorescentes y otros fluoróforos se ilustra mediante un diagrama electrónico de estado sencillo (diagrama de Jablonski) se muestra en la Figura 16.

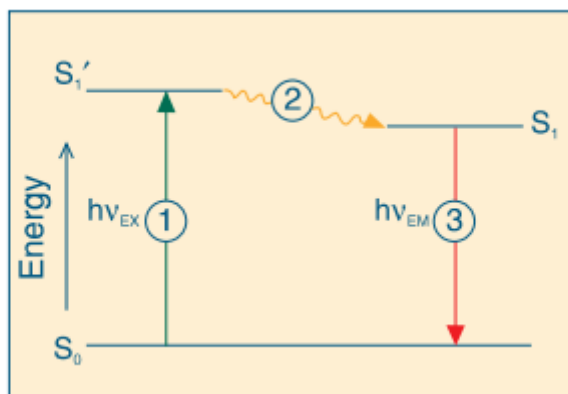


Figura 16 Diagrama de Jablonski que ilustra los procesos implicados en la creación de un estado singlete electrónico excitado por absorción óptica y la posterior emisión de fluorescencia.

1.10.1.1 Etapa 1: Excitación

Un fotón de energía $h\nu_{EX}$ es suministrada por una fuente externa tal como una lámpara incandescente o un láser y es absorbida por el fluoróforo, dando la creación de un estado electrónico excitado singlete (S_1'). En proceso se distingue la fluorescencia de quimioluminiscencia, en la que el estado excitado es creado por una reacción química.

1.10.1.2 Etapa 2: Estado de vida excitado

Existe el estado excitado por un tiempo determinado (habitualmente segundos $1-10 \times 10^{-9}$). Durante este tiempo, el fluoróforo sufre cambios conformacionales y está también sujeto a una multitud de posibles interacciones con su entorno molecular. Estos procesos tienen dos consecuencias importantes. En primer lugar, la energía de S_1' es parcialmente disipada, produciendo un estado excitado singulete relajado (S_1) desde el que se origina la emisión de fluorescencia. En segundo lugar, no todas las moléculas inicialmente excitadas por absorción (Etapa 1) regresan al estado fundamental (basal) (S_0) por la emisión de fluorescencia. El rendimiento cuántico de fluorescencia, que es la relación del número de fotones de fluorescencia emitidos (Etapa 3) al número de fotones absorbidos (Etapa 1), es una medida de la eficiencia de la fluorescencia en competencia con estos otros procesos.

1.10.1.3 Etapa 3: Emisión de fluorescencia

Un fotón de energía $h\nu_{EM}$ se emite, volviendo el fluoróforo a su estado basal S_0 . Debido a la disipación de energía durante el tiempo de vida del estado excitado, la energía de este fotón es menor, y por lo tanto de mayor longitud de onda, que la excitación del fotón $h\nu_{EX}$. La diferencia en la energía o longitud de onda representada por $(h\nu_{EX} - h\nu_{EM})$ se denomina desplazamiento de Stokes. El desplazamiento de Stokes es fundamental para la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia, ya que permite que fotones de emisión sean detectados contra un fondo bajo, aislado a partir de los fotones de excitación. En contraste, la espectrofotometría de absorción requiere la medición de la luz transmitida con respecto a los altos niveles de luz incidente en la misma longitud de onda.

1.10.2 Análogos fluorescentes de moléculas bioactivas

La utilización de análogos y derivados fluorescentes de sustancias bioactivas facilitan considerablemente el estudio de sistemas y procesos biológicos complejos. Gracias al reciente desarrollo de las técnicas analíticas y de los métodos espectroscópicos basados en la fluorescencia, es posible detectar un pequeño número de moléculas sin apenas alterar el medio biológico de observación.^{(40) y (41)}

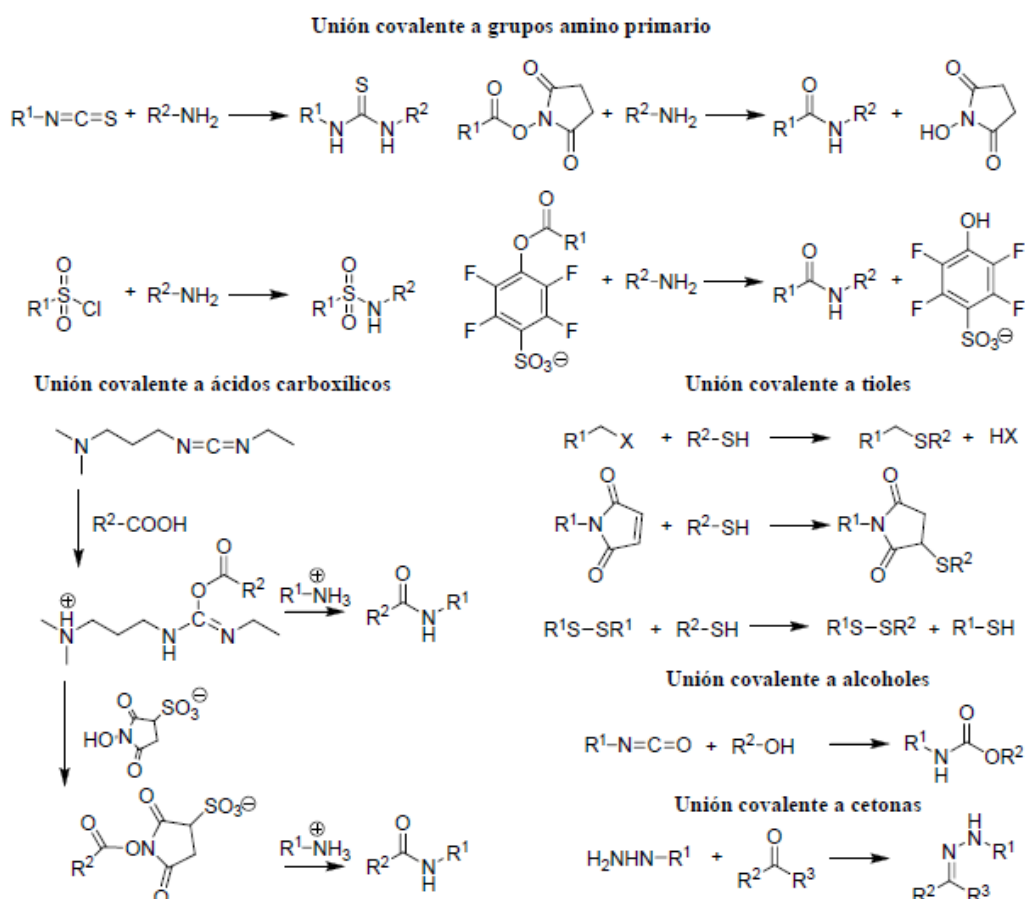
El uso de ligandos fluorescentes en la investigación de los mecanismos de acción biológica se fundamenta en un conjunto de características específicas del método, entre las que destacan:

- Elevada sensibilidad y selectividad.
- Compatibilidad con los sistemas biológicos y las condiciones fisiológicas, en términos de disoluciones acuosas, presencia de sales, temperatura, concentración, etc.
- Posibilidad de obtener imágenes con una considerable resolución espacial.
- Resolución temporal desde los picosegundos hasta las fracciones de segundo.
- Posibilidad de detectar propiedades del entorno molecular mediante cambios en parámetros espectroscópicos.
- Posibilidad de determinar la concentración de ligando en el interior celular o en orgánulos específicos, utilizando su coeficiente de absorción.

Además, los ligandos fluorescentes permiten obtener información del complejo ligando (fluorescente)-receptor en el equilibrio. Esto se debe a la gran sensibilidad del método experimental, que permite cuantificar las diferentes especies que intervienen en dicho equilibrio. De este modo es posible medir la afinidad de los receptores por el ligando fluorescente y, además, calcular la afinidad de otros ligandos mediante experimentos de competición.⁽⁴²⁾

1.10.3 Unión covalente de etiquetas fluorescentes

Un fármaco puede hacerse fluorescente mediante la unión covalente de compuestos fluorescentes funcionalizados (etiquetas), utilizando reacciones conocidas y bien experimentadas, que transcurran en condiciones poco agresivas y con muy buenos rendimientos. En este caso, el anclaje de las etiquetas fluorescentes se lleva a cabo a través de grupos funcionales ya presentes en el fármaco (p. ej. amino primario, tiol, alcohol, cetona, carboxilo) o que se introducen en su estructura previamente. En el esquema 1 se muestran las reacciones más comunes para este tipo de etiquetado.⁽⁴²⁾



Esquema 1 Reacciones de los grupos funcionales amino, ácido carboxílico, tiol, alcohol, y cetona utilizadas para la introducción de grupos fluorescentes. R1: grupo fluoróforo; R2 y R3: resto del compuesto bioactivo⁽⁴²⁾

Actualmente se dispone comercialmente de etiquetas fluorescentes específicas⁽⁴³⁾ para una gran diversidad de grupos funcionales, aunque obviamente la eficiencia de la reacción de etiquetado fluorescente no garantiza el mantenimiento de la bioactividad del compuesto original, que depende de factores químicos y físicos muchas veces poco, o nada, conocidos. En realidad, frecuentemente se encuentra que el etiquetado fluorescente da lugar a un derivado sin la bioactividad del fármaco original, sobre todo si éste es de reducidas dimensiones, lo que impide su utilización posterior. Entre las etiquetas fluorescentes más utilizadas se encuentran los que poseen el núcleo de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno (colorantes dipirrometeno.BF₂, de nombre genérico BODIPYs), fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, dansilo (5-N,N-dimetilamino-1-naftalensulfonilo), cianinas, NBD (7-nitrobenzo-[2,3-d]-2-oxa-1,3-diazol), etc.⁽⁴²⁾

1.11 EL CROMÓFORO BODIPY: ESTRUCTURA, PROPIEDADES ESPECTROSCÓPICAS Y APLICACIONES

1.11.1 Estructura básica

Entre la gran variedad de cromóforos conocidos, el grupo difluoroborodipirrometeno (BODIPY) está aceptado como uno de los más útiles para el diseño de sondas y etiquetas fluorescentes, gracias a sus favorables propiedades espectroscópicas y a su lipofilia. El primer miembro de esta familia de colorantes fue descubierto por casualidad por Treibs y Kreuzer en 1968.⁽⁴⁴⁾ Sin embargo, hasta el final de los 80 no se retomó el estudio y las aplicaciones de estos colorantes.⁽⁴⁵⁾ Desde entonces, el uso de este grupo en diversas aplicaciones se ha incrementado de manera exponencial. Muchos compuestos de esta familia se comercializan como sondas para el etiquetado de una gran variedad de moléculas de interés biológico bajo el nombre de BODIPY, convirtiéndose en un sustituto más fotoestable de la fluoresceína.

El sistema de numeración IUPAC para el grupo BODIPY es diferente del utilizado para los dipirrometenos. Además, por analogía con las porfirinas, en el grupo BODIPY las posiciones 3 y 5 se llaman α , y la 8 meso. (Figura 10).⁽⁴²⁾

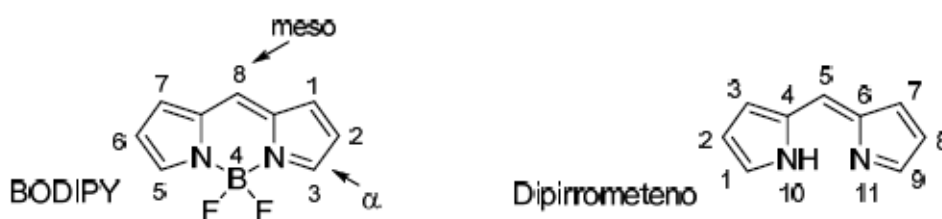


Figura 10 Estructura y numeración del núcleo BODIPY y de su dipirrometeno precursor⁽⁴²⁾

El esqueleto básico de BODIPY no se conoce, ya que al carecer de sustituyentes reacciona fácilmente con muchos electrófilos. Sin embargo, se conoce el correspondiente dipirrometeno precursor, aunque se descompone a temperaturas superiores a -30 ó -40 °C⁽⁴⁶⁾. Tampoco se conocen los otros tres compuestos de la Figura 11, lo que refleja las limitaciones sintéticas existentes para las estructuras más simples del grupo BODIPY.

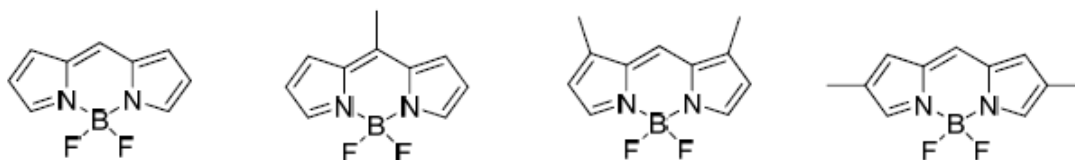


Figura 11 Algunos BODIPYs desconocidos

1.11.2 Propiedades espectroscópicas del cromóforo BODIPY

Una de las características más importantes del cromóforo BODIPY consiste en que es posible variar sus propiedades espectroscópicas con relativa facilidad, modificando los sustituyentes. Los compuestos que incorporan el grupo BODIPY presentan en sus espectros de absorción y de emisión bandas en la zona del visible generalmente estrechas, con anchuras medias de 25 y 30 nm, tienen coeficientes de absorción altos, entre 40000 y 110000 M⁻¹ cm⁻¹, altos rendimientos cuánticos de fluorescencia, a veces cercano a la unidad, vida media de fluorescencia en la zona de 1 a 10 ns, excelente estabilidad química y fotoquímica tanto en disolución como en estado sólido, y espectros de emisión/absorción relativamente insensibles a la polaridad del disolvente y al pH. El grupo BODIPY es más hidrofóbico que el grupo nitrobenzoxadiazol (NBD), aunque menos que el pireno, y sus derivados son solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, incluso en agua, si se introducen sustituyentes polares adecuados. El espectro de absorción muestra en general una banda principal intensa, correspondiente a la transición al primer estado excitado (S₀-S₁), con un hombro debido a la estructura vibracional, y una segunda banda, a menor longitud de onda y más débil, asociada a la transición (S₀-S₂). Independientemente de que se excite al estado S₁ o S₂, el proceso de emisión de fluorescencia siempre parte de S₁ (regla de Kasha) y su espectro es la imagen especular del de absorción, poniendo de manifiesto que las conformaciones de los estados fundamental (S₀) y excitado (S₁) son muy similares (Figura 12).⁽⁴²⁾

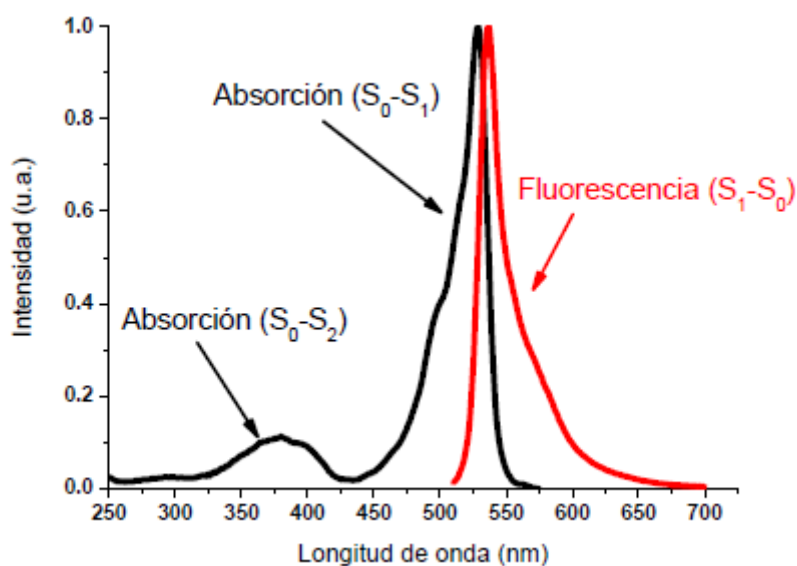


Figura 12 Espectro típico de absorción y emisión de un BODIPY⁽⁴²⁾

1.11.3 Aplicaciones

Desde el descubrimiento del cromóforo BODIPY por Treibs y colaboradores, el número de aplicaciones de compuestos con este grupo fluorescente ha aumentado casi de modo exponencial, incluyendo usos como el marcado fluorescente de moléculas con interés en biología, sondas cromogénicas, sensores en la detección de cationes, interruptores fluorescentes, films electroluminiscentes, sondas láser, colectores de luz, sensibilizadores para células solares, emisores en el infrarrojo cercano, sensibilizadores para la generación de oxígeno singlete, sensores de pH, dispositivos electroluminiscentes o materiales mesomórficos, entre otros. Estos y otros aspectos han sido recogidos con suficiente detalle en una reciente revisión.⁽⁴⁷⁾

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La progesterona es una hormona progestacional fisiológica que inhibe la secreción de LH, lo que resulta en la inhibición de la maduración final del folículo y la ovulación. Durante el periodo de administración el cuerpo lúteo sufre regresión natural, de tal forma que al retirar el tratamiento los animales presentan estro sincronizado entre las siguientes 48 y 96 horas⁽³⁷⁾. La administración de fármacos de liberación controlada por vía parenteral ha adquirido una importancia creciente en el desarrollo de formas de dosificación farmacéuticas. En la actualidad, los inyectables de liberación modificada de formación *in situ* se han convertido en una alternativa atractiva a las tecnologías comunes de liberación lenta.⁽⁴⁸⁾ Por otro lado, la reología es la ciencia que estudia el flujo y la deformación de los materiales, por tanto se emplea para estudiar desde un punto de vista macroscópico y de forma indirecta la estructura que tienen los materiales y, más importante aún, la respuesta que presentan bajo condiciones de estrés mecánico⁽⁵⁾. Reológicamente los geles son materiales viscoelásticos, ya que presentan la capacidad de fluir (comportamiento viscoso), como la capacidad de almacenar energía y recuperar su forma original después de haber sido sometidos a un proceso de deformación (comportamiento elástico). El comportamiento viscoelástico de un material sometido a un esfuerzo sinusoidal en un intervalo de frecuencia es representado por dos componentes: la componente elástica o módulo de almacenamiento (G') y la componente viscosa o módulo de pérdida (G''); dichos componentes permiten caracterizar el comportamiento de los materiales ya que mediante éstos, los geles pueden ser clasificados en fuertes, débiles y disoluciones macromoleculares o concentradas.⁽⁴⁹⁾

De acuerdo con lo anterior, es importante estudiar el comportamiento reológico de los geles *in situ* de liberación controlada a través del tiempo así como el cambio que presentan al pasar a una temperatura de 37°C para simular el cambio que presentan dichos geles cuando son administrados a los bovinos para poder caracterizar el comportamiento reológico de cada polímero en dicho sistema y observar si existe alguno que presente mejores propiedades reológicas que otro. Por otra parte para llevar un control de los niveles de progesterona en sangre de bovinos es importante cuantificar la progesterona en el suero de dichos animales buscando una alternativa a los kits para cuantificar progesterona utilizando en este caso un método de cuantificación por HPLC con detector de fluorescencia con el cual se pretende establecer el método para futuros estudios.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una formulación de gel inyectable de formación *in situ* de liberación modificada de progesterona para uso veterinario a partir de la caracterización reológica de cada sistema.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar reológicamente geles inyectables de liberación modificada de progesterona.
- Establecer la mejor formulación de gel inyectable de formación *in situ* de liberación modifica de progesterona de acuerdo a su composición reológica.
- Proponer un método analítico para cuantificación de progesterona en suero por HPLC con detector de fluorescente.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

Si se logran obtener mezclas de polímeros cargados de progesterona con capacidad de transformación sol-gel en respuesta a cambios en la temperatura y/o la concentración del disolvente entonces, caracterizando el comportamiento reológico de dichos geles estableciendo las condiciones en un determinado tiempo a 37°C se espera que el módulo elástico sea mayor al módulo viscoso ($G' > G''$) dentro del intervalo de frecuencia estudiado. Por otra parte, al reaccionar la progesterona con el BODIPY FL en presencia de ácido trifluoroacético como catalizador se formara un complejo fluorescente que podrá ser cuantificado con el HPLC con detector fluorescente.

5. MATERIAL

5.1 Material

- Vasos de precipitado (50 mL, 150 mL, 250 mL, 600 mL, 1000mL) (Pyrex®)
- Matrices Erlenmeyer (25 mL, 250 mL, 500 mL) (Pyrex®)
- Matrices volumétricos (2mL, 10mL, 25mL, 50 mL, 100mL, 1000 mL) (Pyrex®)
- Pipetas graduadas (1 mL, 2mL, 5 mL, 10 mL) (Pyrex®)
- Pipetas volumétricas (1 mL, 5 mL) (Pyrex®)
- Soporte universal
- Probetas (10 mL, 25 mL, 250 mL, 1000 mL) (Kimax®)
- Tiras de pH (0-14) (Merk®)
- Pipetas pasteur
- Tubos de ensayo (Pyrex®)
- Pinzas dobles
- Agitador magnético
- Puntas para micropipetas
- Naves de pesado
- Espátula

5.2 Instrumentos

- Balanza analítica Adventurer™ Ohaus
- Micropipetas Transferpette® Brand 10-100 µL
- Micropipeta Eppendorf Research 100-1000 µl
- Micropipeta Eppendorf Research 0.5-10 µl

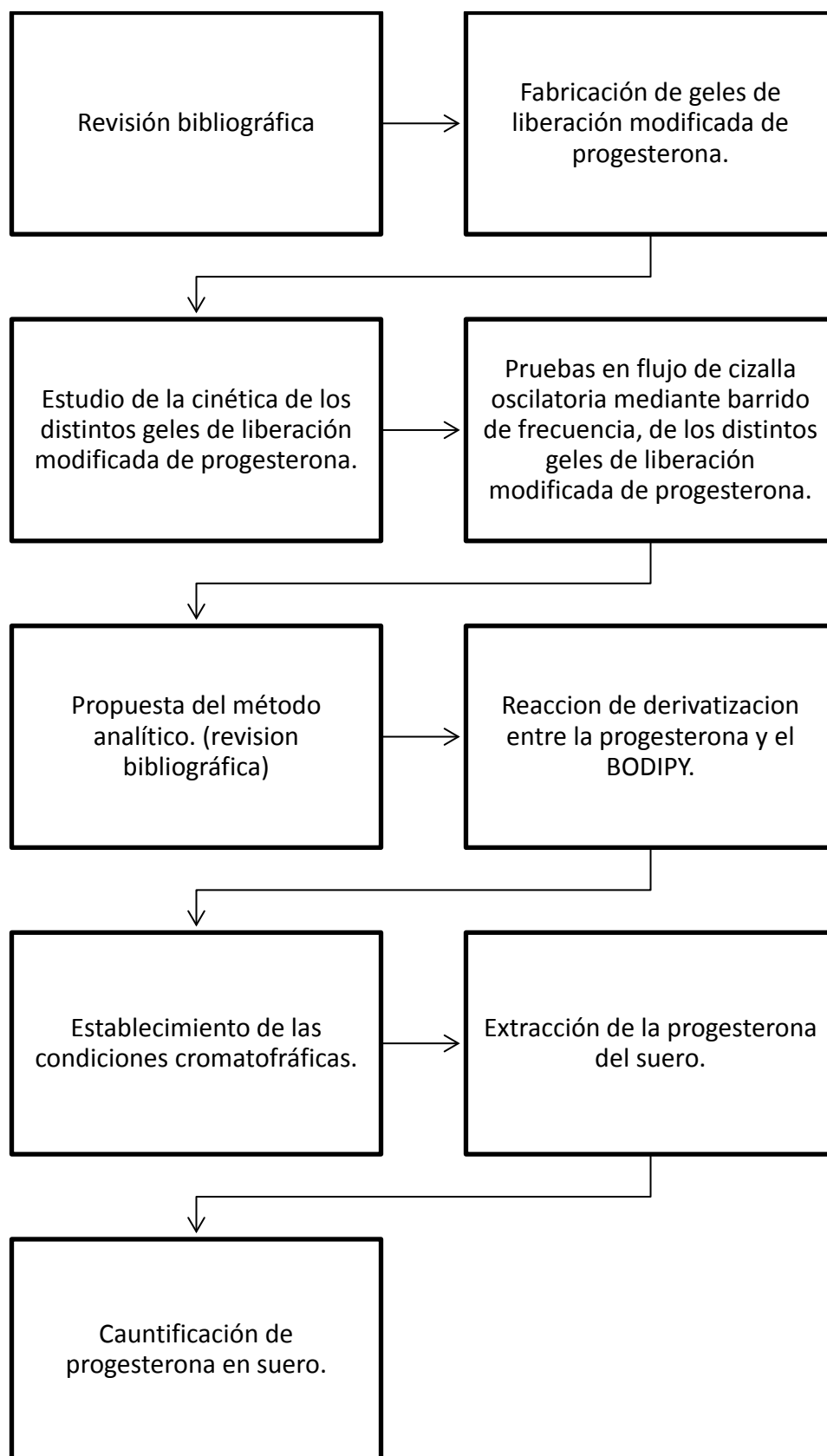
5.3 Reactivos

- Progesterona
- Quitosano de conchas de cangrejo, 85% desacetilado.
- PEG 6000
- Etanol CHROMASOLV® para HPLC, desnaturalizado.
- Poloxámero F-127. Pluronic® F-127
- Propilenglicol
- Kollicoat MAE 30 DP BASF USA
- BODIPY® FL hidrazida
- Ácido trifloroacético Chromasolv® para HPLC, ≥99.0%
- Diclorometano Baker Analyzed ®ACS 99.9%
- Metanol Baker Analyzed ®ACS 90.9%
- Acetonitrilo HPLC J.T Baker

5.4 Equipo

- Water 1525 binary HPLC bomba con multi λ detector fluorescente.
- Columna HPLC SUPELCOSIL LC-18-DB 25cmx 4.6 mm, 5 μ m
- Reómetro AR 2000 con geometría de plato SST ST 40mm.
- Desecador selecta P. Vacua-temp

5.5 Diagrama de flujo de la metodología realizada para la Caracterización reológica de geles de liberación modificada y su cuantificación en suero.



6. METODOLOGÍA

6.1 Se realizó una revisión bibliográfica en libros y artículos sobre geles in situ, progesterona y uso en bovinos así como la fabricación de inyectables de liberación modificada.

6.2 Preparación de los geles

6.2.1 Formulaciones de progesterona, PEG 6000, kollicoat y etanol-agua.

Se preparó una mezcla de etanol-agua para el primer caso 75-25%(v/v) y para el segundo 50-50%(v/v) respectivamente. En un matraz aforado de 50mL se colocó 10g de PEG 6000, 5g de progesterona y 5mL de kollicoat aforando con la mezcla etanol-agua, protegiendo a la progesterona de la luz. Los componentes de estas formulaciones se muestran en la tabla 3.

6.2.2 Formulaciones con Poloxámero F-127, Quitosano 80 y progesterona.

Como disolvente se utilizó una mezcla de propilenglicol, etanol y agua (15, 15 y 70%)(v/v). Se disolvieron 7.5 g de poloxámero F-127 con 15mL del disolvente se agitó y se mantuvo en refrigeración por 2 días; por otra parte se mezcló 0.25g de Quitosano y 10 mL del disolvente se agregó 0.1 mL de ácido acético glacial concentrado para obtener un pH de 5. Para ambos casos en un matraz aforado de 50mL se colocó 5g de progesterona disuelta con el disolvente se agregó el poloxámero por un lado y el Quitosano para la segunda formulación y la mezcla de ambos para la tercera, se mezcló y se aforó. Los componentes de estas formulaciones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 Formulación de geles con progesterona

Formulación	1.1	1.2	2.1	2.2	2.3
Disolvente	Etanol/agua (75-25%)	Etanol/agua (50-50%)	Agua/Propilenglicol/etanol (70/15/15%)	Agua/Propilenglicol/etanol (70/15/15%)	Agua/Propilenglicol/etanol (70/15/15%)
Polímero	Kollicoat PEG 6000	Kollicoat PEG 6000	Poloxámero F-127	Quitosano 80	Poloxámero F-127 Quitosano 80
Fármaco	Progesterona	Progesterona	progesterona	Progesterona	progesterona

6.3 Comportamiento reológico

6.3.1 Cinética de geles.

Una vez fabricados los distintos geles reversibles de progesterona, se llevó a cabo un seguimiento de la respuesta viscoelástica (G' y G'') dentro de la región lineal en función del tiempo a una frecuencia (1 rad/s) y deformación fija (50 %), durante dos horas de gelificación a temperatura constante 37 °C para las distintas formulaciones, empleando una geometría de placas paralelas (diámetro = 40 mm).

6.3.2 Cizalla oscilatoria de baja amplitud de deformación.

Se realizaron pruebas en flujo de cizalla oscilatoria mediante barridos de frecuencia a 37 °C, dentro de la región viscoelástica lineal (<50%).

6.4 Método analítico

Para la cuantificación de la progesterona se trabajó con una reacción de derivatización entre la progesterona y el compuesto fluorescente BODIPY-FL, la cual fue catalizada por ácido tricloroacético, estableciendo las condiciones óptimas para esta reacción en donde se varió diferentes factores, como la temperatura, el tiempo y la agitación.

6.4.1 Condiciones cromatográficas

Para el desarrollo del método analítico se trabajaron con las siguientes condiciones en el HPLC.

Tabla 4 Condiciones cromatográficas

Detector	Fluorescente
Longitud de onda de emisión	495
Longitud de onda de excitación	510
Columna	Columna HPLC SUPELCOSIL LC-18-DB 25cmx 4.6 mm, 5µm b
Fase móvil	Acetonitrilo -agua (7:3)
Velocidad de flujo	1.5mL/min
Volumen de inyección	10µL
Tiempo de corrida	7min
Tiempo de retención del BODIPY	2min
Tiempo de retención de la progesterona-BODIPY	4min

6.5 Curva estándar

Se realizó una curva estándar para la respuesta de la progesterona con el BODIPY para observar si existía alguna respuesta proporcional.

6.5.1 Procedimiento

Se pesaron 20.1 mg de Estándar de progesterona y se transfirió a un matraz aforado de 50mL y se aforó con metanol grado HPLC (solución 1), de la solución 1 se transfirió con una micropipeta 100 μ L y se colocaron en un matraz aforado de 10mL y se aforó con metanol (solución 2). De la solución 2 con ayuda de la micropipeta se tomó 75,100, 125, 150 y 175 μ L y se transfirieron a matraces volumétricos de 10mL y se llevaron al aforó con metanol.

Se inyectaron 5 veces las soluciones, bajo las condiciones cromatográficas descritas en la tabla 1.

6.6 Extracción de progesterona del suero

En un tubo de ensayo se colocó 10 μ L de solución de Progesterona (100ng/mL). Posteriormente se colocó 1mL de suero. La mezcla fue diluida con 3mL de agua y 10mL de diclorometano. Se mezcló en un mezclador Vortex por un minuto y se dejó reposar por 10 minutos. Se tomó 8mL de la capa de diclorometano (superior) y se colocó en un tubo de ensayo y fue colocada en sequedad en un desecador Selecta P. Una vez evaporado se agregó 0.2mL de una solución de BODIPY FL (1 μ g/mL) y 0.2mL de una solución de ácido trifluoroacético(0.08% v/v) y se colocó en agitación durante 20 horas a temperatura ambiente. Se tomaron 10 μ L de esta solución y se inyectaron en el HPLC.

Se siguió el mismo método para todas las muestras de suero.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1 Comportamiento reológico de las distintas formulaciones

En las figuras 13 a la 17 se muestran los espectros mecánicos dinámicos de baja amplitud de deformación, donde se observa la evolución de los módulos dinámicos (G' , G'' y η^*) respecto a la frecuencia; donde en todos los casos se aprecia un comportamiento de adelgazamiento de la viscosidad dinámica η^* a la cizalla para las distintas formulaciones empleadas es, es decir, su viscosidad decrece conforme la frecuencia se incrementa en estas formulaciones. Es claro que tanto G' como G'' aumentan conforme aumenta la frecuencia (ω), predominando el carácter viscoso sobre el carácter elástico del material ($G'' > G'$) en todo el intervalo de frecuencias. En todas las formulaciones se observa que si bien en las primeras dos (1.1 y 1.2) el componente elástico se acerca al componente viscoso nunca hay un punto de cruce entre los módulos, comportándose como un gel débil.

En las figura 13 y 14 se puede observar como la formulación con kollicoat, PEG 6000, progesterona y etanol-agua (75/25% v/v) fue la que presentó mejor comportamiento reológicos con respecto a las anteriores formulaciones; esto puede ser explicado por la cantidad de alcohol contenido en dicho sistema.

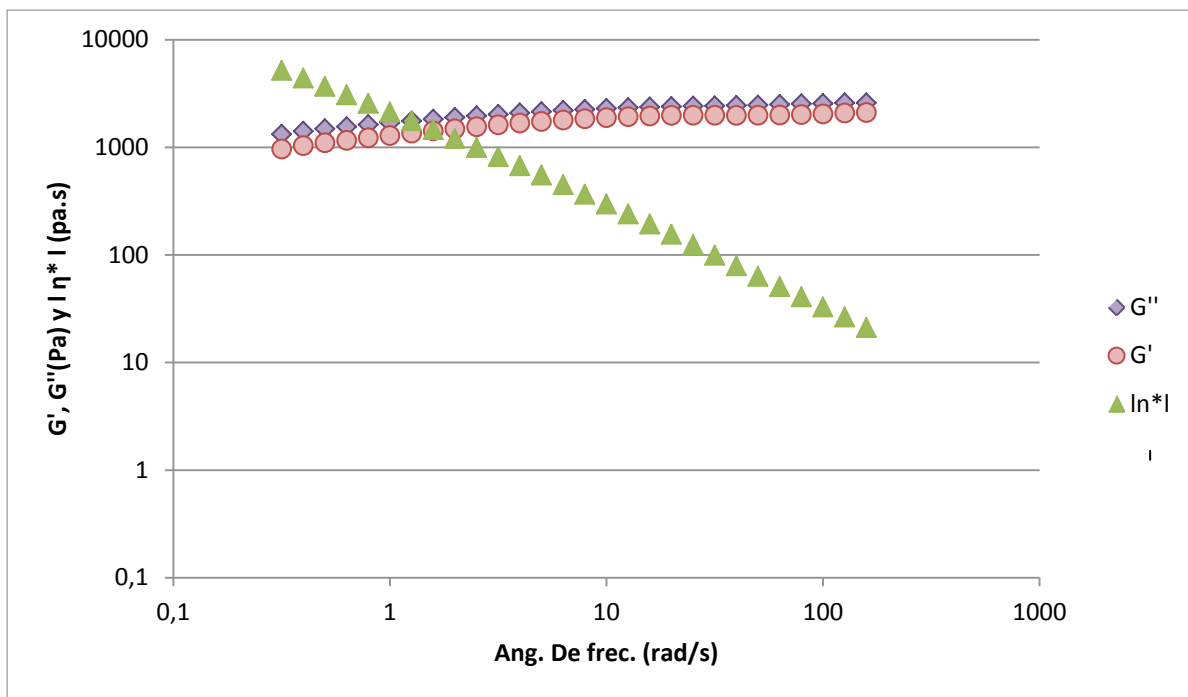


Figura 13 Variación de G' , G'' y η^* en función de la frecuencia (A) formulación 1.1

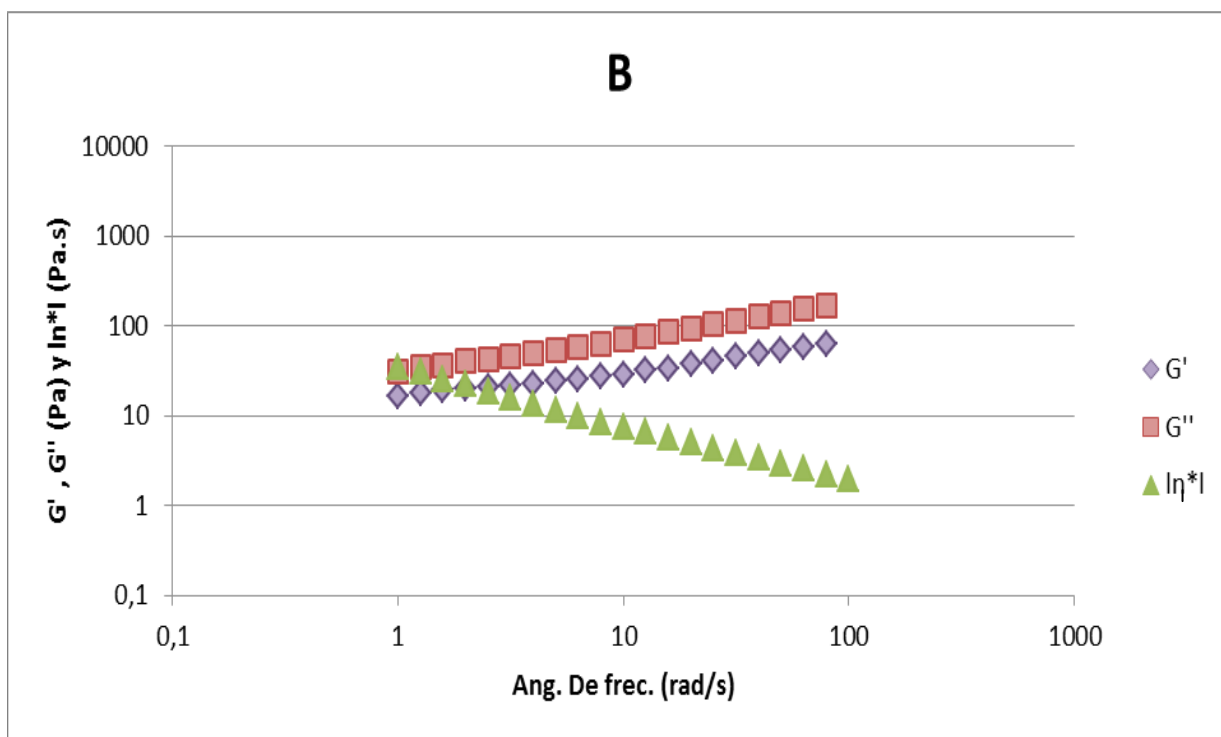


Figura 14 Variación de G' , G'' y η^* en función de la frecuencia (B) formulación 1.2

En cuanto a las formulaciones preparadas con poloxámero y Quitosano presentadas en las figuras 15 a la 17 se observa que el que presenta mejores propiedades de gel es la preparada con poloxámero(figura 16) , esto debido a la concentración que se utilizó de Quitosano en la formulación que fue del 0.5 % por lo que si se aumenta la concentración de Quitosano al 2% que según diversos estudios es cuando muestra mejores propiedades gelificantes; se esperaría encontrar un comportamiento más característico de un gel, es decir, el comportamiento reológico del Quitosano depende de la concentración en la solución ya que se encontró que la viscosidad de soluciones concentradas de Quitosano aumenta con el aumento en la concentración de este.

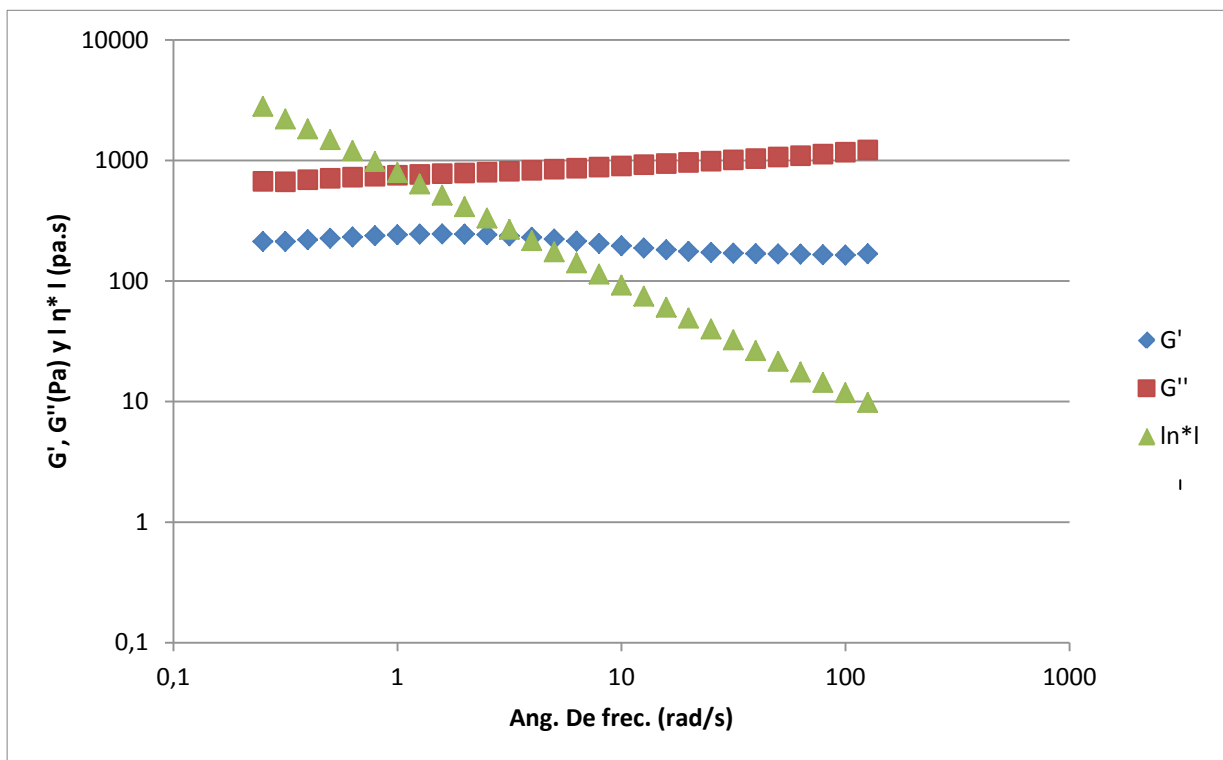


Figura 15 Variación de G' , G'' y η^* en función de la frecuencia (C) formulación 2.1

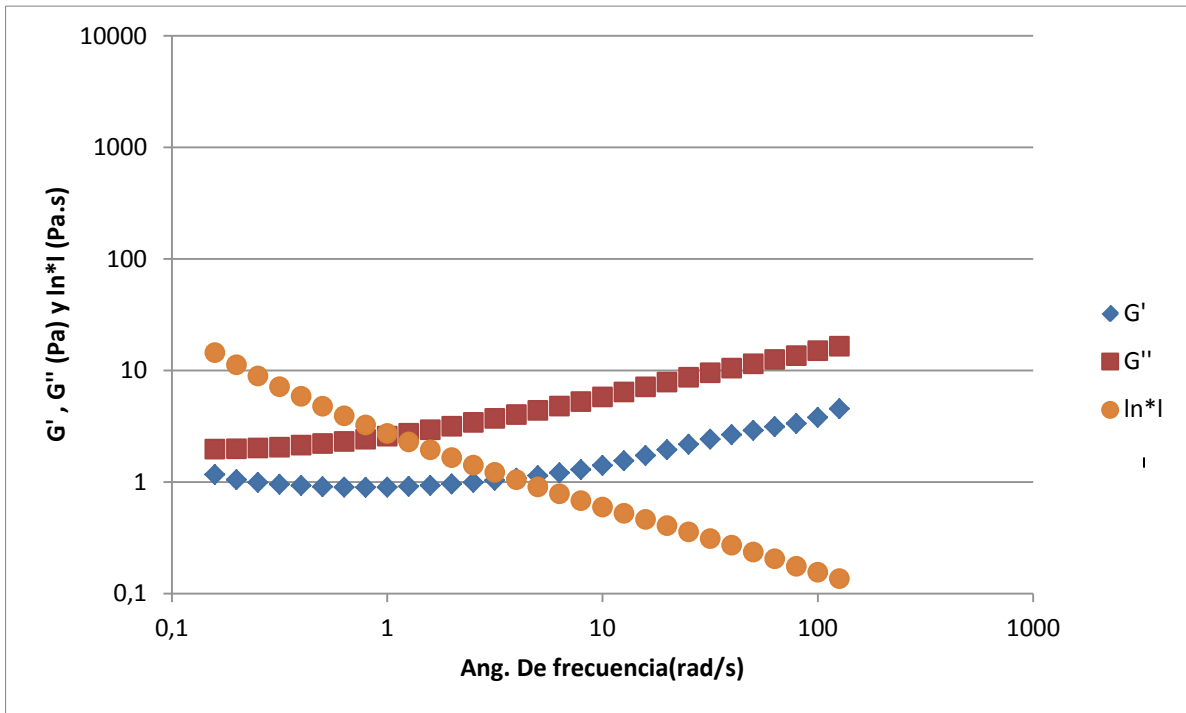


Figura 16 Variación de G' , G'' y η^* en función de la frecuencia (D) formulación 2.2

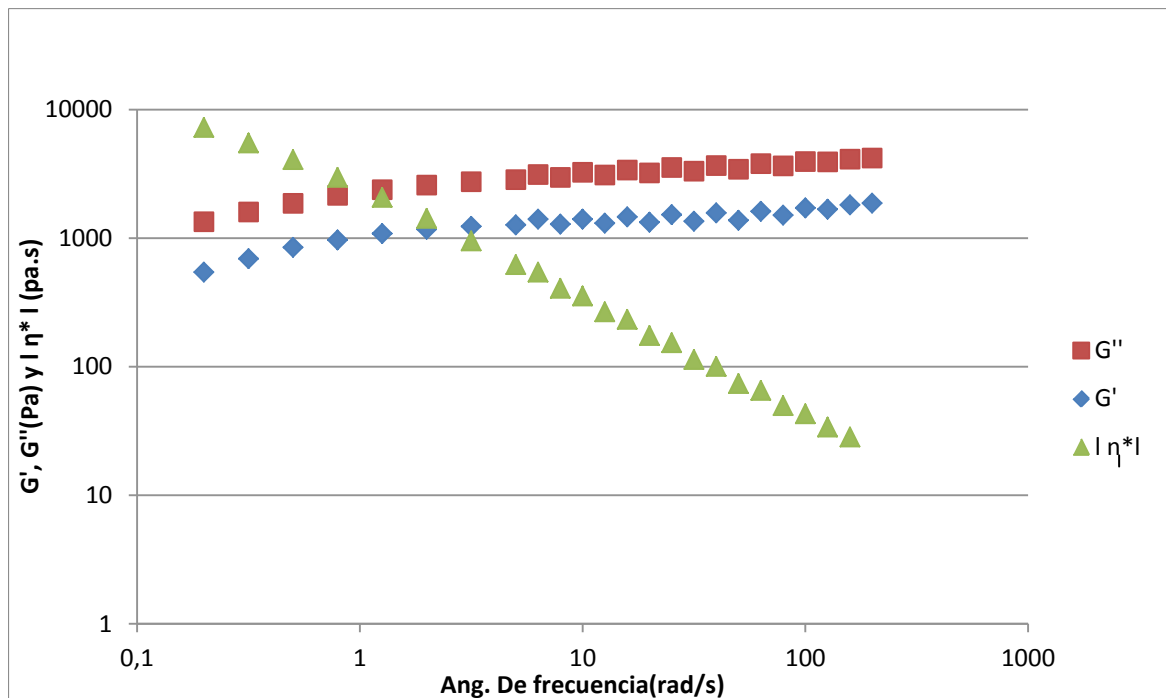


Figura 17 Variación de G' , G'' y η^* en función de la frecuencia (E) formulación 2.3

Por otra parte se puede observar en las figuras 13 a la 17 que todas las formulaciones se comportan como pseudoplásticos, es decir, su viscosidad es reducida al aumentar la velocidad de deformación que es característico de materiales de elevada viscosidad, cuya viscosidad disminuye rápidamente, cuando aumenta la cizalladura, además de que se ha observado que la dependencia con la velocidad de deformación es más marcada cuando el Quitosano se encuentra a altas concentraciones.⁽⁵⁰⁾

7.2 Comportamiento cinético de las distintas formulaciones

En las figuras 18 a la 21 se muestran el comportamiento cinético de las distintas formulaciones de geles reversibles de progesterona.

Se observa en la figura 18 y 19 un comportamiento similar entre ellas, con un punto de cruce ($G' = G''$) entre 188.3 y 187.7 minutos, con valores de sus módulos de 719.4 y 736.2 (Pa) respectivamente, lo que nos indica que ambos son geles débiles, sin embargo, se observa una ligera diferencia entre ambas formulaciones en los valores antes mencionados, ya que en el primer caso el porcentaje de alcohol del disolvente es de un 75% (v/v), y en el segundo caso de un 50%(v/v), lo que puede notarse en los tiempos de gelificación.

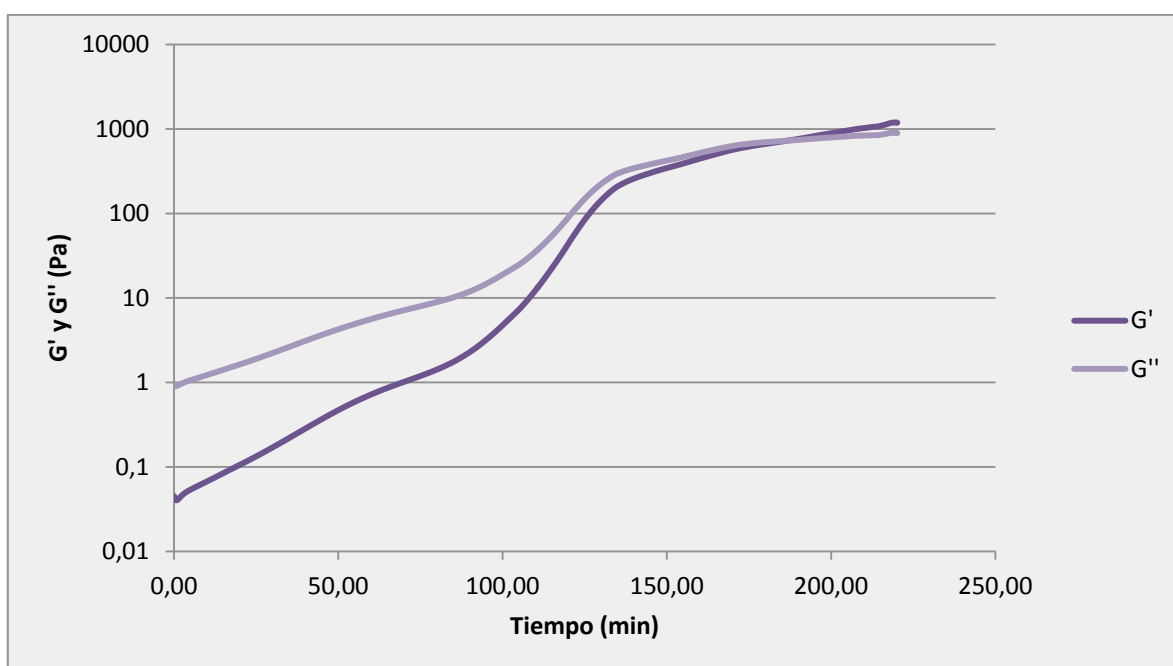


Figura 18 Evolución de G' y G'' de la formulación 1.1

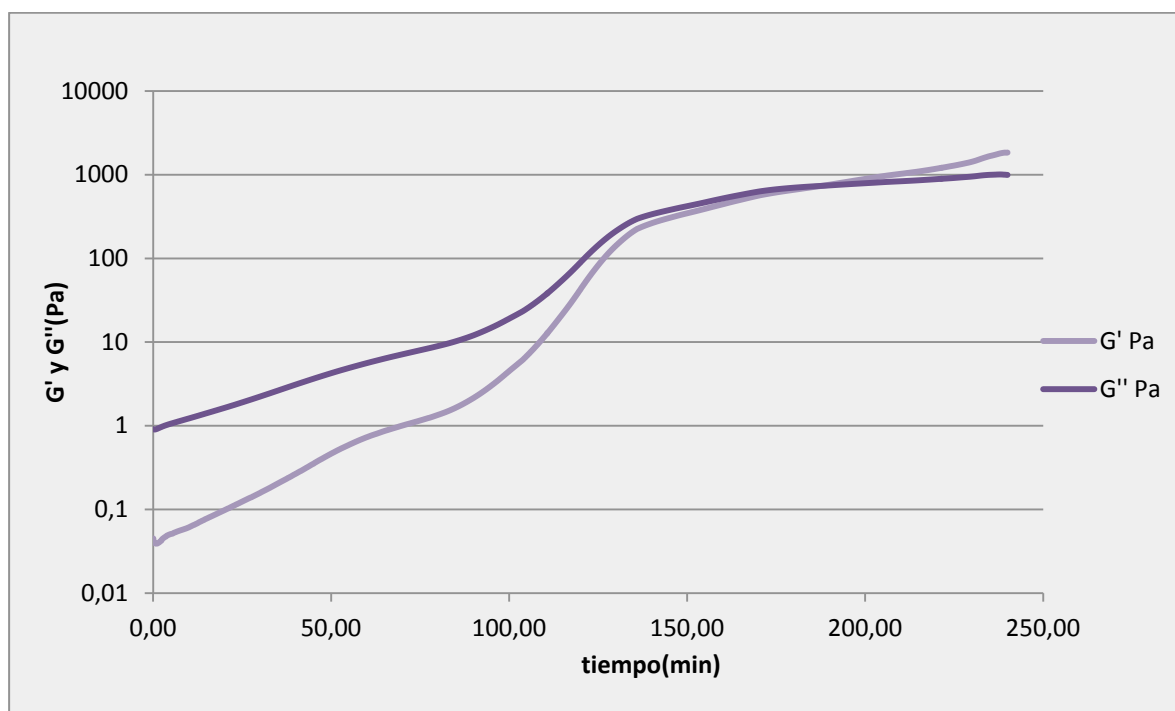


Figura 19 Evolución de G' y G'' de la formulación 1.2

Por otro lado, en cuanto a la formulaciones: 2.1 y 2.2 con poloxámero F-127 y Quitosano 80 respectivamente presentadas en las figuras 20 y 21 se observa claramente que en la formulación con Quitosano existe un cruce donde $G' > G''$; por otro lado en la formulación con poloxámero en ningún momento el componente elástico cruza con el componente viscoso, lo cual puede deberse a la concentración de los polímeros ya que la viscosidad del Quitosano aumenta con la concentración, ⁽⁵¹⁾ en donde se ha observado que una concentración del 2%(p/v) presenta una mejor gelificación; en el caso del poloxámero se ha reportado que igualmente al incrementar la concentración del poloxámero el resultado es un ligero incremento en su elasticidad, y un decremento en la temperatura de transición sol-gel ⁽⁵²⁾ aunque la concentración empleada en la literatura es del 22% (p/v).

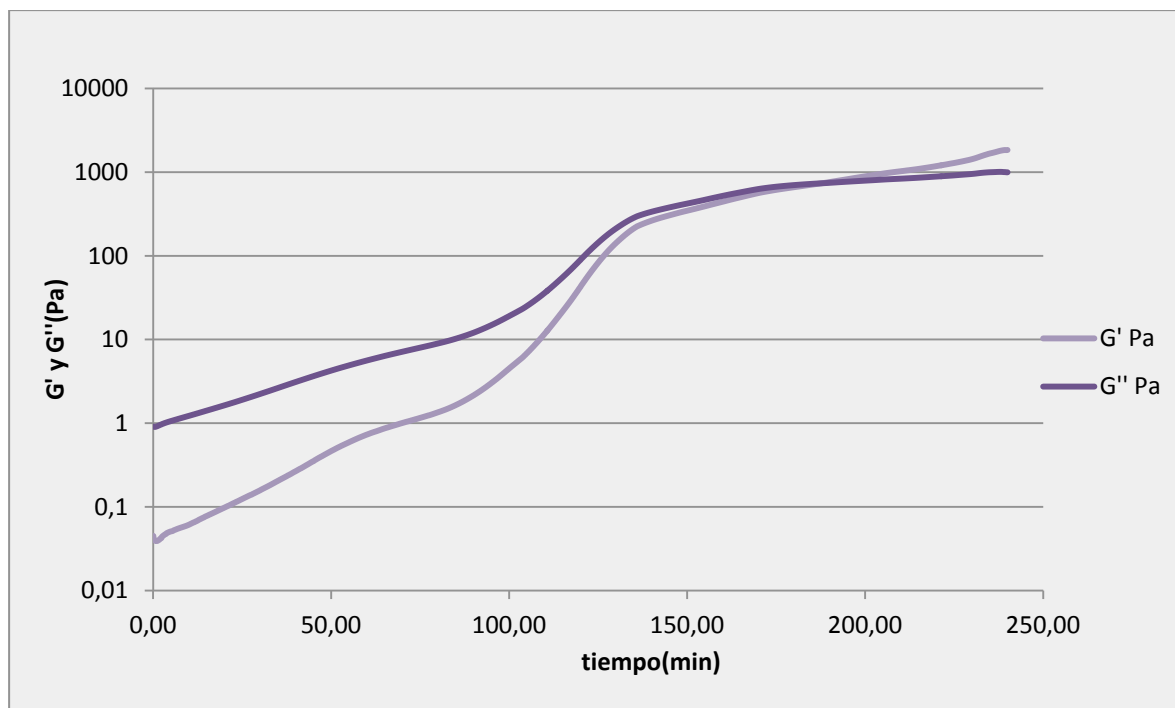


Figura 20 Evolución de G' y G'' de la formulación 1.2

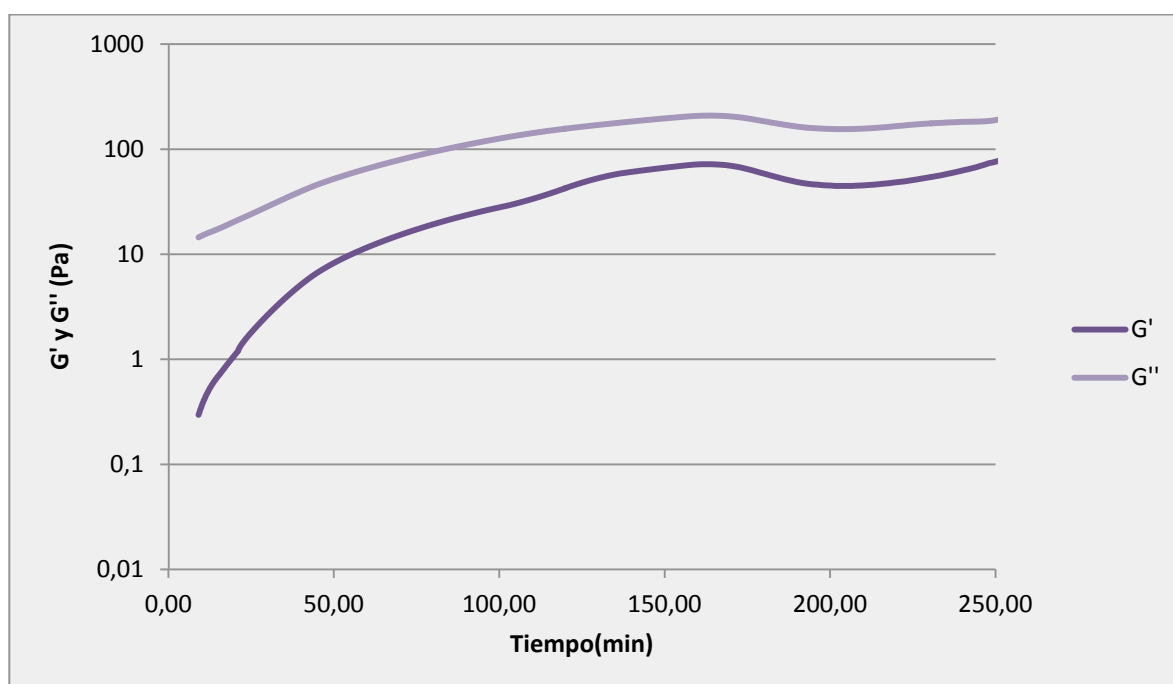


Figura 21 Evolución de G' y G'' de la formulación 2.1

En el caso del poloxámero la concentración de éste en el sistema afecta la temperatura de gelificación ya que a 25°C formulaciones con Poloxámero a una concentración del 12-15% eran soluciones mientras que en otras preparadas al 17% la fase de transición de fase ya había comenzado. Además, en estudios reportados se ha observado que a 37°C en soluciones al 12% se mantiene en solución, mientras que en soluciones al 15 y 17% presentan gelificación ⁽⁵³⁾ lo que nos muestra la influencia de la concentración del polímero en este tipo de sistemas. Los sistemas que presentaron mejores propiedades viscoelásticas en nuestro estudio fueron al 15%(p/v) de poloxámero, y además se observó que la temperatura de transición sol-gel es afectada por la concentración de PEG en la formulación final, este comportamiento es similar a lo reportado por Taís Gratieri et al;(2010) quienes mostraron que el Quitosano interfiere significativamente en las preparaciones con Poloxámero. Así pues, la concentración de Poloxámero y Quitosano presentan mejores características viscoelásticas a concentraciones del 16% y 0.5% (p/v), respectivamente, observando que cuando aumenta la concentración de Quitosano disminuye la temperatura de transición sol-gel. ⁽⁵⁴⁾

7.3 Método analítico

7.3.1 Reacción progesterona- BODIPY

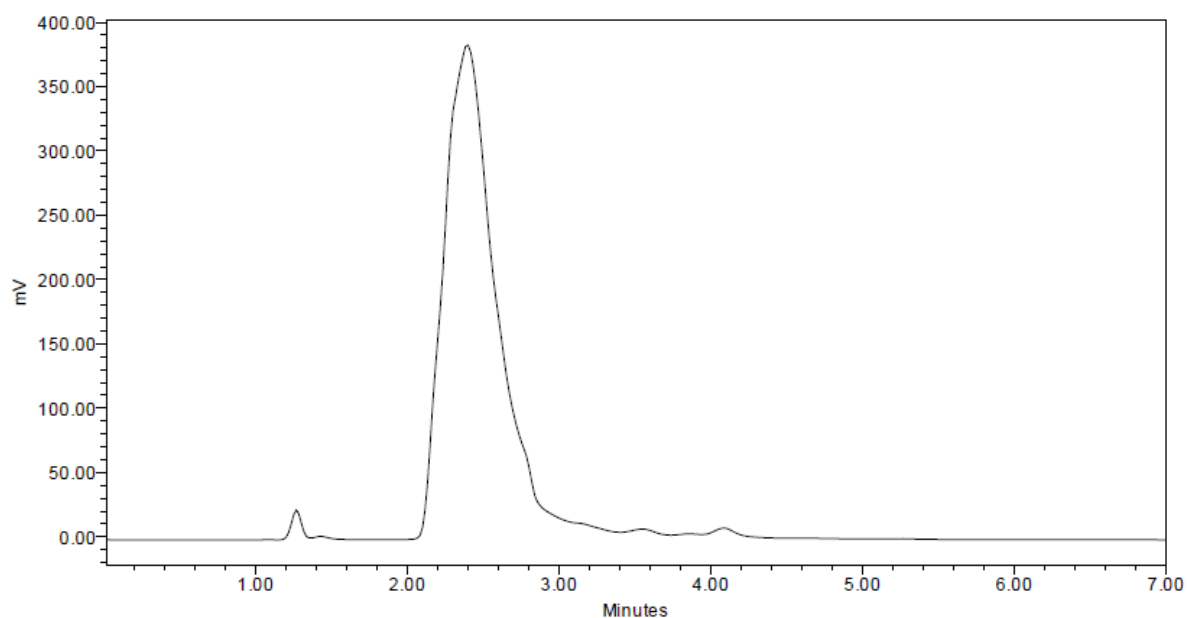


Figura 22 Reacción del BODIPY con progesterona al tiempo 0.

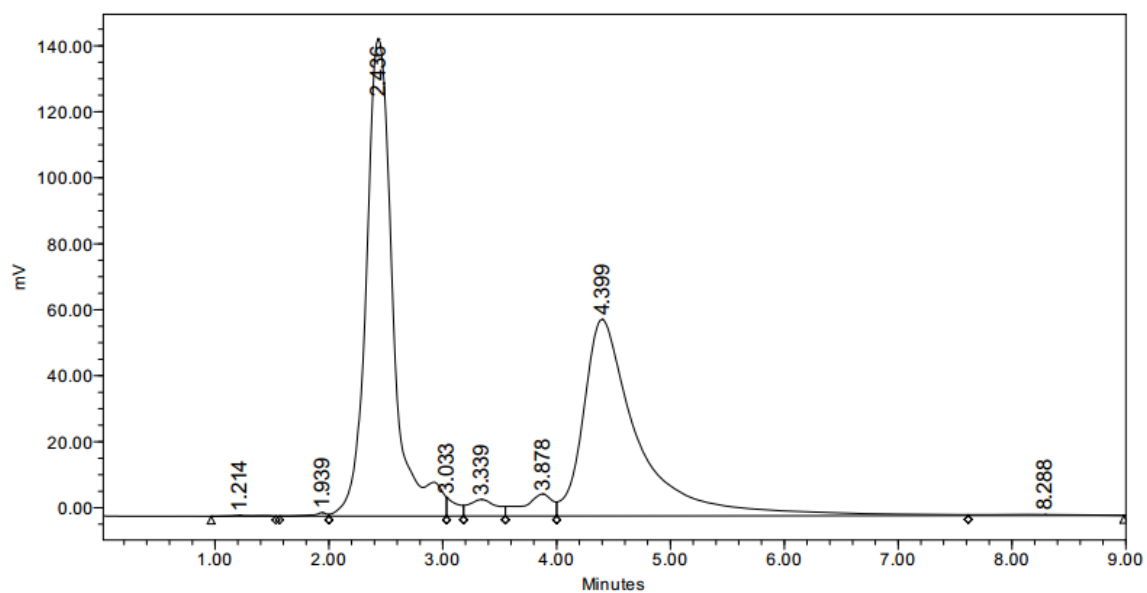
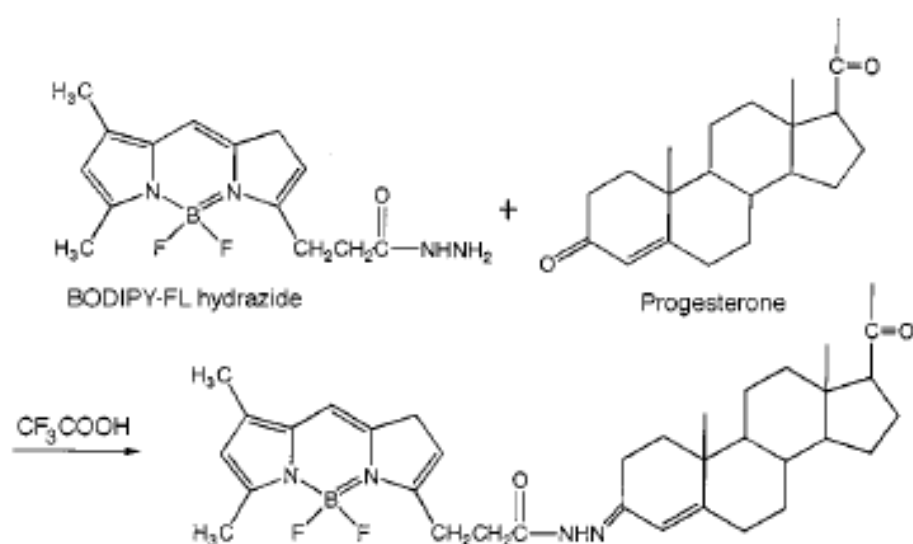


Figura 23 Reacción del BODIPY con progesterona (100ng/mL) después de 20 horas de agitación constante.

En la figura 22. Se muestra el blanco del BODIPY antes de reaccionar con la progesterona en el tiempo 0, donde se puede observar solamente el pico del BODIPY. Al colocar el BODIPY con la progesterona y dejándolo agitando por 20 horas se observa en la figura 23, además del pico del BODIPY el de la progesterona la cual es una reacción de derivatización en este caso de la hidracina y la progesterona, formando el complejo que muestra el pico aproximadamente en el minuto 4. Cabe mencionar que para esta reacción la agitación tienen que ser constante porque cuando se interrumpía esta agitación la reacción no se presentaba y por tanto no se presentaba el complejo fluorescente. En el esquema 2 se muestra la reacción entre la progesterona y el BODIPY utilizando como catalizador el ácido trifluoroacético.



Esquema 2 Reacción de derivatización del BODIPY con la progesterona.

7.4 Curva Estándar

En la tabla 3, se muestran las Alturas (mUA) obtenidas en el intervalo de concentración de 60, 80, 100, 120 y 140 ng/mL, el coeficiente de determinación (r^2), y el error debido a la regresión (S_y/x). En la figura 25 se muestra la gráfica de la curva estándar para la cuantificación de progesterona.

Tabla 5 Curva estándar Progesterona-BODIPY

Concentración(ng/mL)	Altura del pico (mV)
60	48985
60	49781
60	48989
60	49789
60	49874
80	54589
80	53968
80	54591
80	53874
80	53745
100	59564
100	58389
100	58782
100	59392
100	59670
120	62796
120	63320
120	62952
120	63963
120	63875
140	69651
140	68584
140	69651
140	68950
140	69425
m	243.787
b	34706.5
r^2	0,9938

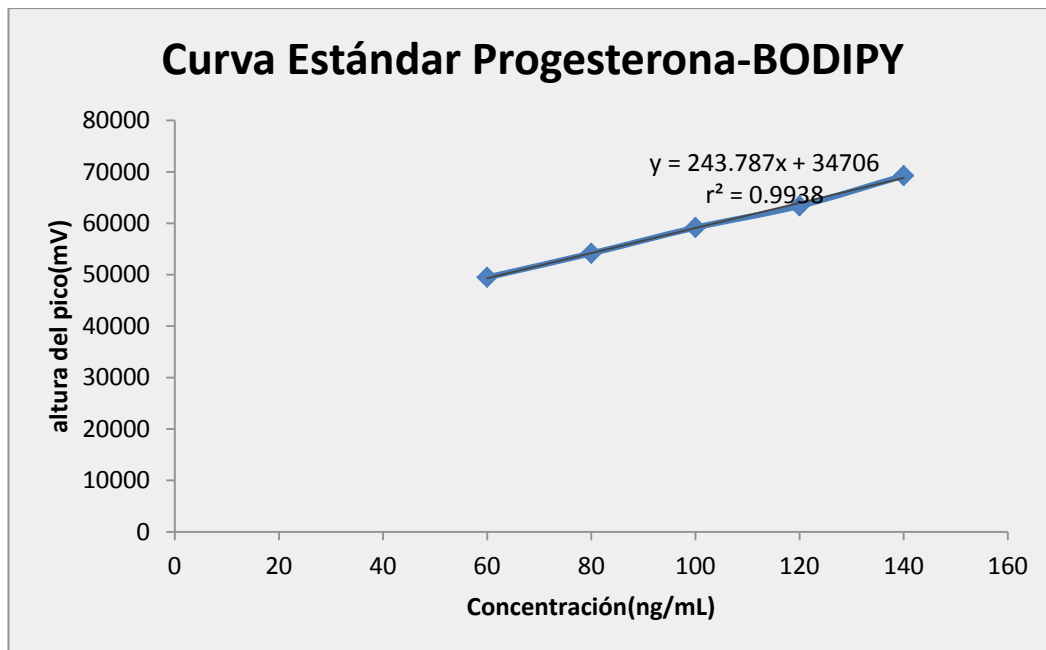


Figura 25 Curva Estándar Progesterona-BODIPY

En la figura 25 se puede observar que existe una respuesta proporcional entre la concentración de progesterona y la altura de pico (mV) por lo que se muestra que la respuesta es proporcional a la concentración de progesterona y que se está llevando a cabo la reacción entre la progesterona y el BODIPY.

Una curva de calibración es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. La calibración incluye la selección de un modelo para estimar los parámetros que permitan determinar la linealidad de esa curva. y, en consecuencia, la capacidad de un método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de un compuesto en una muestra, dentro de un determinado intervalo de trabajo. Se observa una $m = 243.787$, es decir es el valor del incremento que se produce en la altura del pico (mV) cuando la concentración aumenta. Por otro lado se puede observar que la ordenada al origen $b = 34706.5$ que es el valor en el que la recta corta al eje Y (altura del pico en mV). El coeficiente de correlación $r^2 = 0.9938$, la cual indica el grado de relación entre la concentración y la respuesta. Cabe señalar que si r^2 es cercano a la unidad significa que existe correlación. Es importante mencionar que se eligió estos niveles de concentración, con 100ng como concentración media, ya que es lo que se agrega a las muestras de suero para que al establecer y validar el método puedan ser cuantificadas.

7.5 Reacción entre la progesterona extraída del suero y el BODIPY.

Con las muestras de sangre facilitadas por el M.V.Z Urbiola se trató el suero para extraer la progesterona usando agua y diclorometano, obteniendo la extracción de progesterona de las muestras tratadas ya que al tomar las lecturas en el HPLC obtuvimos dos picos característicos en las muestras tratadas, el primero del BODIPY y el segundo del complejo que se forma entre la progesterona y el BODIPY. La extracción fue muy importante debido a que si la progesterona no se extraía de las muestras de suero con las condiciones planteadas en este trabajo se tenía que buscar alternativas para la extracción y su cuantificación además de observar que este método de extracción es útil, ya que el BODIPY no reacciona con otros compuestos encontrados en el suero. Uno de los factores que nos afectaron en la extracción de progesterona del suero fue el tiempo de agitación ya que originalmente el tiempo de agitación era de un minuto pero se observó que donde se muestra una mayor extracción o picos del complejo Progesterona-BODIPY fue al minuto 5, pudiendo extrapolar los valores obtenidos en la curva estándar realizada obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Concentración de progesterona (ng/mL) en el suero sanguíneo de bovinos tratados con las distintas formulaciones durante distintos días extrapoladas en la curva estándar.

Formulación	Días					
	1	3	5	7	9	11
1.1	93.32	92.61	93.13	93.26	93.07	92.10
2.1	94.49	92.46	92.21	92.06	91.98	92.19
2.2	94.14	92.68	93.17	92.26	92.08	91.73

Como se puede observar en la tabla 7, se observa que las concentraciones entran dentro de la curva estándar que era lo que se esperaba al agregar 100ng de esta a las muestras de suero, por lo que la concentraciones utilizadas en la curva estándar se ajustan a esta extracción para posteriormente al tener muestras de suero de toro que se utilizaría como blanco, realizar el estudio de cuanta progesterona se está recuperando del suero teniendo

ya un método validado. Cabe mencionar que la concentración de progesterona en bovinos es menor a 1ng/mL. La P4 liberada es estructuralmente idéntica a la endógena y tiene un rol importante sobre la dinámica folicular ovárica de los niveles supraluteales (> 1 ng/mL) obtenidos a los pocos minutos de la introducción del dispositivo que provocan la regresión del folículo dominante y aceleran el recambio de las ondas foliculares. El cese de la secreción de productos foliculares (Estrógeno e Inhibina) produce el aumento de FSH que va a ser la responsable del comienzo de la emergencia de la siguiente onda folicular. Por otro lado la extracción del dispositivo provoca la caída de la P4 a niveles subluteales (< 1 ng/mL) que inducen el incremento de la frecuencia de los pulsos de LH, el crecimiento y la persistencia del folículo dominante con concentraciones muy altas de Estradiol provocan por un lado el celo y a nivel endocrino inducen finalmente el pico de LH que es seguido por la ovulación por lo que para que los geles de liberación modificada sean útiles tienen que reportar valores arriba de 1ng/mL.

8 CONCLUSIONES

Las formulaciones que presentan mejor propiedad termomecánicas son las 1.1 y 1.2 las cuales contienen PEG 6000, kollicoat, progesterona y etanol-agua; en donde además se observa que el efecto de la concentración de alcohol influye, ya que la formulación 1.1 que contiene una concentración mayor de alcohol presentó mejores propiedades mecánicas al flujo de gel, que la formulación 1.2. En cuanto a las formulaciones con Poloxámero F-127, Quitosano 80 y la mezcla de ambos; se observa que sus propiedades reológicas en todos los casos son de geles débiles ($G'' > G'$) por lo que se sugiere aumentar la concentración de Quitosano, Poloxámero y la mezcla de estos. Lo anterior sirve de estudio para aplicaciones en sistemas de liberación modificada de geles de gelación inversa ya que este tipo de estudios nos da un comportamiento claro de los polímeros utilizados, así como si las concentraciones utilizadas son las que muestran un óptimo desempeño, ya que la formación de geles *in situ* además de este uso son usadas para prevenir las adherencias peritoneales postoperatorias, evitando así el dolor pélvico, obstrucción intestinal e infertilidad además de presentar una mejor eficacia terapéutica y el cumplimiento del paciente.²⁰

Por otra parte, se desarrolló una reacción de derivatización con el BODIPY y progesterona en presencia de ácido trifluoroacético como catalizador, se establecieron las condiciones para llevar a cabo esta reacción y así poder cuantificar la progesterona. Se desarrolló un método analítico para cuantificar la progesterona realizando una curva estándar para su cuantificación por HPLC con detector fluorescente. Para la curva estándar se obtuvo un $r^2 = 0.9969$ que nos muestra que existe una correlación entre los valores; y una ecuación de la recta de $Y = 243.787x + 34706$. Para la extracción de progesterona se obtuvo que al extrapolarlos entran en las concentraciones de 90-100ng de la curva estándar.

9 PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

- Establecer un estudio controlado para realizar el estudio de biodisponibilidad y farmacocinética de los geles de progesterona en sangre de bovinos de acuerdo a la normatividad vigente.
- Realizar los estudios de liberación de las distintas formulaciones empleadas.
- Validar el método y sistema de cuantificación de progesterona.

10 ANEXOS



11 BIBLIOGRAFÍA

1. **BARNES, H. A., HUTTON J. F. and WALTERS, K.** *An Introduction to Rheology*. Amsterdam : Elsevier, 1989.
2. **W.Jr, BILLMEYER Fred.** *Ciencia de los polímeros*. 2004 : Reverte, España. págs. 187, 201-203.
3. **A, Barnes HA.** *handbook of elementary rheology*. University of Wales: Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 2000.
4. **GAYNOR M. Kavanagh, ROSS-MURPHY Simon B .** *Rheological Characterisation of polymer gels..* Great Britain : Prog. Polym. Sci, 1998, Vol. 23, págs. 533-562.
5. **ROJAS Orlando, BRICEÑO María Isabes y AVENDAÑO Jorge.** *Fundamentos de reología*. Mérida- Venezuela : Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería Química, 2012. págs. 34-36.
6. s.l. : Internacional Journal Of. Pharmaceutics., 2005, Vol. 5.
7. **K, ALMDAL, y otros, y otros.** *Towards a phenomenological definition of the tem "gel"*. s.l. : Polymer Gels and Networks, 1993. págs. 5-17.
8. **Helene, HÂGERSTRÔM.** *Polymer Gels as Pharmaceutical Dosage Forms. Rheological Performance and Phisicochemical Interactions at the Gel- Mucus Interfase for Formulations Intended for Mucosal Drug Delivery*. Uppsala : Acta Universitatis Uppsaliensis, 2003. págs. 9-10.
9. **INZÓN Nelson, ESPINOSA Armando, PERILLA Jairo y otros.** *Modelamiento del hinchamiento y difusión de solutos en hidrogeles*. P 2, 2002, Revista Iberoamericana de Polímeros, Vol. 3, págs. 39-40.
10. **Katime et.al,** *Polymer International*. Vol. 40, 281, 1996.
11. **Hsieh, D** “Controlled Release Systems: Fabrication Technology”. CRC Press., 1988.
12. **J-M, GUENET .** *Thermoreversible gelation of polymers and biopolymers..* London : s.n., 1992, Academic Press.
13. **35:429, REED MC (1943) IndEngChem.**
14. **20. DOTY P, WAGNER H, SINGER S (1947) J PhysChem 51:32.**
15. **ALMDAL K, DYRE J, HVIDT S, KRAMER O.** *Polymer Gels Networks .* 5, 1993, Vol. 1.
16. **HENGSTENBERG J, SCHUEH E.** *MakromolChem .* 55, 1964, Vol. 74.
17. **VARGAS Xiomara, Afanasjeva Natalia, Álvarez Mario.** *The evolution of the viscoelastic behavior of the asphalt induced for thermo-oxidation in situ in a rheo-reactor*. 155, 2008, Dyna, Vol. 75, págs. 191-198.
18. **SOLTERO M. J. Felix Armando, COTA Preciado Luis, González Romero Victor Manuel y PUIG A. Jorge E.** *Caracterización reológica de dispersiones de cristales líquidos isotrópicos*. 1, s.l. : Tecnol. Ciencia Ed, 1989, Vol. 4, págs. 1-9.
19. **MORRIS, E. R.** *Rheology of Hydrocolloids*. 1984.
20. **K.te, NIJENHUIS.** *Thermoreversible Networks. Viscoelastic Properties and Structure of Gels*. Alemania : Springer, 1997, págs. 166-179.
21. **Wataru K, Yasuhiro K, Miyazaki S, Attwood D .** *In situ gelling pectin formulations for oral sustained delivery of paracetamol..* 9, 2004, Drug Develop Ind Pharm , Vol. 30, pág. 593.
22. **Abram, AP.** “Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones”. Perú : Fondo Editorial, 2004.
23. **Kato Y, Onishi H, Machida Y** *Current Pharmaceutical Biotechnology..* 303, 2003, Vol. 4.
24. **Sastre, R., De Aza, S.** “Biomateriales”. Italia : Litográfica Faenza, 2004.

25. **SÁNCHEZ B. Andrés, SIBAJA B. María, VEGA-BAUDRIT José, MADRIGAL C. Santiago.** *Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (Pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomedicas.* 4, 2007, Revista iberoamericana de Polímeros, Vol. 8, págs. 241-267.
26. **Rojas O, Moya M, Sibaja M, Ruepert C, Vega-Baudrit JR.** 3, Revista iberoamericana de Polímeros, Vol. 5, pág. 133.
27. **M. Dasha, F. Chiellini , R.M. Ottenbrite, E. Chiellini ,** *Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications..* 981–1014, s.l. : ELSEVIER, 2011, Progress in Polymer Science .
28. **Volker, BÜHLER.** Kollicoat grades. Functional polymers for the pharmaceutical industry. Alemania : BASF- The chemical company, 2007, págs. 69-72.
29. **MUTSCHLER Ernst, DERENDORF Hartmut.** Drug actions. Basic principles and therapeutic aspects. *Drug actions. Basic principles and therapeutic aspects.* Germany : Medpharm scientific publishers Stuttgart, 1995, págs. 294-296.
30. **BROMBERG LE, Ron ES.** *Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery.* s.l. : Adv Drug Deliv Rev , 1998, Vol. 31.
31. **CAPELLO J, CRISSMAN JW, CRISSMAN M, FERRARI FA, Textor G, WALLIS O, et al.** *In-situ self-assembling protein polymer gel systems for administration, delivery, and release of drugs.* . [ed.] J Control Release. 17, 1998, Vol. 23, pág. 105.
32. **P, LINDMAN B. Alexandridis.** *Amphiphilic block polymers.* Amsterdam : Elsevier, 2000.
33. **ESPOSITO E, Carratto V & et al.** *Comparative analysis of tetracycline containing dental gels poloxomers and mono-glycerides based formulation.* s.l. : Int.J.Pharm, 1996, Vol. 142, págs. 9-23.
34. **NIRMAL H.B, BAKLIWAL S.R., PAWAR S.P.** *In-Situ gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System.,* s.l. : International Journal of PharmTech Researc, 2010, Vol. 2, págs. 1398-1408.
35. **GINTHER, O.J., L. KNOPF and J.P. KASTELIC.** *Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy.* s.l. : Biol. Reprod, 1989, Vol. 41: 247254. .
36. **Ramón., GASQUE GÓMEZ.** Enciclopedia bovina. México : Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 2008, págs. 391-394.
37. **M.G, COLAZO, y otros,** *El uso de tratamientos hormonales para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas.* . 1, s.l. : Ciencia Veterinaria., 2007, Vol. 9.
38. **María, HERNÁNDEZ PÉREZ José.** *Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.* Badalona : Ed Cont Lab Clin, 2005, Vol. 8, págs. 49-62.
39. **Elizabeth, PRICHARD.** *High Performance Liquid Cromatography.* Cambrige : JGC (Teddington), 2003. págs. 1-2.
40. **McGrath, J. C., Arribas, S., Daly, C. J.** 1996, Vol. 17, págs. 393-399.
41. **McGrath, J. C., Daly, C. J. Br. J.** *Pharmacol.* 2003, Vol. 139, pág. 187–189.
42. **Gómez-Recuero, Valentín Hornillos.** *ANÁLOGOS FLUORESCENTES DE FÁRMACOS LIPÍDICOS CON ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA Y ANTINEOPLÁSTICA: DISEÑO, SÍNTESIS Y APLICACIONES.* Madrid : FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, 2010. págs. 16-25.
43. **Haugland, R. P.** *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals.* Eugene, Oregon : Molecular Probes Inc, 2002. págs. 1-6.
44. **Treibs, A., Kreuzer, F. H.** *Liebigs Ann. Chem.* . 1968, Vol. 718, págs. 208-223.
45. **Shah, M., Thangraj, K., Soong, M. L., Wolford, L., Boyer, J. H., Politzer, I. R., Pavlopoulos, T. G.** *Heteroatom Chem.* 1990, Vol. 1, págs. 389-399.
46. **Van, Koeveringe, J. A., Lugtenburg, J.** *Recl.Trav. Chim. Pays-Bas* . 55, 1977, Vol. 96.
47. **Ulrich, G., Ziesel, R., Arriman, A.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, Vol. 47, pág. 1184.

48. **BERT O. HAGLUND, RAJASHREE Joshi, KENNETH J. Himmelstein.** *An in situ gelling system for parenteral delivery.* 41, s.l. : Journal of Controlled Release, 1996, págs. 229-235.
49. **ROSS-MURPHY, S.B. & Picout, R.D.** *Thermoreversible and Irreversible Physical Gels from Biopolymers.* s.l. : Polymers Gels and Networks, 2002, págs. 28-46.
50. **C. A. Kienzle-Sterzer, D. Rodriguez-Sanchez and C. K. Rha.** “Flow behavior of a cationic biopolymer: Chitosan”. 1985, Polym. Bull., Vol. 13, págs. 1-6.
51. **WANG Yuan, QIU Dong, COSGROVE Terence y DENBOW Mark L.** “A small-angle neutron scattering and rheology study of the composite of chitosan and gelatin”. s.l. : ELSEVIER, 2008, Vol. 70, págs. 254-258.
52. **EDSMAN Katarina, CARLFORS Johan y PETERSSON Roger.** “Rheological evaluation of poloxamer as an in situ gel for ophthalmic use”. 1998, European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 6, págs. 105-112.
53. **Dumortier, G., Grossiord, J., Agnely, F., Chaumeil, J.** *A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics.* 2006, Pharm. Res, Vol. 23, págs. 2709–2728.
54. **GRATIERI Taïs, MARTINS Guilherme, MELANI Eduardo, SARMENTO Victor y otros.** “A poloxamer/chitosan in situ forming gel with prolonged retention time for ocular delivery”. 2010, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics., Vol. 75, págs. 186-190.
55. **Pérez, José María Hernández.** *CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA.* Badalona : Cont Lab Clin , 2005, SEQC, Vol. 8, págs. 49-62.