



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE PROGESTERONA EN FLUIDOS DE
BOVINOS PARA EL MONITOREO DE LA LIBERACIÓN DE UN GEL
DE FORMACIÓN *IN-SITU***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA**

PRESENTA:

BRENDA CASTILLO DOMÍNGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: TANIA CAMPOS GONZÁLEZ**

VOCAL: **Profesor: MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD**

SECRETARIO: **Profesor: LUZ ANTONIA BORJA CALDERÓN**

1er. SUPLENTE: **Profesor: JUAN LUIS GUTIÉRREZ VELÁZQUEZ**

2° SUPLENTE: **Profesor: MARCELA MIRELLE MARÍN AGUILAR**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 001 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO F,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, CIUDAD UNIVERSITARIA.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA JOSEFA BERNADBERNAD _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. VIRIDIANA GISELA LLERA ROJAS _____

SUSTENTANTE (S):

BRENDA CASTILLO DOMÍNGUEZ _____

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. ÍNDICE DE CONTENIDO.....	3-4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 Ciclo estral bovino.....	6-7
3.1.1 Control del ciclo estral y su sincronización en el ganado.....	7-9
3.2 Hormona Progesterona. Propiedades.....	10-11
3.3 Sistemas de liberación modificada.....	12
3.3.1 Sistemas de tipo implante.....	12-15
3.3.2 Implantes de formación in-situ.....	15-17
3.3.3 Presentaciones comerciales.....	19
3.4 Fabricación de un gel para la obtención de un implante de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida.....	19-22
3.5 Reproducción y caracterización de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida.....	23
3.5.1 Pruebas de calidad.....	23
3.5.1.1 Inyectabilidad.....	23-24
3.5.1.2 Determinación de pH.....	25
3.5.1.3 Formación del implante.....	25-26
3.5.1.4 Velocidad de intercambio de disolventes.....	26-27
3.5.1.5 Reología.....	28-29
3.6 Métodos de cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.....	30-31
3.7 Validación de un método analítico.....	31
3.7.1 Definiciones.....	31-34
3.7.2 Clasificación de métodos analíticos.....	34-35
3.7.3 Parámetros de desempeño a evaluar para la validación de un método analítico.....	35-38
3.7.4 Pruebas de validación de un método analítico.....	39-45
4. OBJETIVOS.....	46
4.1 Objetivo general.....	46
4.2 Objetivos particulares.....	46
5. METODOLOGÍA GENERAL.....	47
5.1 Fabricación del gel de progesterona.....	48
5.2 Caracterización de la formulación (pruebas de calidad).....	48-50
5.3 Administración de la formulación en rumiantes.....	50
5.4 Desarrollo del método analítico.....	51
5.4.1 Condiciones cromatográficas.....	51
5.5 Validación del método analítico.....	51-54
5.6 Obtención y tratamiento de muestras de fluidos biológicos bovinos.....	54
5.6.1 Extracción de Progesterona en fluidos biológicos bovinos.....	55-57
5.7 Evaluación del implante de formación in-situ.....	57
5.8 Comparación del implante de formación in-situ con respecto a los productos comerciales.....	58
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58

6.1	Formulación y caracterización de geles para la obtención de implantes de formación <i>in-situ</i> de progesterona por el método de dispersión sólida.....	58
6.1.1	Formulación del gel.....	58
6.1.2	Pruebas de calidad.....	59-71
6.2	Desarrollo y validación del método analítico.....	72
6.2.1	Desarrollo del método analítico.....	72-74
6.2.2	Validación del método analítico.....	75-87
6.3	Obtención y tratamiento de las muestras de fluidos biológicos bovinos.....	87
6.4	Evaluación del implante de formación <i>in-situ</i> en un sistema <i>in-vivo</i>	88-93
6.5	Comparación del implante de formación <i>in-situ</i> con respecto a los productos comerciales.....	94
7.	CONCLUSIONES.....	95
8.	REFERENCIAS.....	96-99
9.	ANEXOS (POLÍMEROS, ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS).....	102-114

2. Introducción

La producción mundial de carne de bovino presentó un aumento en 2017 del 1.4 por ciento, mientras que en México presentó un incremento del 1.6 por ciento. Lo que significa un aumento de 1.8 millones de toneladas de carne de bovino para consumo humano, que la industria ganadera mexicana no puede satisfacer, ya que la producción de ganado en México no es suficiente para cubrir la demanda de consumo (FIRA, 2017). La baja eficiencia reproductora se traduce en mermas directas en la producción láctea y cosecha de becerros, e indirectamente en la producción anual de la carne (por disminución de becerros destetados). Las causas recaen en el proceso reproductivo, que se encuentra regulado por el sistema endócrino de los bovinos e influenciado en gran medida, por las condiciones en que se desenvuelven los animales (Gasque, 2008).

Una de las vías para mejorar la productividad de la industria ganadera, es lograr que las hembras puedan concebir crías a una menor edad y reducir el tiempo necesario de anestro después del parto. Lo descrito anteriormente, puede conseguirse al regular hormonalmente el ciclo estral de las vacas. Esto puede llegar a facilitar o incluso eliminar la detección del estro, dando paso a una inseminación artificial con mayor probabilidad de éxito, y al ser varias hembras, pueden realizarse en el mismo periodo de tiempo. Además, permite que la calidad del ganado aumente, pues es posible que los mismos genes de un toro que sea genéticamente superior, sean utilizados dando como resultado adicional, una reducción del periodo de gestación (González, 2018). Dado que las hormonas exógenas, pueden imitar las hormonas liberadas en el ciclo estral natural, al administrarlas en el ganado, los productores de esta industria pueden controlar y sincronizar el estro, así como disminuir el tiempo que duran los ciclos, reduciendo así los gastos de monitoreo del ciclo estral. Además, es más probable lograr la preñez de un mayor número de animales. Algunos regímenes de sincronización del estro, pueden inducir o adelantar el estro de animales acíclicos, o anestros. Esto último, permite que una vaca entre en celo antes de lo natural, y también que un becerro adelante su primer estro (FDA.gov, 2018).

La administración de prostaglandina se considera el método más comúnmente utilizado para la sincronización del celo. Sin embargo, su detección lleva mucho tiempo, recursos y mano de obra, además de que depende de las influencias ambientales; sin mencionar que suele ser ineficiente e imprecisa. Por lo tanto, el uso de progestágenos ha sido utilizado para extender la fase lútea, resultando en mayor cantidad de animales detectados en celos, en un periodo más corto, pero con menor fertilidad (Colazo, 2007). Actualmente, los implantes representan uno de los métodos de liberación modificada mayormente utilizados para lograr este propósito (PISA, 2018). En el presente trabajo, se muestra la fabricación, caracterización y evaluación de un implante de formación *in-situ* de progesterona, que busca cubrir los objetivos anteriormente mencionados.

3. Marco teórico

3.1 Ciclo estral bovino

El ciclo estral, se define como el tiempo transcurrido entre dos ovulaciones, también conocidos como estros. El estro, normalmente es referido como el día cero del ciclo, y corresponde al tiempo en el cual una hembra es capaz de aceptar sexualmente a un macho (Adams, et, al., 1992).

En el caso de las vacas, el ciclo tiene una duración de 21 días, mientras el estro, tiene un aproximado de 15 horas. La interrupción del ciclo estral, o anestro, puede llegar a ser causado por factores como el embarazo, lactancia, edad del animal, enfermedades y desórdenes hormonales (Troxel, 1982).

El ciclo estral, se divide principalmente en dos fases; la primera, la fase folicular que se caracteriza por el desarrollo de un folículo, que es una estructura en el ovario que contiene al óvulo, y la producción de estrógenos. Una vaca por lo general, cuenta con dos o tres grupos de folículos en el ovario, que se desarrollan en cada ciclo estral. Un folículo en cada "ola" se convierte en un folículo dominante; donde al inicio del ciclo estral, cuando los niveles de progesterona son altos, el folículo dominante no sufre ovulación, sino que presenta una regresión, permitiendo que surja una nueva ola de folículos (Adams, et, al., 1992).

En cuanto el nivel de progesterona es bajo, ocurre la última ola, y el folículo dominante presentará crecimiento, produciendo a su vez, un aumento de estrógenos, induciendo así a que la vaca entre en estro o "celo". (Troxel, 1982).

Los niveles de estrógeno alcanzados, también tienen como consecuencia la estimulación del hipotálamo para liberar la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), justo antes de la ovulación. Lo anterior, provoca que la glándula pituitaria en el cerebro, libere la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que viajan en la sangre para llegar al ovario. Su función principal, es encargarse de regular la actividad de los folículos (FDA.gov,2018).

La FSH es secretada poco antes y durante el estro, ocasionando el desarrollo de una nueva ola de folículos. Mientras que la presencia de LH provoca que el folículo dominante se rompa aproximadamente de 24 a 32 horas después, liberando así al óvulo (Troxel, 1982).

La ovulación marca la transición de la fase folicular a la fase lútea (FDA.gov,2018).

Durante la fase lútea, los niveles de estrógenos disminuyen con rapidez, mientras que las células del folículo roto comienzan a crecer y dividirse para formar el *corpus luteum*. El cuerpo lúteo produce progesterona, y si existe fecundación, entonces la estructura se mantiene para asegurar un embarazo exitoso. Durante los primeros

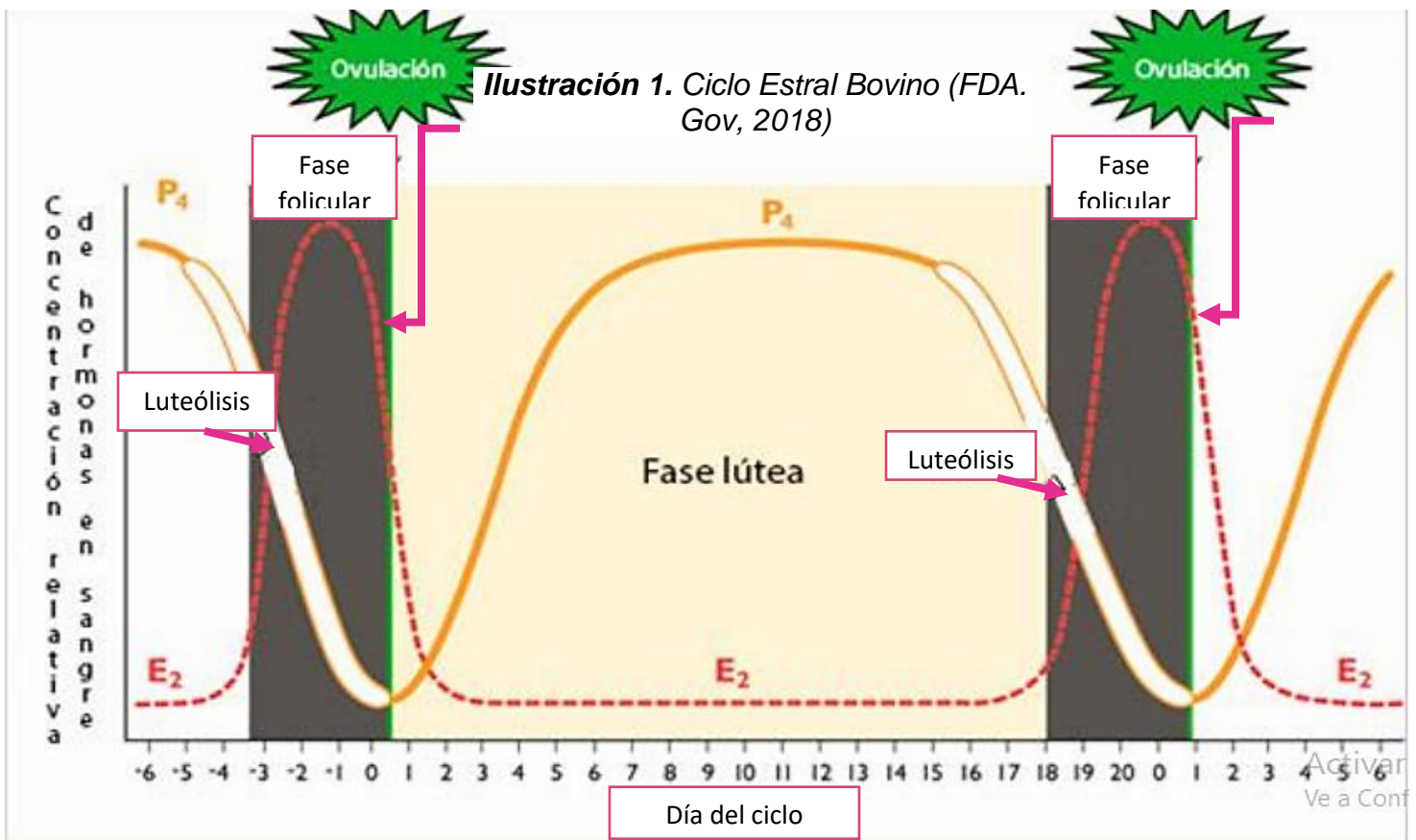
10 días del ciclo estral, el cuerpo lúteo madura y aumenta de tamaño al igual que la producción de progesterona (Troxel, 1982).

En condiciones de concentraciones altas de esta hormona, se presentan varias olas de folículos en el ovario con sus respectivas regresiones sin que ninguno sufra ruptura, la cual se presentará en la siguiente fase folicular cuando los niveles de progesterona hayan descendido después de 16 o 17 días. Lo anterior, es debido a que en el útero, se produce prostaglandina $F2\alpha$ que destruye el cuerpo lúteo (luteólisis). Posteriormente, se produce estrógeno y se da la liberación de LH y FSH, que da paso a una nueva fase folicular (FDA.gov, 2018).

Sin embargo, cuando existe fecundación, la presencia del embrión se encarga de inhibir la producción de prostaglandina $F2\alpha$ en el útero, por lo que los niveles de progesterona se mantienen y el ciclo estral se ve interrumpido. El periodo de gestación dura alrededor de 283 días y la edad más conveniente para el primer parto en una vaca, ronda aproximadamente los dos años, por lo que debe alcanzar la pubertad y quedar preñada entre los 14 o 15 meses de edad (FDA.gov, 2018).

3.1.1 Control del ciclo estral y su sincronización en el ganado

Debido a que las hormonas sintéticas o exógenas, pueden imitar a las hormonas producidas naturalmente durante el ciclo estral, al administrarlas, los productores de la industria pueden controlar y sincronizar el estro de un mayor número de rumiantes, disminuir el tiempo o la duración de los ciclos, disminuir los gastos de monitoreo del ciclo estral, así como aumentar la probabilidad de preñez en un mayor número de animales. El uso y administración de estos tratamientos tienen como objetivo que los animales tengan crías a edades mucho más tempranas, así como disminuir el tiempo de anestro después de un parto (FDA.gov, 2018).



Hoy en día, existen diferentes tratamientos en el mercado para lograr la sincronización del estro en un mayor número de animales de ganado; sin embargo, los principales se encuentran basados en tres clases de fármacos, que a continuación se presentan:

- Clase gonadorelina

Los fármacos de esta clase, tienen un comportamiento similar a la GnRH que es liberada por el hipotálamo durante el ciclo estral; por lo que propicia la secreción de LH y FSH para inducir el desarrollo de una ola de folículos en el ovario y ovulación (FDA.gov, 2018).

- Clase prostaglandina

Tabla 1. Régimen de medicamentos para el control de la sincronización del ciclo estral en rumiantes. Clases Gonadorelina/Prostaglandina (FDA.gov, 2018).

Tratamiento o régimen	Nombre del medicamento	Número de dosis	Uso secuencial con otro régimen
Gonadorelina/ Prostaglandina	Fertagyl (gonadorelina)	3	Estrumato (cloprostenol sódico)
	GONAbreed (acetato de gonadorelina)	3	Cloprostenol sódico
	Inyección Factrel (gonadorelina)	2 a 3	LutalyseHighCon o inyección de Lutalyse (inyección de dinoprost- trometamina)
Prostaglandina	estroPLAN (cloprostenol sódico)	1 a 2	NA
	Estrumato (cloprostenol sódico)	1	NA
	LutalyseHighCon o inyección de Lutalyse (inyección de dinoprost- trometamina)	1 a 2	NA
	ProstaMate (dinoprost- trometamina)	1 a 2	NA

Tienen como objetivo promover la luteólisis una vez que el cuerpo lúteo se encuentra lo suficientemente maduro para dar reinicio al ciclo estral, pues su actividad se enfoca en mimetizar a la prostaglandina F2 α que es liberada por el útero cuando no hay presencia de embarazo. Cabe mencionar, que esta clase de fármacos al ser utilizados en los primeros cinco días del ciclo, no presentan efecto dado que el cuerpo lúteo en ese periodo es inmaduro y no es capaz de reaccionar frente a la prostaglandina F2 α (FDA.gov, 2018).

- Clase progestina

Esta clase de fármacos, simulan la acción natural de la hormona progesterona, secretada por el cuerpo lúteo. Tienen como objetivo, suplementar los niveles de progesterona en la vaca para influenciar la liberación de FSH y LH, suprimir el estro, bloquear la ovulación y sincronizar el ciclo estral (FDA.gov, 2018).

Gracias a los avances tecnológicos, la síntesis de progesterona hoy en día se realiza a partir del uso de fitoesteroides tales como el sitosterol, stigmasteril, campesterol y otros análogos, a través de reacciones enzimáticas llevadas a cabo por bacterias del género *Mycobacterium*, logrando sintetizar precursores con alto rendimiento para generar hormonas esteroideas una vez sometidos a pirólisis en condiciones de vacío, lo que resulta en una mayor rentabilidad en comparación al método inicial, donde las hormonas eran extraídas directamente de animales (porcinos) o la extracción de los precursores en forma de esteroides vegetales o saponinas.(Al Jasem, Khan, Taha et al, 2014).

Tabla 2. Régimen de medicamentos para el control de la sincronización del ciclo estral en rumiantes. Clase Progestina/Prostaglandina (FDA.gov, 2018).

Tratamiento o régimen	Nombre del medicamento	Número de dosis	Uso secuencial con otro régimen
Progestina	EAZI-Breed CIDR inserto para ganado (inserto intravaginal de progesterona)	1	NA
Progestina/ Prostaglandina	EAZI-Breed CIDR inserto para ganado (inserto intravaginal de progesterona)	1	LutalyseHighCon o inyección de Lutalyse(inyección de dinoprost-trometamina)

3.2 Hormona Progesterona. Propiedades

La progesterona es una hormona progestacional fisiológica (Al Jasem, Khan, Taha et al, 2014).

Es una hormona tipo esteroidea, por lo que la mayor parte de su estructura es hidrofóbica. Sin embargo, está compuesta de dos grupos carbonilo que le permiten tener interacción con el agua (Drugbank.ca, 2018).

A su vez, no se ha reportado inestabilidad o ionización dependiente del pH. Presenta una vida media alta, de 34.8 a 55.12 horas, debido a su alta unión a proteínas plasmáticas (96-99%). Su metabolismo, incluye glucuronidación y sulfatación; mientras que la excreción de metabolitos se da principalmente en orina y bilis (Drugbank.ca, 2018).

La actividad progestacional de la progesterona, se debe principalmente a que inicia el cambio de la fase proliferativa a la fase secretora del útero, disminuyendo la formación de moco en el cuello uterino, y aumentando la viscosidad de la mucosa cervical; inhibiendo así la liberación de LH de la glándula pituitaria y en consecuencia provocando la inhibición de la ovulación, aumento de la temperatura basal del cuerpo y mantenimiento del embarazo.

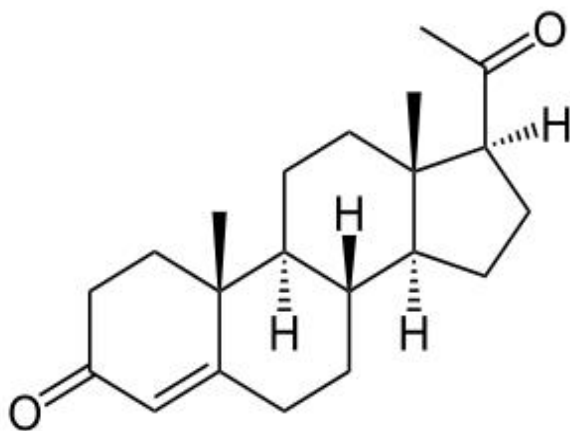


Figura 1. Estructura de la Progesterona (TodoesQuímica, 2019)

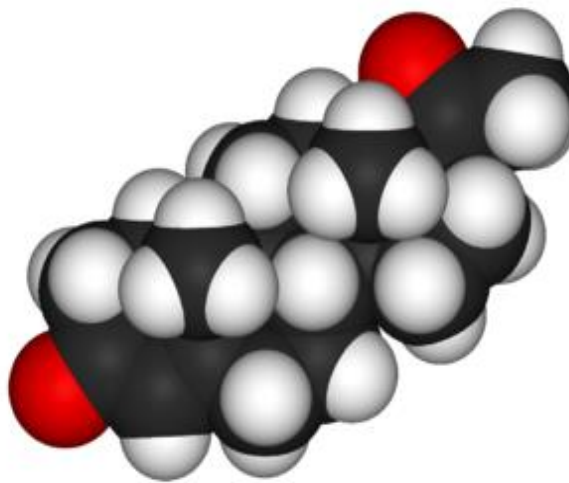


Imagen 2. Estructura de la Progesterona (TodoesQuímica, 2019)

La progesterona en cantidades relativamente elevadas, inhibe la ovulación por supresión de la estimulación gonadotrópica. Estimula el crecimiento de las zonas secretoras glandulares de tipo uterino y mamario después de la preparación por estrógenos. La secreción de esta hormona pueden ir desde unos miligramos por día durante la fase folicular del ciclo, durante la fase luteínica y durante la parte final del embarazo. La progesterona tiene efecto a nivel de endometrio y miometrio. En el primero, induce la fase secretoria, donde las glándulas endométricas crecen y

secretan grandes cantidades de carbohidratos que posiblemente serán utilizados por el óvulo fecundado como fuente de energía. Mientras que para el miometrio, su función principal consiste en detener las contracciones espontáneas y rítmicas del útero, para que el embrión se mantenga implantado en él (Aranda, 2011).

Su mecanismo de acción consiste en que la hormona es liberada durante la fase luteínica del ciclo, disminuyendo la proliferación endometrial impulsada por estrógenos y conduce al desarrollo de un endometrio secretor. La declinación repentina de la liberación de progesterona a partir del cuerpo amarillo, al final del ciclo, constituye el principal determinante del inicio de la menstruación. Cuando artificialmente se alarga la duración de la fase luteínica, es posible inducir cambios en el estroma endometrial, similares a los que se observan al principio de un embarazo. En condiciones normales, los estrógenos anteceden y acompañan a la progesterona en esta acción sobre el endometrio y son esenciales en la aparición del patrón menstrual normal (Tiburcio, 2019).

Como otras hormonas, la progesterona en el humano, se metaboliza principalmente en hígado y se elimina por vía renal y biliar; principalmente por medio de la orina (Aranda, 2011).

Por otra parte, en los 40's se comprobó su utilidad para el control del ciclo estral en los rumiantes, al aplicar inyecciones diarias por 14 días, pues 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). Por ello, la PG es utilizada como principio activo en la formulación de un implante de formación *in-situ*, que pertenece al grupo de formas farmacéuticas de sistemas de liberación modificada.

Tabla 3. Propiedades físicoquímicas de la progesterona (Drugbank.ca, 2018)

Propiedad	Valor
Nombre químico	Pregn-4-en-3,20-diona
Fórmula condensada	$C_{21}H_{30}O_2$
Descripción	Es un polvo cristalino, inoloro, de color blanco o blanco cremoso. Es estable en el aire.
Peso molecular	314.47 g/mol
Punto de fusión	121°C
Solubilidad	Su solubilidad en agua es de 8.81 mg/L. Es soluble en alcohol, acetona y dioxano
Log P	3.87
Log S	-4.43
Absorción	Buena absorción por vía oral, vaginal, rectal e intramuscular
Unión a proteínas	96-99% principalmente a albúmina sérica

3.3 Sistemas de liberación modificada

En esta clase de sistemas, la liberación es el paso limitante en la farmacocinética del fármaco, pues suele ser más lenta que la absorción en el torrente sanguíneo, a diferencia de las formas farmacéuticas convencionales (mezclas de una o más sustancias con actividad terapéutica con otras sustancias de tipo inerte, que en conjunto constituyen un medicamento), las cuales no tienen control en la liberación de los fármacos ni del lugar donde se presente, sino que solo obedecen especificaciones para asegurar su desintegración en tiempos adecuados (principalmente tabletas y cápsulas) y donde su farmacocinética comienza con la liberación del fármaco, su absorción en sangre, llegada a su sitio de acción y posterior eliminación. Su paso limitante a diferencia de los sistemas de liberación modificada, es la absorción del fármaco ya que la liberación es inmediata (Bernad, 2017).

Tabla 4. *Sistemas de liberación modificada. Principales ventajas y desventajas (Haan, Lerck, 1984)*

Ventajas	Desventajas
Concentraciones plasmáticas terapéuticas uniformes	Baja flexibilidad de dosificación
Reducción de efectos tóxicos	Concentraciones plasmáticas tóxicas a causa de una mala administración
Reducción de reacciones adversas	Administración errónea por parte del paciente
Fácil seguimiento del régimen terapéutico	
Tratamientos diarios menos costosos	
Mejora en la terapia	
Mejora en el uso racional de medicamentos	

Existen diferentes sistemas de liberación modificada, que se clasifican de acuerdo a su cinética de liberación o estímulos que los regulan (Hann, Lerck, 1984).

- Liberación pulsátil

Formas farmacéuticas caracterizadas por liberar una primera dosis terapéutica inmediata, para que después de cierto tiempo, sea capaz de liberar una segunda dosis (Hann, Lerck, 1984).

- Liberación prolongada

Son sistemas de liberación modificada que permiten que el tiempo de dosificación sea por lo menos, dos veces el convencional. La liberación es paulatina para permitir el efecto terapéutico en un tiempo determinado (Hann, Lerck, 1984).

- Liberación retardada

En este tipo de liberación, el periodo de latencia es mucho mayor que el de una forma farmacéutica convencional, sin alterar la concentración plasmática máxima ni el tiempo de vida media del fármaco; es decir, el fármaco no es liberado de forma inmediata una vez que se ha administrado (Hann, Lerck, 1984).

- Liberación sostenida

Caracterizada por liberar una dosis suficiente del fármaco para generar la actividad terapéutica, prosiguiendo con una liberación de una dosis menor, que permita mantenerla por un periodo de tiempo específico (Hann, Lerck, 1984).

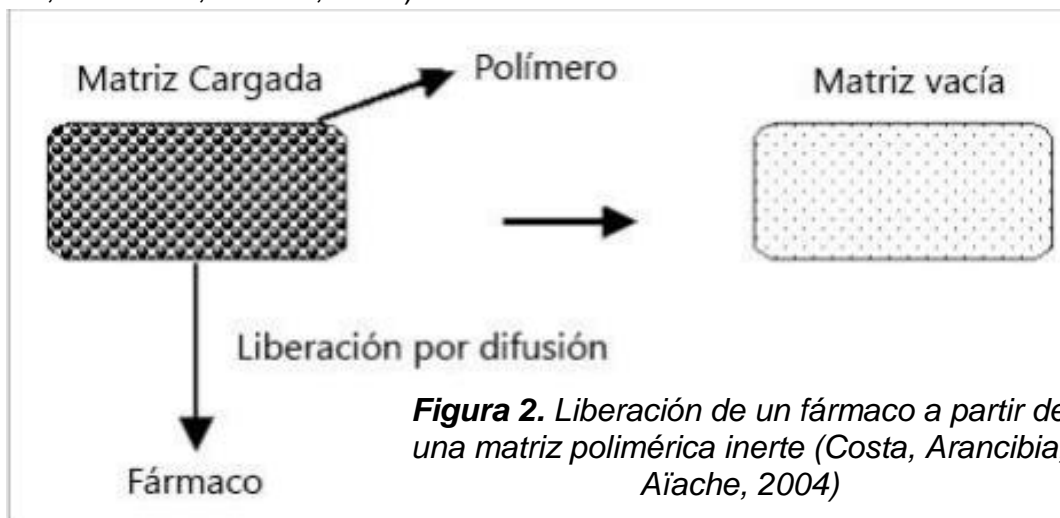
- Liberación regulada por estímulos físicos, químicos o bioquímicos

Se refiere a formas farmacéuticas que dependen de algún estímulo para ser liberados. Pueden ser físicos como la presión osmótica, hidrodinámica o de vapor. Pueden ser activados de forma externa, ya sea de manera mecánica, magnética, sonoforesis, iontoforesis o hidratación. Por estímulos químicos que regulen su liberación, como pH, ambiente iónico e hidrólisis, o bien, de manera bioquímica con el uso de enzimas (Hann, Lerck, 1984).

- Sistemas matriciales

Contienen el principio activo disperso de manera uniforme, y sus características son determinadas por el polímero con las que están formadas. Los principales sistemas matriciales se clasifican en plásticas o insolubles, hidrofílicas y lipofílicas (Costa, Arancibia, Aïache, 2004).

Matriz inerte: Formada de una red sólida y porosa, compuesta de sustancias no tóxicas, que se metabolizan o disuelven en el medio donde se alojarán en su administración *in-vivo*. Su liberación es por difusión y depende de la solubilidad del fármaco, excipientes y su tamaño, así como la forma y área superficial del sistema (Costa, Arancibia, Aïache, 2004).



Matriz hidrofílica: Está conformada por uno o más polímeros (HPMC, etilcelulosa, metilcelulosa, HPC, CMC Na, etc.) que tienen función de agentes gelificantes y por un fármaco relativamente soluble. Una vez que entra en contacto con los líquidos corporales, se hidrata, se hincha y forma una capa de gel que aumenta de espesor, mientras el agua difunde a su interior. Se erosiona y disuelve por completo. Su liberación es por difusión, y entre sus principales ventajas se encuentran su baja dependencia a condiciones fisicoquímicas, fisiológicas, disponibilidad de excipientes y capacidad de formar microambientes de pH seleccionado para regular la solubilidad del fármaco así como su liberación (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

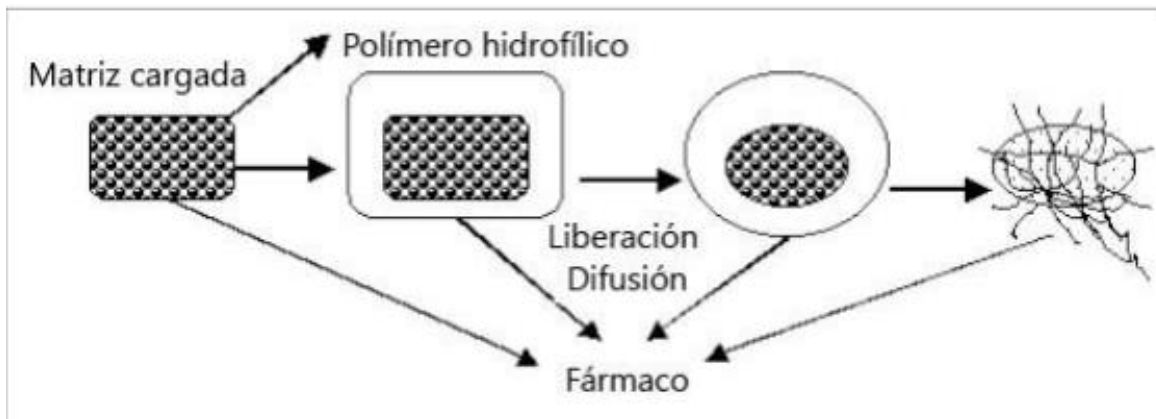


Figura 3. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica hidrofílica (Costa, Arancibia, Aiache, 2004)

Matriz lipídica: Formadas de glicéridos, ácidos y alcoholes grasos, así como de ésteres de ácidos grasos, ceras y un principio activo liposoluble. Presentan biocompatibilidad aceptable y sensibilidad a algunas enzimas y pH's. La liberación de estos sistemas se basa en procesos de erosión, formación de poros y difusión, aunque en menor medida (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

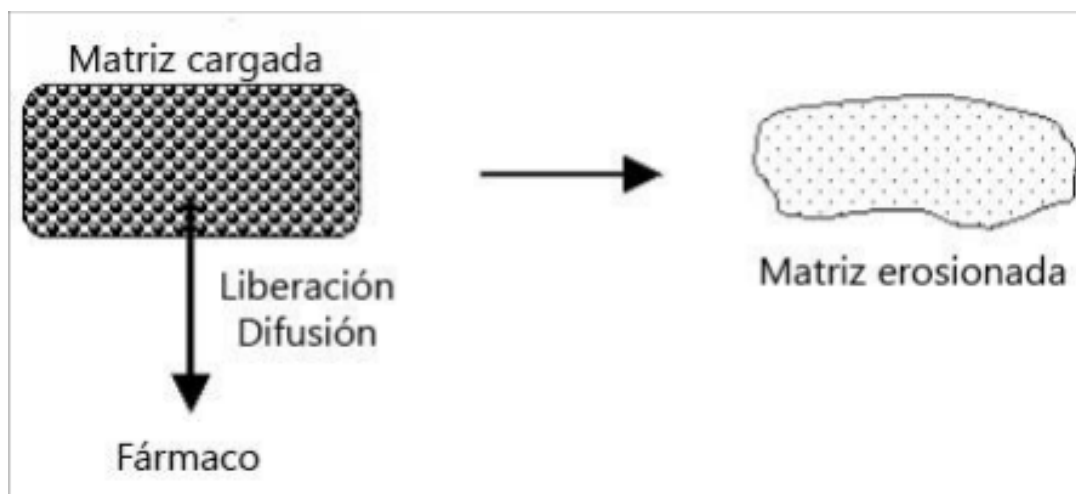


Figura 4. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica lipofílica (Costa, Arancibia, Aiache, 2004)

La importancia de estos sistemas matriciales, es que al ser administrados por vía parenteral, es posible que sean utilizados como implantes (Costa, Arancibia, Aïache, 2004).

3.3.1 Sistemas de tipo implante

Estos sistemas comenzaron con su desarrollo desde los años 30's, con la búsqueda de un nuevo sistema de liberación que fuera sostenido, implantable y administrado por vía subcutánea. Desde su publicación, se incrementó el interés general por dichas formas farmacéuticas, así como sus estudios y demandas. Estos sistemas son considerados cuando se desea una liberación de principio activo, controlada y continua por un periodo largo de tiempo (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

En los implantes, la liberación del principio activo se puede presentar por tres mecanismos diferentes, que incluyen: Control de hinchamiento, bombeo osmótico y difusión. Esta clase de sistemas implantables, pueden ser clasificados como biodegradables o no biodegradables, todo dependiendo del polímero del que estén compuestos. Ya sean siliconas u otros plásticos como EVA (acetato de vinil-etileno), poliuretanos o hidrogeles de acrilatos en el caso de los no biodegradables; y ácido poli-lacticoglicólico o PLGA que se hidroliza en ácido láctico y glicólico, policarbonatos con derivados de tirosina y copolímeros de caprolactona para los implantes biodegradables (Solanki, Thakkar, Jani, 2010).

De manera general, los tipos más comunes de implantes son de tipo reservorio y matrices. Los primeros, poseen un núcleo compacto con el principio activo recubierto por una membrana no biodegradable. El grosor y su permeabilidad, determinan la velocidad de difusión de su fármaco. Mientras que su cinética se basa en que si la concentración del fármaco en el reservorio está en equilibrio con la superficie interna de la membrana, entonces es de orden cero. Pero, es importante mencionar que se requiere de una microcirugía para retirar este sistema del paciente, así como que existe un riesgo de que la membrana se rompa, generando la liberación de toda la dosis contenida, provocando concentraciones plasmáticas tóxicas. Y si bien, existen sistemas biodegradables de esta naturaleza, no son comunes, por lo que es necesario utilizar una membrana de tipo polimérica que tarde más en degradarse que el tiempo que le toma a la dosis completa de principio activo, difundir (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

En el caso de los sistemas matriciales, son utilizados para implantes biodegradables, así como para los no biodegradables. Su cinética de liberación depende de los mecanismos de difusión, pero no es constante de formulación a formulación, sino que depende de la fracción del volumen del principio activo disuelto, y entre mayor sea, la liberación aumenta. Por lo que es importante tener

en cuenta la velocidad de erosión de la matriz, además de las variaciones en el área de contacto, por lo que puede ser necesario el uso de formas geométricas en el diseño del implante, para que no haya un efecto o influencia descontrolada en la liberación del fármaco; sin mencionar, que debe de considerarse también que pueden generarse alteraciones en el medio *in-vivo* que aceleren o disminuyan la erosión de los sistemas, como el pH o temperatura (Rajgor,Patel, Bhaskar, 2011).

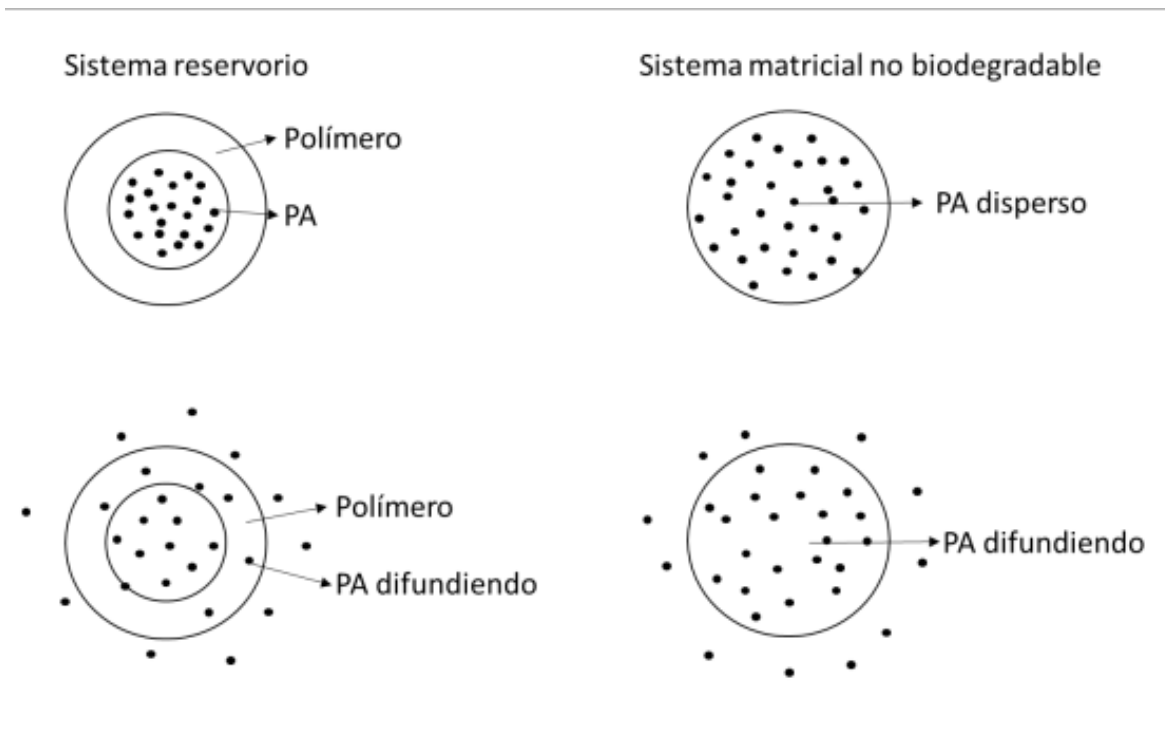


Figura 5. Liberación de un principio activo en sistemas de tipo reservorio y matricial (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011)

Por otro lado, se han diseñado diferentes sistemas de bombeo, como el de infusión, peristáltico, osmótico, desplazamiento positivo y microbombas de liberación controlada (Patel, Bhaskar, 2011).

Las características ideales de dichos sistemas, incluyen la estabilidad ambiental, biocompatibilidad, esterilidad, bioestabilidad, disminución de la frecuencia de dosificación, posible de eliminar, así como un bajo costo y facilidad de producción. Sus principales ventajas son un incremento en la eficacia de la terapia, su eficiencia, la disminución de las dosis así como de efectos secundarios (sistémicos, principalmente), liberación en el sitio de acción, posibilidad de tener terapias de duración de semanas a meses y manutención de los niveles plasmáticos deseables y de administración prolongada de fármacos con tiempos de vida media cortos. Sin embargo, también existen factores que pueden presentar desventajas para los sistemas implantables, tales como: toxicidad de sus componentes, rechazo

fisiológico, dolor, dificultad para interrumpir la administración del fármaco e incluso, en algunos casos, la necesidad de requerir una microcirugía para poder administrarlos (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

Estas formas farmacéuticas son utilizadas para el tratamiento de diferentes afecciones, entre ellas diabetes, cáncer, glaucoma, control de natalidad e incluso adicción a narcóticos. Sin embargo, actualmente en el mercado existen sistemas de tipo implante que pueden formarse *in-situ* ya que han sido administrados en el área de interés por vía subcutánea (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

3.3.2 Implantes de formación *in-situ*

Son formas farmacéuticas semi-sólidas de administración subcutánea. Se utilizan cuando es requerida una liberación controlada y continua del fármaco de interés y presentan ventajas de aplicación sencilla y disminución del dolor causada por la inyección, pues son administrados estando en fase líquida.

Una vez que han ingresado al organismo en la fase anteriormente mencionada, por medio de diversos estímulos, el polímero es capaz de sufrir una transición a gel, formando el implante en el área de interés. Dichos estímulos, pueden ser fisiológicos, cambios físicos o reacciones químicas (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

En el caso de los estímulos de tipo fisiológico, se incluyen cambios de temperatura y pH, que a continuación se describen:

- Sistemas regulados por temperatura

Este tipo de implantes de formación *in-situ* tienen un rango de temperatura crítica para la transición sol-gel del polímero, que se da entre la temperatura ambiental y la fisiológica. Existen tres tipos de sistemas regulados por la temperatura, los cuales son: positivamente termosensibles, negativamente termosensibles y termorreversibles (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Los implantes negativamente termosensibles, están elaborados con polímeros que poseen una temperatura inferior crítica de solución, *low critical solution temperature* (LCST), que usualmente es menor a la corporal, de modo que al estar bajo temperatura ambiente, el polímero se encuentra disuelto, pero cuando ésta se sobrepasa, precipita debido al cambio de sus características hidrofílicas a hidrofóbicas. Generalmente para este tipo de sistemas, se utilizan poli-iso-propilacrilamida (PNIPAAm) y Pluronic®, que tienen la capacidad de formar geles termosensibles (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Mientras que, los geles positivamente termosensibles, tienen una temperatura superior crítica de solución, UCST (*upper critical solution temperature*), por lo que cuando se enfría por debajo de la misma, las redes del polímero tienden a hincharse. Los más utilizados son: ácido poliacrílico, poliacrilamida y poli-butil-co-acrilamida metacrilato (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Por último, los geles termorreversibles, sufren transiciones solución-gel que no son permanentes, es decir, mientras que se encuentren a temperatura ambiente, estarán en fase líquida, sin embargo una vez administrados y a temperatura corporal, presentan la gelificación. De igual modo, los polímeros que se utilizan para este tipo de sistemas son Pluronic®, Tetronics® y poloxámeros (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Sistemas regulados por pH

Los polímeros utilizados para estos implantes, incluyen grupos ácidos o básicos capaces de aceptar o liberar protones en respuesta a los cambios de pH que se den en el ambiente. En el caso de hidrogeles, estos tienden a hincharse en cuanto el pH aumenta, pero solo si su polímero posee grupos aniónicos; sin embargo, disminuye en caso de que prevalezcan grupos de tipo catiónico. Se utilizan derivados de ácido poliacrílico, tales como carbómeros o Carbopol®, así como soluciones que contengan polivinilacetato, dietilaminoacetato de baja viscosidad, mezclas de ácido poliacrílico con HPMC y mezclas de los polímeros mencionados con ácido metacrílico y PEG (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Los cambios físicos como el hinchamiento e intercambio de disolventes, son utilizados para regular la transición solución-gel de estas formas farmacéuticas.

- Sistemas regulados por hinchamiento de polímero

En esta clase de sistemas, la regulación se da cuando el material absorbe agua del medio que lo rodea y se expande, ocupando mayor espacio. Por excelencia, se utiliza el 18-19 glicerol mono-oleato miverol, que es un lípido de tipo polar que es capaz de hincharse en medio acuoso, para formar estructuras de cristales líquidos. Posee características bioadhesivas y puede ser degradado a través de algunas enzimas (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Sistemas regulados por intercambio de disolventes

El solvente de la formulación de estos implantes, difunde en el medio mientras que el polímero, debido a que es insoluble en medio acuoso, solidifica, generando una matriz de tipo polimérica. Esto se logra una vez que ha sido administrado en la zona deseada. El polímero mayormente utilizado se llama N-metilpirrolidona (NMP) (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

En el presente trabajo, el gel de formación *in-situ* elaborado, se basa en el mecanismo anteriormente descrito, mientras que el polímero utilizado es Kollicoat® MAE 30 DP, que tiene solubilidad en etanol, pero es insoluble en agua. Dicho polímero es copolímero del ácido metacrílico.

Tabla 5. Polímeros principalmente utilizados en la formulación de implantes de formación *in-situ*

Polímero	Estímulo
Pectinas	Iones Ca^{2+} (Dumitriu, Vidal, Chornet, 1996)
Xiloglucano	Temperatura (Kawasaki, Ohkura, Miyazaki, 1999)
Goma gellan	Temperatura y iones (Crescenzi, Dentini, Coviello, 1990)
Ácido algínico	Iones (Séchoy, Tissie, Sébastian, 2000)
Goma Xantana	pH (BASF, 2010)
Quitosano	pH y temperatura (Chenite, Chaput, Wang, 2000)
Ácido metacrílico	pH, intercambio entre disolventes (BASF, 2010)
Polímeros sintéticos	Varios (Hatefi, Amsden, 2002)
Carbómeros	pH, intercambio entre disolventes (Ismail, Napaporn, Hughes, 2000)
Poloxámeros	Temperatura (Séchoy, Tissie, Sébastian, 2000)

Finalmente, existen geles de formación *in-situ* que se producen a partir de estímulos químicos, enzimáticos, entrecruzamiento iónico y fotopolimerización.

- Regulación de sistemas de formación *in-situ* por ambiente iónico

Polímeros como k-carragenina, i-carragenina, goma gellan y pectinas experimentan cambio o transición de fase en presencia de ciertos iones como K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Regulación de sistemas de formación *in-situ* por acción enzimática

Son sistemas que poseen una liberación de tipo pulsátil, un ejemplo de esto, es el implante de insulina, que posee un polímero de tipo catiónico que además es sensible a pH, que induce un hinchamiento cuando hay un aumento de glucosa en plasma (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Regulación de sistemas de formación *in-situ* por fotopolimerización

Para este tipo de implantes, son necesarios un macrómero reactivo y un indicador. Una vez elaborada la formulación, es administrada en el tejido, para posteriormente aplicar un campo de radiación electromagnética para lograr la formación del gel. Los macrómeros pueden ser acrilatos pues presentan una fotopolimerización rápida en comparación a otros grupos. Las longitudes de onda empleadas, generalmente son de tipo de onda larga y visible, puesto que longitudes de onda más cortas y no

visibles, tienen menor penetración y pueden ser dañinas. El indicador adecuado para las ondas de tipo larga es conocido como canforquinona y etil eosina. Algunas ventajas de este tipo de sistemas, es que pueden formularse a modo de ser degradados por medio de eventos químicos y/o enzimáticos, además de que pueden diseñarse para liberaciones de tipo *in-vivo*. A su vez, estos implantes tienen la capacidad de adaptarse fácilmente a formas complejas del medio donde se administran (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

3.3.3 Presentaciones comerciales

En el mercado, existen principalmente liberadores de progestágenos (sustancias que presentan una acción similar a la hormona progesterona que favorece el curso de la gestación en condiciones normales), conocidos como CRESTAR® y SINCROMATE®, implantes combinados con soluciones inyectables que incluyen compuestos como Norgestomet y Valerato de estradiol. Otros implantes de progesterona y estradiol que se aplican por vía subcutánea son el SYNOVEX B®, utilizados principalmente para la engorda del ganado (PISA, Agropecuaria, 2016).

Implantes que contienen progestágenos y un liberador de silicón con progesterona intravaginal, que tienen como objetivo la sincronización del estro o inducción del celo en las vacas, similares al producto conocido como CIDR® que libera progesterona de manera prolongada a través de un pequeño resorte de silicón impregnado de ésta, que es de aplicación vaginal y su función principal es la de sincronización de estros (Cutaia, Tríbulo, Taurus, 2015).

3.4 Fabricación de un gel para la obtención de un implante de formación *in-situ* de progesterona por el método de dispersión sólida

En un trabajo previamente desarrollado por nuestro equipo de investigación, se evaluaron cada una de las composiciones de gel mostradas en la **Tabla 6**, obteniendo como resultado que la que contiene Progesterona + Kollicoat® MAE 30 DP + PEG 6000 presenta un mejor desempeño para la obtención de un implante de formación *in-situ* de progesterona, pues al adicionar el método de dispersión sólida (con PEG 6000), se evita que el fármaco se adhiera a las paredes del recipiente que contiene el gel con dicha formulación. Por esta razón, en la **Tabla 7**, puede observarse que la formulación utilizada para producir los geles respectivos a este trabajo, corresponden a dicha composición.

Tabla 6. Composición de diferentes geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona.

Gel	Componentes de dispersión sólida	Componentes en mezcla EtOH: H ₂ O (v/v)
Patente	Ninguno	Progesterona, Kollicoat® MAE 30 DP y PEG 6000
Progesterona + Kollicoat® MAE 30 DP	Kollicoat® MAE 30 DP y PEG 6000	Ninguno
Progesterona + PEG 6000	Progesterona y PEG 6000	Kollicoat® MAE 30 DP
Progesterona + Kollicoat® MAE 30 DP + PEG 6000	Progesterona, Kollicoat® MAE 30 DP y PEG 6000	Ninguno

Tabla 7. Formulación para la fabricación de un gel para la obtención de un implante de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida

Componente	Información	Composición
Progesterona	NA	10%
PEG 6000	FlukaChemika, Suiza	20%
Kollicoat® MAE 30 DP	Basf, Alemania	3%
EtOH: H ₂ O 3:1 (v/v)	Analitika, México	Cbp

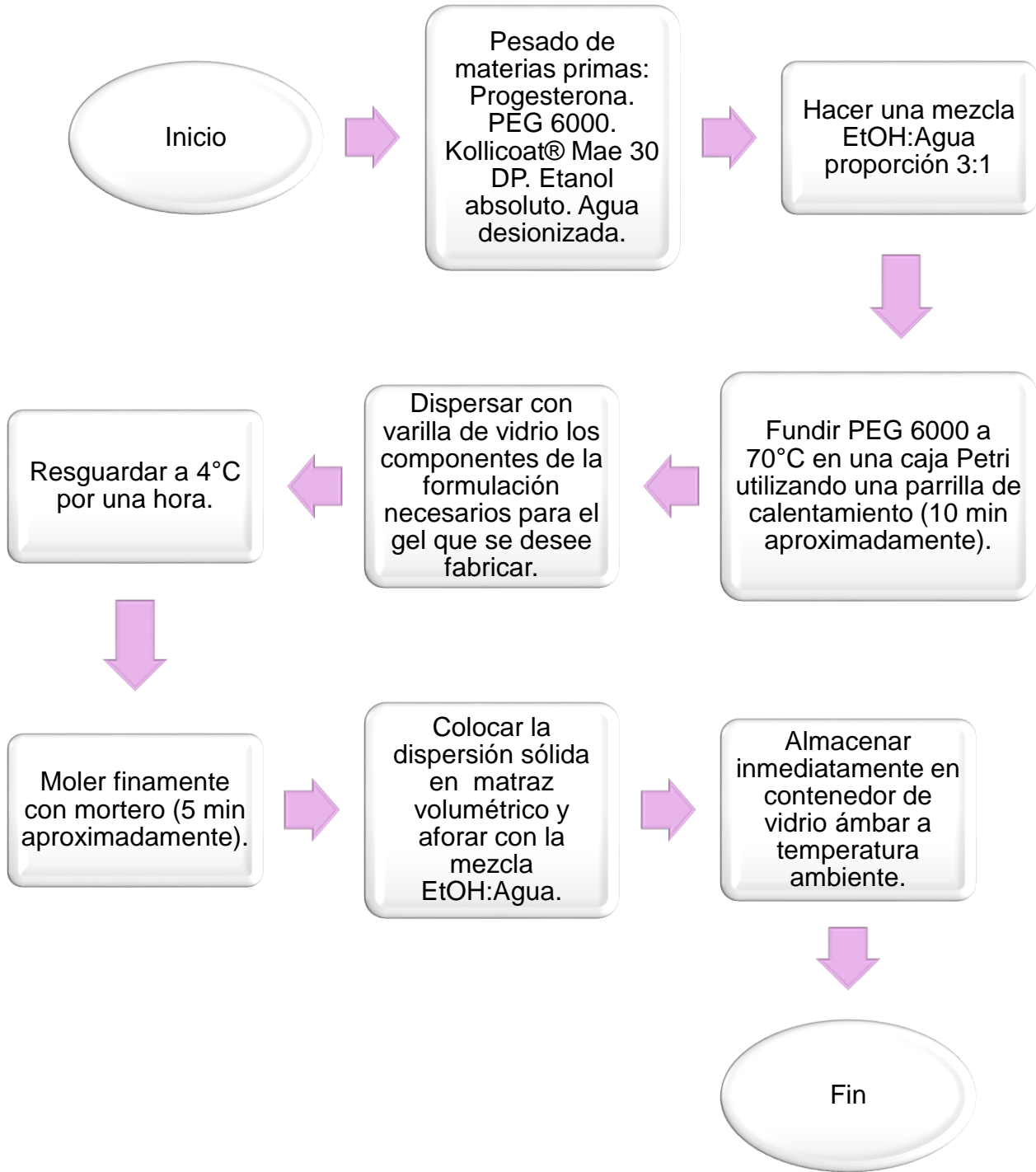


Figura 6. Proceso de fabricación de un gel para la obtención de un implante de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida

3.5 Reproducción y caracterización de geles para la obtención de implantes de formación *in-situ* de progesterona por el método de dispersión sólida

3.5.1 Pruebas de calidad

3.5.1.1 Inyectabilidad

Este, es un parámetro clave de desempeño para cualquier forma farmacéutica que sea destinada a la administración parenteral. La inyectabilidad, se refiere a la facilidad que posee el inyectable terapéutico para pasar a través de una aguja durante su aplicación, pues en caso de que no sea adecuada, es posible que se presenten problemas como: dolor en el paciente o formulaciones disfuncionales. Por tal motivo, esta prueba cobra tanta relevancia, principalmente al tratarse de formulaciones viscosas y que presentan comportamientos no newtonianos (Allahham, Mainwaring, Stemart, et al. 2004).

A su vez, la inyectabilidad es capaz de brindar información de la presión y fuerza requerida para realizar la aplicación, la constancia de flujo y taponamiento de la aguja que puede llegar a verse afectado por la geometría propia de la aguja, tales como el diámetro, longitud y forma, ya que entre más delgada sea, necesitará mayor fuerza durante su aplicación (Cilurzo, Selmin, Minghetti, et. al. 2011).

Para realizar pruebas de inyectabilidad, se utilizan texturómetros con programas de compresión, donde una vez ajustadas las condiciones de velocidad de empuje, la celda de carga ejercerá una fuerza que puede disiparse por sobrepasar la resistencia del émbolo de la jeringa, por lo que se debe considerar que al hacer una administración subcutánea o intramuscular, generará una resistencia extra (Rungseevijitprapa, Bodmeier, 2009).

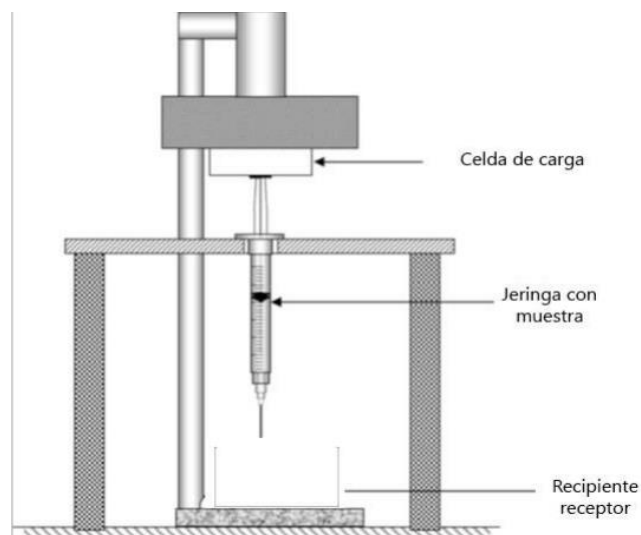


Ilustración 2. Sistema de medición de fuerza (Rungseevijitprapa, Bodmeier, 2009)

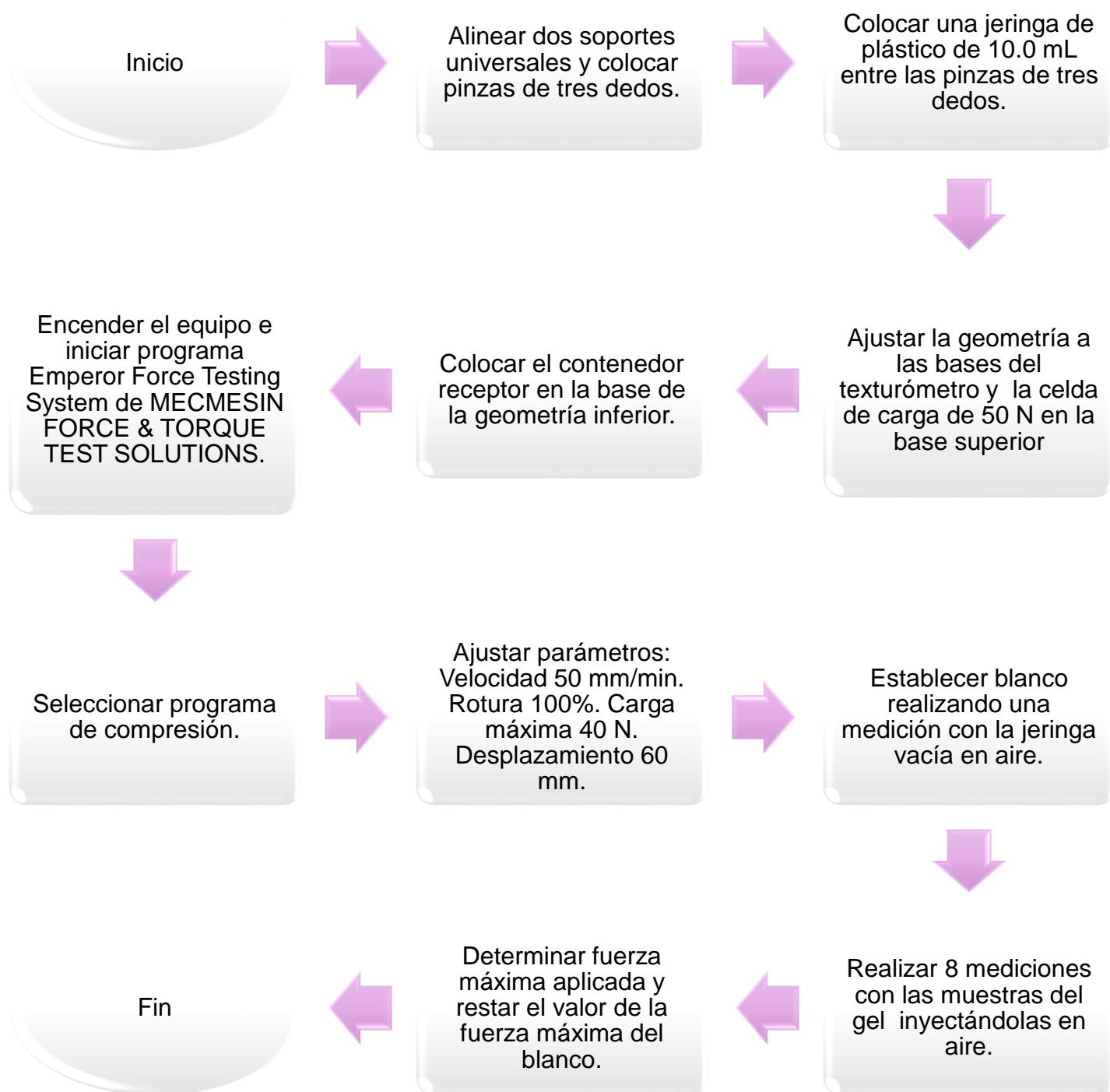


Figura 7. *Inyectabilidad de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida*

3.5.1.2 Determinación de pH

El pH de la subdermis se encuentra en un valor cercano a 7.4 (Dickson, Sharp, 1985), por lo que el pH del gel debe encontrarse en valores por debajo para que una vez entre en contacto fisiológico se presente la formación del implante. Los fluidos corporales tienen una amplia capacidad amortiguadora y es posible utilizar geles con pH menor a 5.2, siempre y cuando no haya una infusión constante de la forma farmacéutica. Sin embargo es importante mencionar que mientras más ácido sea, puede generar dolor innecesario al animal (Tiburcio, 2018).

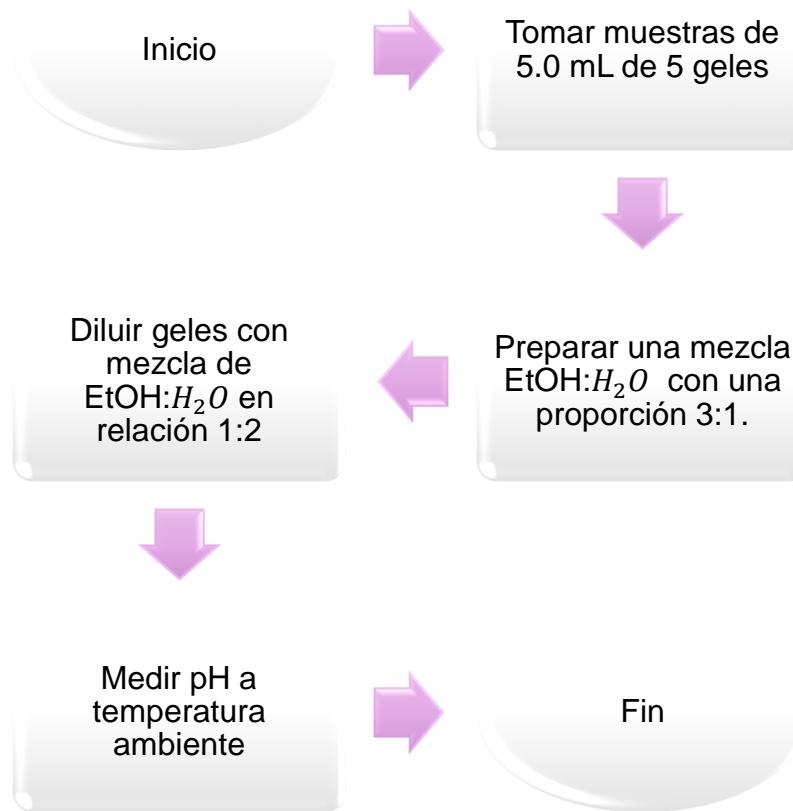


Figura 8. Determinación del pH de geles para la obtención de implantes de formación *in-situ* de progesterona por el método de dispersión sólida

3.5.1.3 Formación del implante

Tiene como objetivo, demostrar que a partir de la formulación descrita anteriormente, es posible la formación del implante en el sitio de aplicación. Por lo que se espera que una vez que la formulación entre en contacto con el medio de interés, se inicie un intercambio entre disolventes, generando la precipitación del polímero cuando entre en contacto con el agua, produciendo el implante de interés (Tiburcio, 2018).

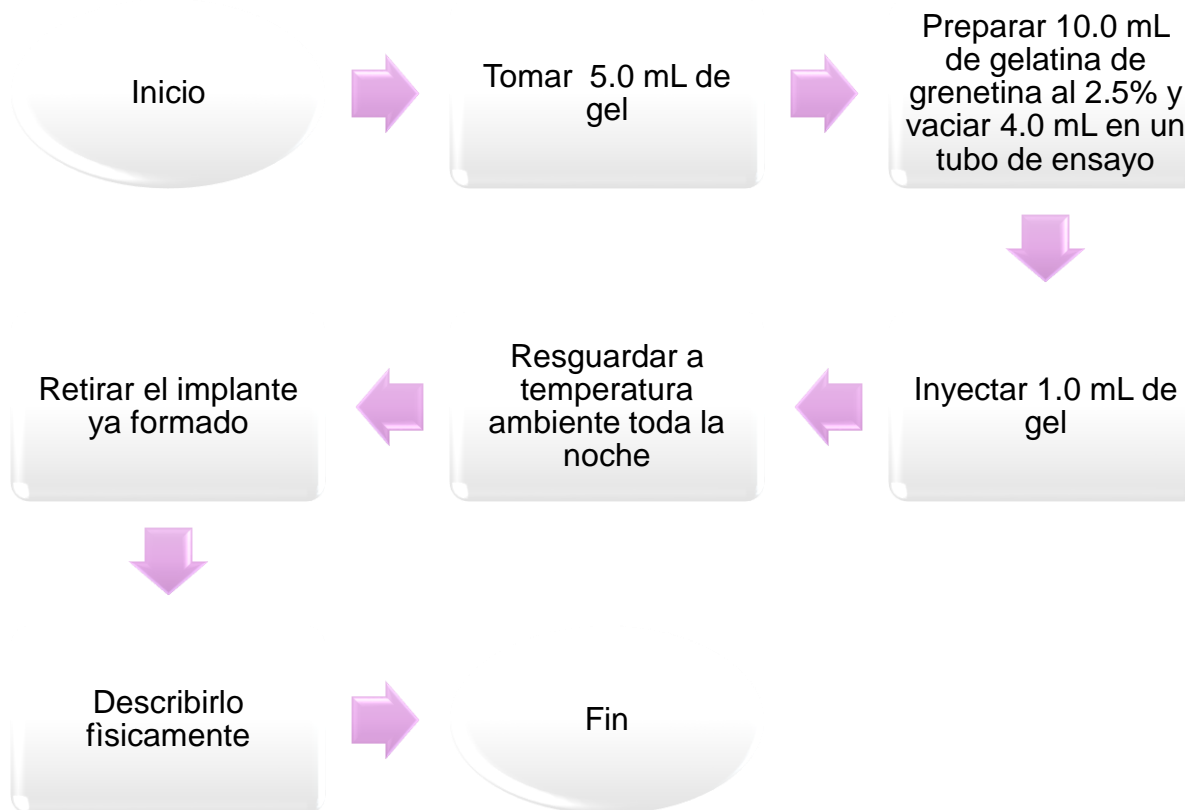


Figura 9. Formación de implantes de formación *in-situ* de progesterona con el método de dispersión sólida

3.5.1.4 Velocidad de intercambio de disolventes

En esta prueba, lo que se busca es demostrar que existe un intercambio entre disolventes, donde el etanol presente en la formulación que permite que el polímero se encuentre disuelto, se intercambie con el agua del medio, donde ésta difunda y entre en contacto con el polímero, induciendo la formación del implante (Phaechamud, Jantadeee, Mahadlek, et al, 2017).

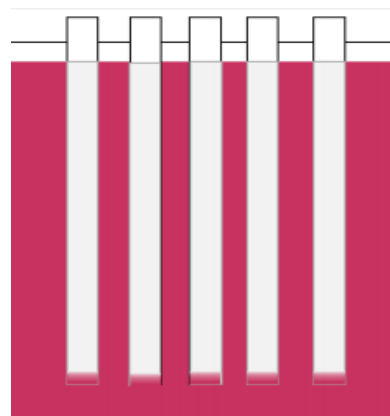


Ilustración 3. Experimento de intercambio entre disolventes

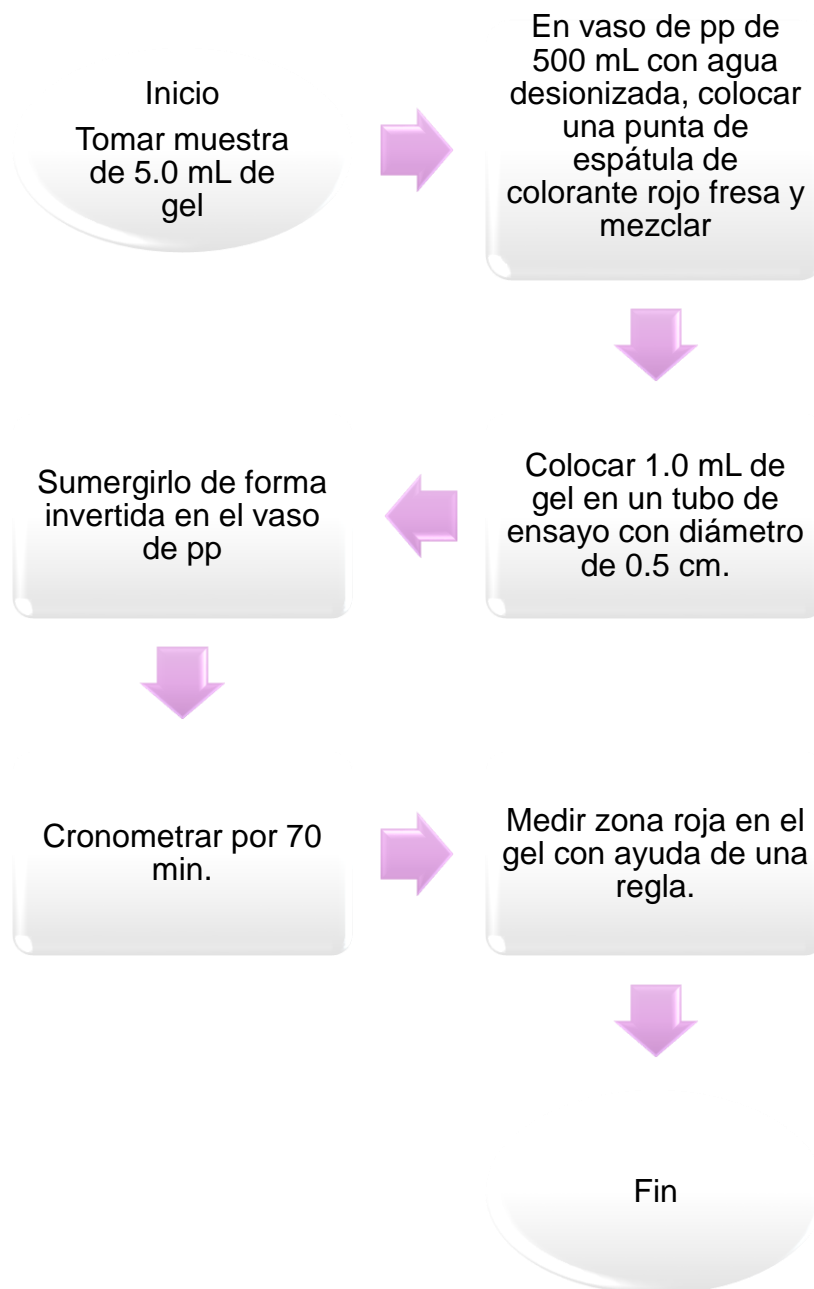


Figura 10. Determinación de velocidad de intercambio entre disolventes de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida

3.5.1.5 Reología

Tiene como propósito determinar la viscosidad así como el comportamiento viscolástico o de flujo que presenten los geles (fluidos), pues de ello depende en gran medida si dichas formulaciones son aptas para ser inyectadas o no al animal, dado que factores como estos, así como el tamaño de partícula, forma, concentración e interacciones con el medio dispersante pueden afectar la estabilidad de los compuestos (TA Instruments, 1964).

Existen dos pruebas que incluyen la reología oscilatoria con técnicas que se utilizan para caracterizar y cuantificar la presencia, rigidez e integridad de la estructura interna de un material, debido a la floculación y/o interacción de partículas dispersas en el medio. Las pruebas de reología oscilatoria se realizan usualmente con fuerzas por debajo de la fluencia de la muestra. Mientras que para aquellas pruebas que requieren un flujo de cizalla oscilatoria y cizalla simple, se utiliza una fuerza paralela baja que asegura que la estructura de la muestra se mantenga, para después, conforme avance la prueba, el esfuerzo que se aplica aumente, hasta que se manifieste una disminución de elasticidad y rigidez provocada por la interrupción de la estructura y así definir la viscosidad y tipo de flujo de las muestras evaluadas (RheologySchool, 2013).

Fluidos estructurados

Materiales compuestos por más de una fase, tales como las suspensiones, emulsiones y espumas, cuyas propiedades de flujo dependen de las interacciones entre los constituyentes, generando comportamientos de fluidez complejos (TA Instruments, 1964).

Flujo plástico

La mayoría de los materiales no presentan flujo de tipo newtoniano una vez que sobrepasan el límite de fluencia, sino que presentan una viscosidad que disminuye o adelgaza cuando se ha alcanzado una meseta (TA Instruments, 1964).

Flujo pseudo-plástico

Se refiere a aquellos materiales que si bien no tienen un límite de fluencia, poseen un comportamiento no lineal. Tienen la capacidad de fluir inmediatamente al aplicarles tensión, sin embargo, al aumentar la velocidad de corte, presentan un comportamiento adelgazante. La mayoría de soluciones de polímeros presentan este comportamiento (TA Instruments, 1964).

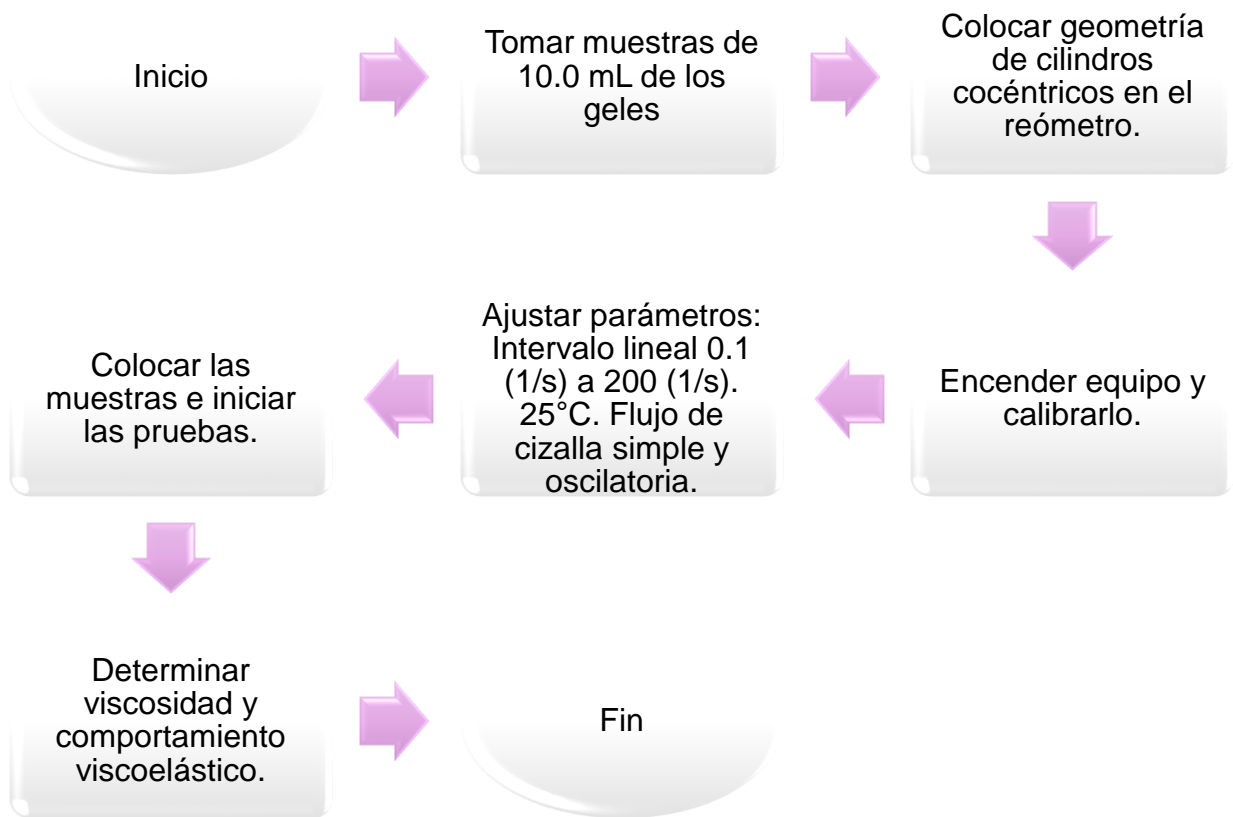


Figura 11. Determinación de la reología de geles para la obtención de implantes de formación *in-situ* de progesterona por el método de dispersión sólida

3.6 Métodos de cuantificación de fármacos en fluidos biológicos

Existen diferentes métodos de cuantificación que buscan la identificación de los compuestos de interés. Sin embargo, para poder hacerlo, es necesario seleccionar un sistema de detección que mida diferentes propiedades fisicoquímicas de la molécula. Para ello, se deben tomar en cuenta factores como el tipo de separación, y la naturaleza de la detección como absorbancia, conductividad, fluorescencia, relación masa/carga, etc (Rivera, 2019).

Cromatografía

Es una técnica analítica de separación, identificación y determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas; los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una inmóvil (fase estacionaria) y otra móvil, conocida como fase móvil (Rivera, 2019).

Implica la disolución de la muestra con la fase móvil, la cual puede ser gas, líquido o fluido supercrítico (híbrido entre líquido y gas). Se hace pasar a través de una fase estacionaria fija, en una columna o en una superficie sólida (Lugo, 2014).

Cromatografía de líquidos de alta resolución

Técnica analítica para separar y analizar los componentes a través de la transferencia de masa del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil. La fase móvil circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmiscible; al introducir una mezcla de sustancias, en la corriente de fase móvil, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. Esto supone que después del recorrido de la muestra por la columna, cada una de las sustancias introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, es decir, estarán separadas (Yagües, 2008).

Esta técnica es utilizada en diversas actividades, principalmente para analizar muestras de comida, fluidos biológicos, fármacos y agroquímicos (Rivera, 2018).

La cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica de separación más ampliamente utilizada, con unas ventas anuales de equipos de HPLC que ascienden a millones de dólares. Las razones de dicha popularidad son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y por su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos incluyen aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, hormonas, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies organometálicas y una cierta variedad de sustancias inorgánicas, que pueden provenir de una infinidad de muestras a tratar, como de fluidos biológicos (Yagües, 2008).

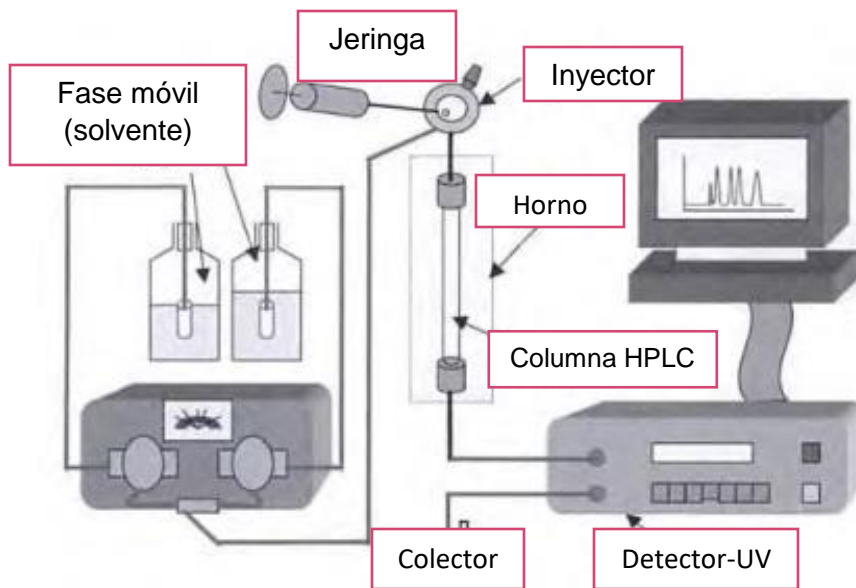


Ilustración 4. Diagrama de un cromatógrafo HPLC con detector UV (Yagües, 2008).

3.7 Validación de un método analítico

3.7.1 Definiciones

- Método analítico

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que deben cumplirse para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestrada. El método analítico se encarga de medir un componente específico en una muestra, y como todo proceso de medición, debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Validación de un método analítico

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Adecuabilidad del sistema

Se refiere a la verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permiten asegurar la confiabilidad de los resultados del método analítico (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Analito

Componente específico de interés de una muestra a medir en un análisis (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Muestra

Es la porción del material que ha de evaluarse (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Muestra analítica

Se refiere a la porción del material que ha de evaluarse, de acuerdo al método analítico previamente establecido (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Sustancia de referencia

Es la sustancia de uniformidad reconocida y destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas tanto físicas, como químicas y/o microbiológicas, donde sus propiedades son comparadas con el analito de interés (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Documentación y Especificaciones

La Documentación se conoce como el conjunto de información que sustenta una actividad realizada. Mientras que las especificaciones, se refieren a la descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, así como las tolerancias de variación de los parámetros de calidad (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Parámetros de desempeño

Parámetro específico a estudiar en un protocolo de validación (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Calibración

La Calibración es un conjunto de operaciones que determinan la relación que existe entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia, bajo condiciones específicas (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Especificidad

Capacidad del método analítico para obtener la respuesta generada únicamente por el analito de interés y no de otros componentes de la muestra (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Exactitud

Concordancia presentada entre el valor obtenido a través del método analítico y el valor dado por la referencia (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Estabilidad analítica de la muestra

Propiedad de la muestra para conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, aun después de almacenarse durante un tiempo determinado y bajo condiciones específicas (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Intervalo

Son las concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito, para las cuales se ha demostrado que el método analítico de interés es preciso, exacto y lineal (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Límite de cuantificación

Concentración mínima del analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Límite de detección

Concentración mínima del analito en una muestra, que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Linealidad

Habilidad para asegurar que los resultados obtenidos de manera directa o por el tratamiento matemático correspondiente, son proporcionales a la concentración del analito y dentro de un intervalo determinado (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Precisión

Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto o de una referencia (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Recobro

Cantidad del analito determinada en el placebo adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Repetibilidad

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

- Reproducibilidad

Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios (Guía Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 2010).

- Robustez

Capacidad del método analítico de mantener su desempeño al presentarse variaciones pequeñas pero deliberadas, en los parámetros normales de operación del método. Se refiere a la influencia de factores internos del método (Guía Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 2010).

- Tolerancia

Se refiere a la reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra, pero bajo condiciones diferentes de operación, las cuales pueden incluir: equipos y/o columnas. La tolerancia, hace referencia a los factores externos al método (Guía Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 2010).

3.7.2 Clasificación de métodos analíticos

De acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de Químicos Farmacéuticos Biólogos, los métodos analíticos pueden clasificarse bajo los criterios descritos a continuación:

- 1) En función de su estado regulatorio:
 - a) Métodos farmacopéicos: Que incluyen todos aquellos métodos que aparecen en cualquier farmacopea (FEUM, USP, SP, Europea, etc.).
 - b) Métodos no farmacopéicos: Aquellos métodos que no se encuentran compendiados en una farmacopea.

2) En función de su aplicación (NOM 059 SSA1 y NOM-073-SSA1):

- a) Métodos para producto a granel.
- b) Métodos para producto terminado.
- c) Métodos para materia prima.
- d) Métodos indicadores de estabilidad.

3) En función de la naturaleza de la respuesta analítica:

a) Métodos físico-químicos: La respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones -OH, consumo de un aComplejante, etc.).

b) Métodos biológicos: La respuesta es de carácter biológico (crecimiento de un microorganismo, protección, muerte, etc.).

4) En función de su propósito analítico:

- a) Métodos para cuantificar el analito (contenido o potencia).
- b) Métodos para establecer la presencia del analito a un límite.
- c) Métodos para identificar el analito

Es importante mencionar que cualquier método analítico puede estar constituido por técnicas de separación o extracción, así como por técnicas de medición que pueden incluir: espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, entre otros, lo que permite medir la respuesta del analito de interés en la muestra. Esta técnica es denominada como Sistema de Medición (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

5) En función de la naturaleza del sistema de medición:

a) Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica, permite medir una señal de ruido (cromatógrafo de líquidos, cromatógrafo de gases, espectrofotómetros, etc.)

b) Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido (buretas, medidor de halos, potenciómetros. etc.)

3.7.3 Parámetros de desempeño a evaluar para la validación de un método analítico

En relación a los parámetros de desempeño, para realizar la validación del método analítico, éstos deben determinarse de acuerdo al tipo de método que se planea evaluar (Guía Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 2010).

Para lo anterior, pueden utilizarse tablas y/o diagramas como guías para identificar la clasificación del método, y en consecuencia, los parámetros a evaluar, como puede observarse en la **Ilustración 5 y Tabla 8** respectivamente (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

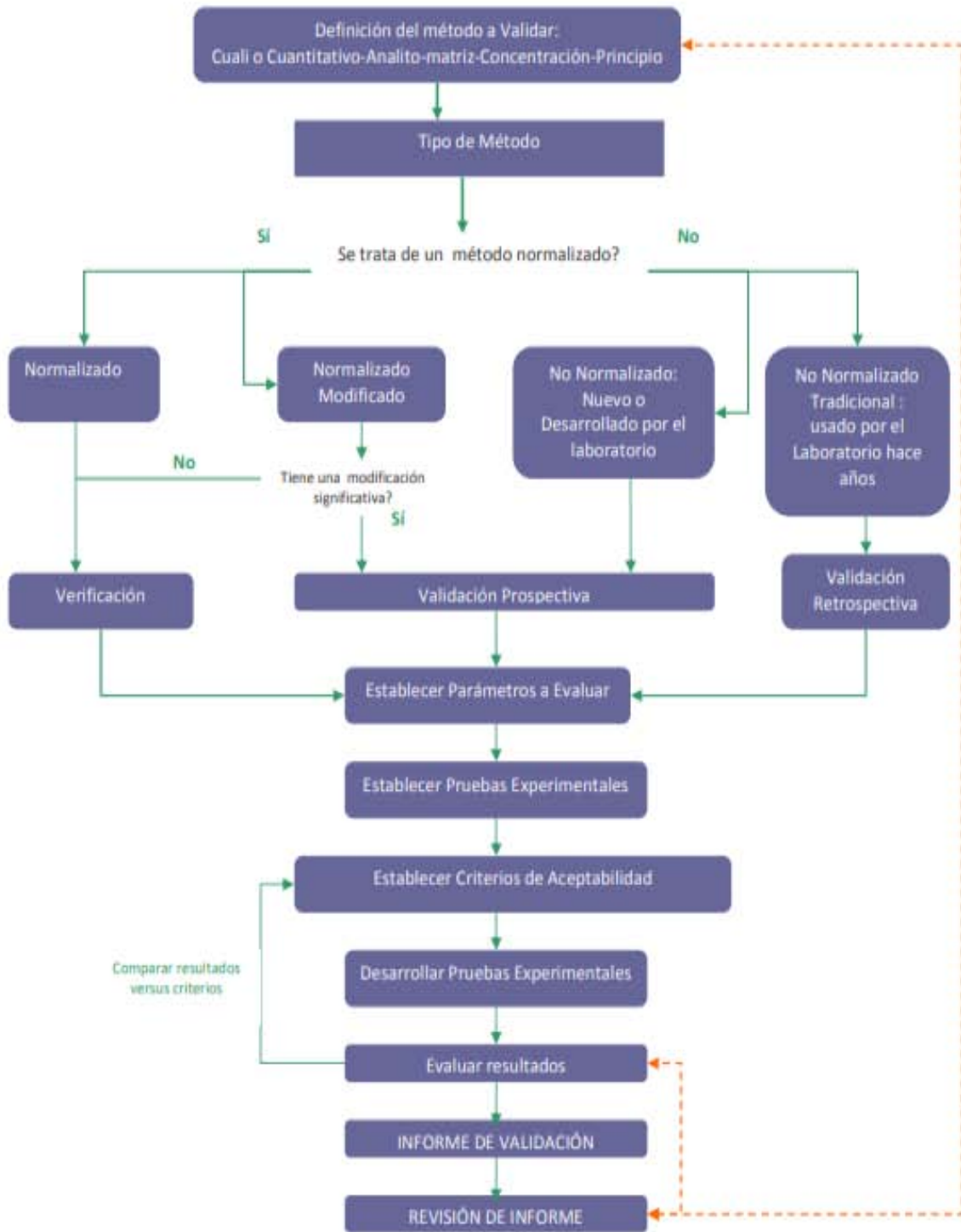


Ilustración 5. Diagrama de elección de Método Analítico (Guía Técnica 1 validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición, 2010).

Tabla 8. *Parámetros de desempeño a evaluar en función de la aplicación analítica del método (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)*

Parámetro de desempeño	Contenido/Potencia/Valoración	Contenido/Valoración	Límite	Identificación
Precisión/Adecuabilidad del sistema	Si	Si	Si*	*
Linealidad del sistema	Si	Si	No	No
Especificidad¹	<i>Si</i> ³	Si	Si	Si
Exactitud y repetibilidad	Si	Si	No	No
Linealidad del método	Si			No
Precisión del método²	Si	Si	No	No
Estabilidad analítica de la muestra²	*			No
Límite de detección	No	No	Si	No
Límite de cuantificación	No	Si	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método

- 1. La falta de especificidad de un método analítico, puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía de capa fina.
- 2. También es definido como un estudio de tolerancia.
- 3. Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

3.7.4 Pruebas de validación del método analítico

- Precisión del sistema.

La prueba se basa en el grado de concordancia entre los resultados individuales obtenidos con un mismo procedimiento a diferentes concentraciones.

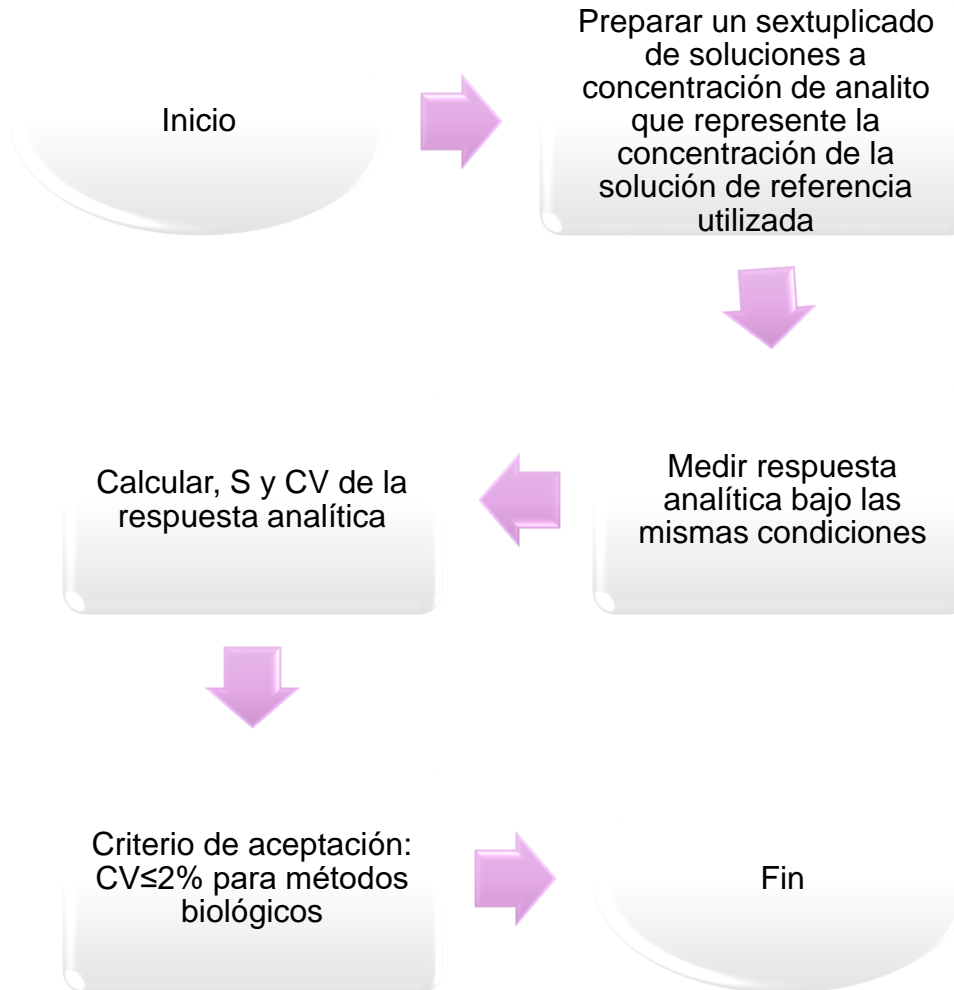


Figura 12. Diagrama de proceso para evaluar la Precisión del Sistema del Método Analítico (Guía de Validación de Métodos Analíticos, 2002)

- Adecuabilidad del Sistema (Métodos Cromatográficos)

Esta prueba se recomienda para todos los métodos analíticos, ya que permite verificar que el sistema de medición funciona de manera apropiada e independientemente de las condiciones ambientales. Es conveniente que antes de llevar a cabo la validación del método analítico, se establezcan los criterios apropiados para la operación del sistema de medición, para ser evaluados en la validación (Guía de validación de métodos analíticos, 2002).

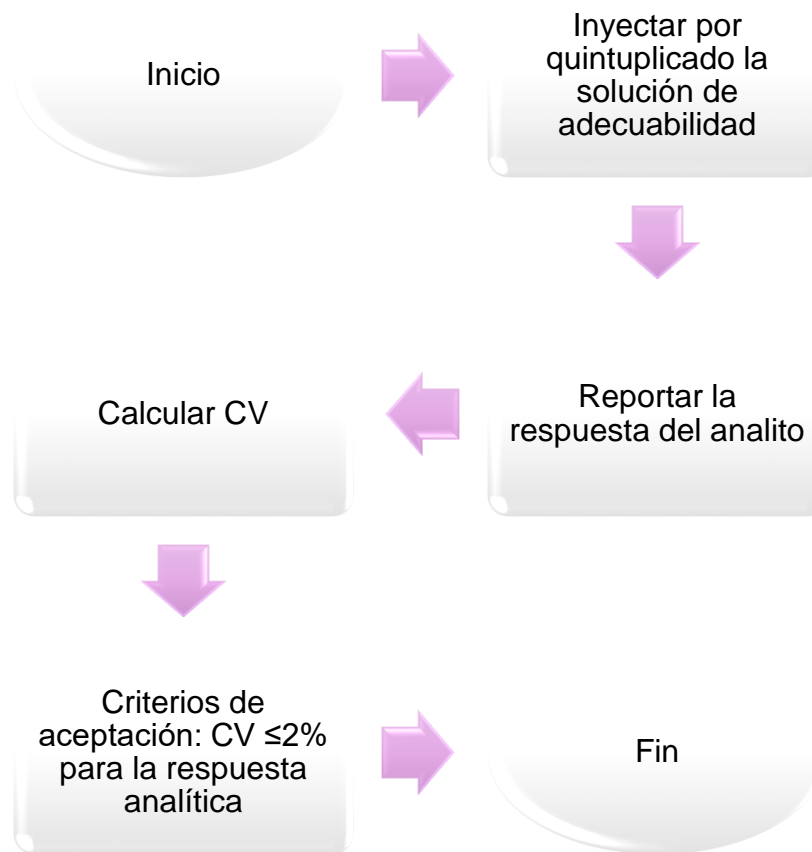


Figura 13. Diagrama de proceso para evaluar la Adecuabilidad del Sistema del Método Analítico (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)

- Linealidad del Sistema.

Lo que busca esta prueba es determinar si existe una relación entre la concentración del analito y la respuesta producida por el mismo.

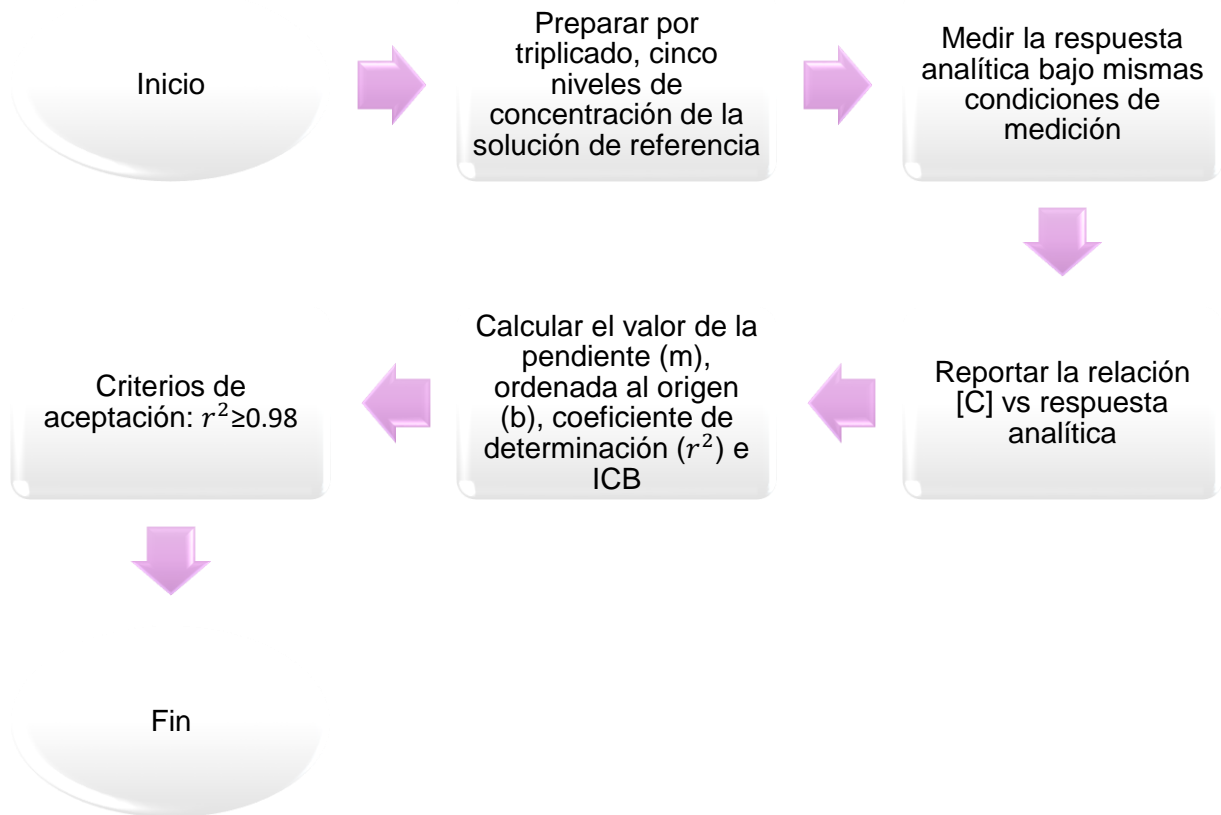


Figura 14. Diagrama de proceso para evaluar la Linealidad del Sistema del Método Analítico. (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)

- Exactitud y Repetibilidad del Método.

La prueba busca mostrar la concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y los valores de referencia así como mostrar la variación obtenida entre las determinaciones realizadas de forma independiente y bajo diferentes condiciones de análisis.

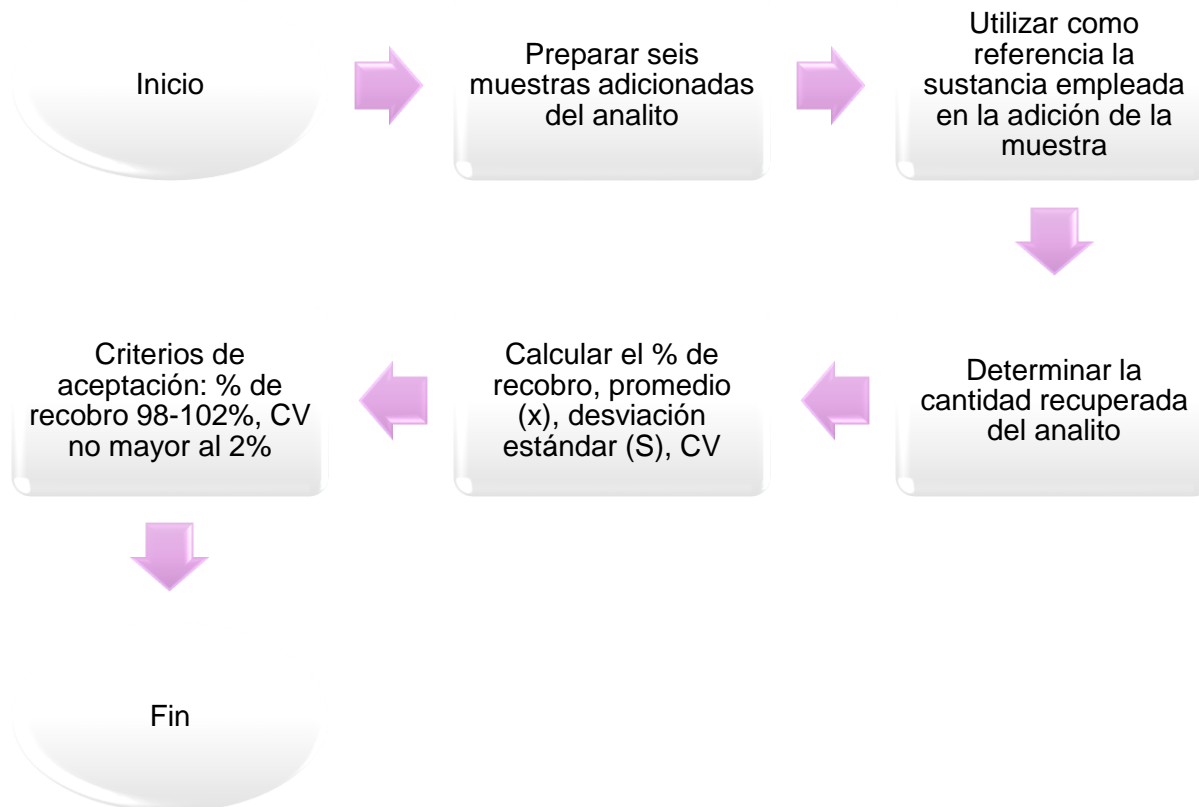


Figura 15. Diagrama de proceso para evaluar la Exactitud y Repetibilidad del Método Analítico. (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)

- Linealidad del método.

Busca determinar la relación entre la concentración adicionada del analito de interés y la concentración recuperada al finalizar el análisis.

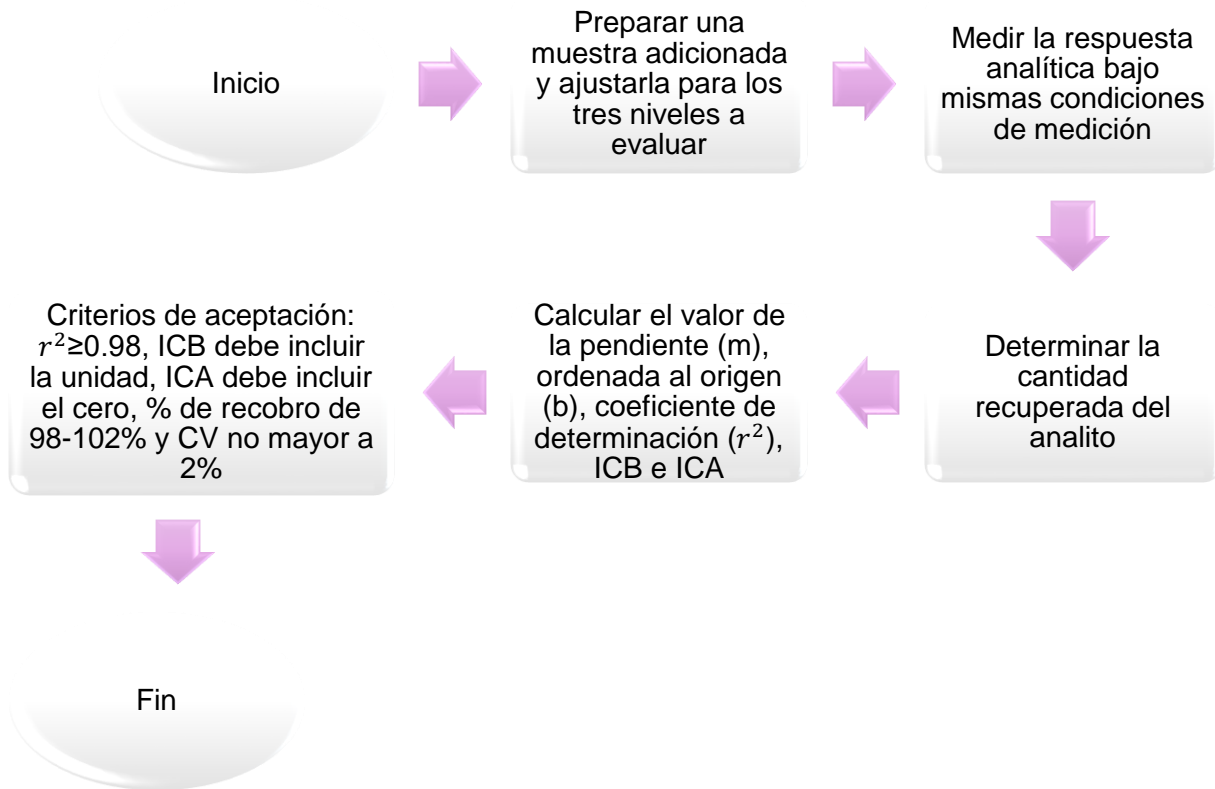


Figura 16. Diagrama de proceso para evaluar la Linealidad del Sistema Analítico. (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)

- Precisión del Método.

La prueba se basa en el grado de concordancia entre los resultados individuales obtenidos con un mismo procedimiento a diferentes condiciones de análisis.

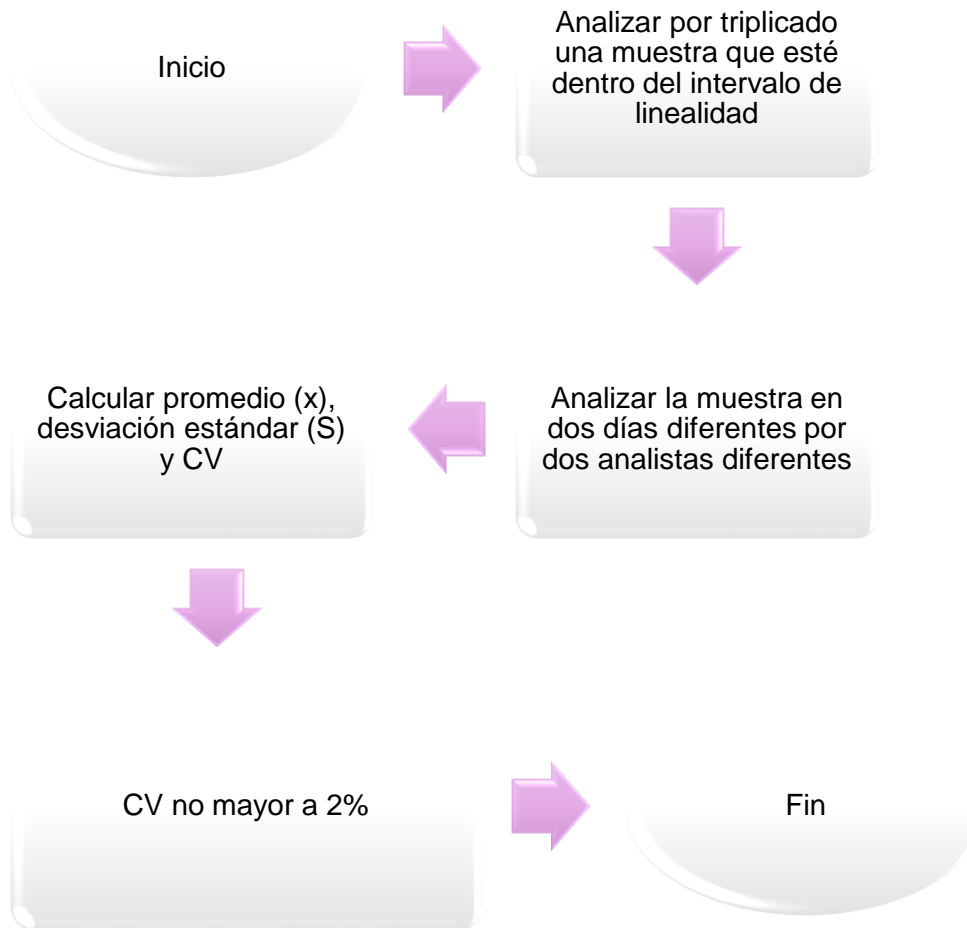


Figura 17. Diagrama de proceso para evaluar la Precisión del Método Analítico. (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)

- Estabilidad Analítica de la muestra.

Se busca conocer las condiciones donde las muestras obtenidas, conservan su integridad fisicoquímica para su cuantificación.

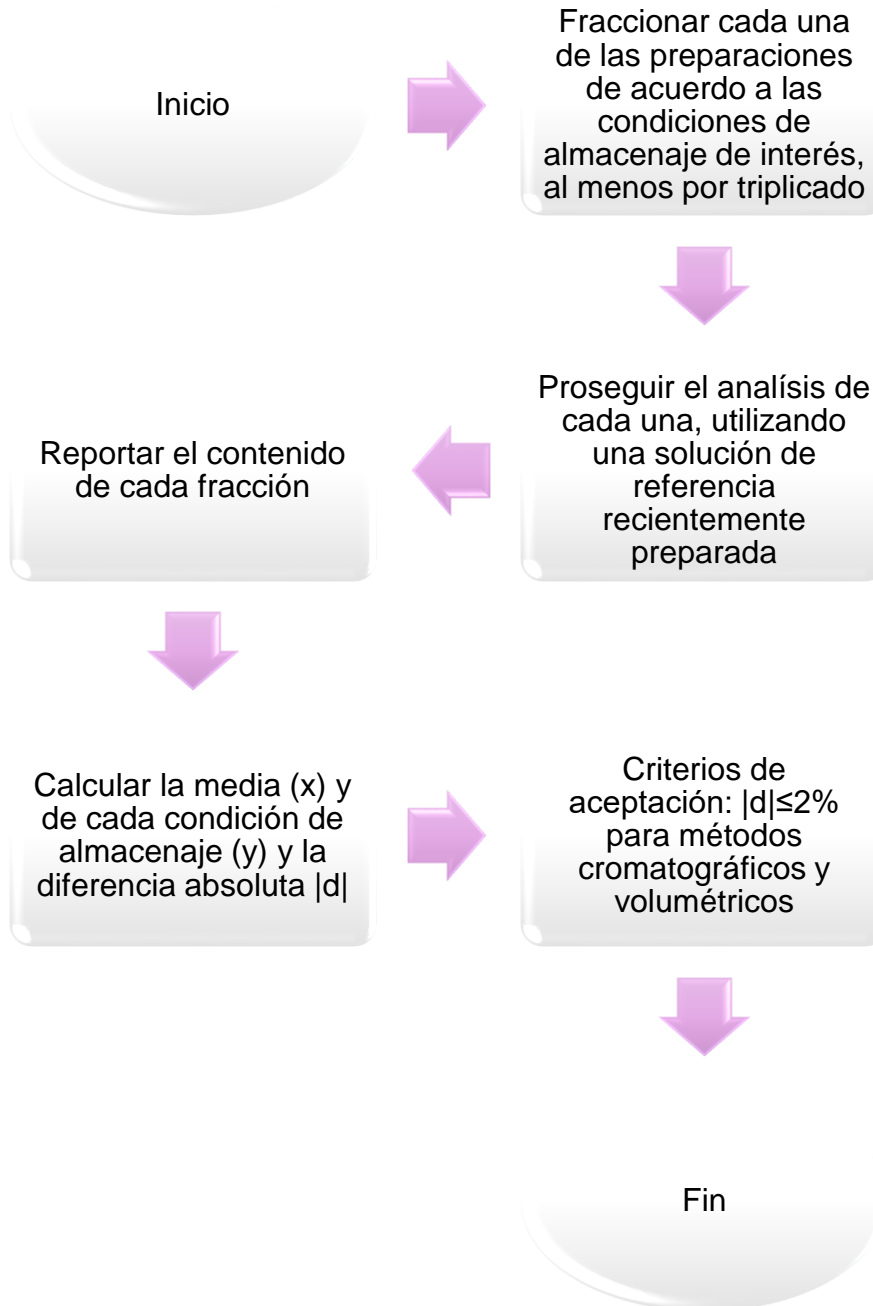


Figura 18. Diagrama de proceso para evaluar la Estabilidad Analítica de la muestra. (Guía de validación de métodos analíticos, 2002)

4. Objetivos

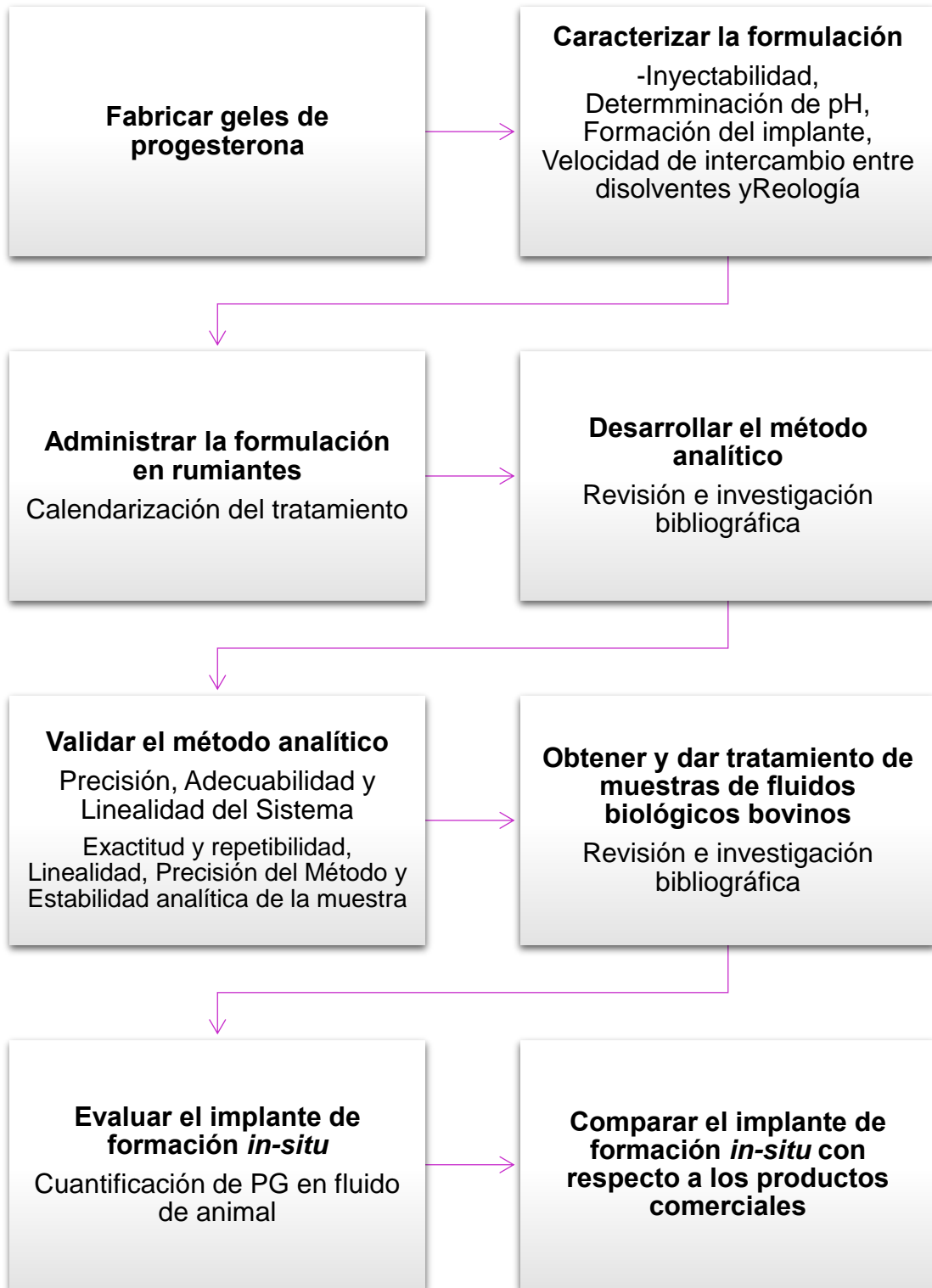
4.1 Objetivo General

- Desarrollar y validar un método analítico que permita la cuantificación de progesterona (PG) en fluidos biológicos bovinos, para la caracterización de un implante de PG de formación *in-situ*.

4.2 Objetivos particulares

- Fabricar geles de PG para la obtención de implantes de formación *in-situ* utilizando la técnica de dispersión sólida, que mejora las características de la formulación descrita en la patente MX/a/2015/007665.
- Caracterizar las propiedades físicas del gel, tales como formación del implante, reología, inyectabilidad, velocidad de intercambio entre disolventes y pH.
- Administrar los geles de PG fabricados a los rumiantes.
- Desarrollar un método analítico que permita realizar la cuantificación de progesterona en fluidos biológicos bovinos, para la caracterización del implante de formación *in-situ* de interés.
- Realizar la validación del método analítico desarrollado, de acuerdo a lo establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.
- Obtener y dar tratamiento correspondiente de muestras de fluidos biológicos de bovino (sangre y leche) para realizar la cuantificación de progesterona comercial una vez desarrollado y validado el método analítico de cuantificación.
- Evaluar el comportamiento del implante de formación *in-situ* en condiciones *in-vivo* frente a los productos que ofrece el mercado.
- Comparar las concentraciones de progesterona obtenida de los productos comerciales, respecto a la cantidad de progesterona liberada por los implantes de formación *in-situ* de interés.

5. Metodología general.



5.1 Fabricación del gel de progesterona

Se realizaron los pasos descritos en la **Figura 6** utilizando una caja Petri de vidrio para colocar las cantidades correspondientes de PEG 6000, dejándolo fundir en una parrilla de calentamiento y dispersándolo con una varilla en L, se procedió a agregar la PG y Kollicoat 30 DP hasta homogenizar. Enseguida se dejó enfriar a 4°C por dos horas, pues nuestro equipo de investigación en el trabajo previo a este, mostró una mejora en la molienda a dicha temperatura. Una vez lo suficientemente duro, se muele en un mortero hasta generar polvo fino. Éste, se coloca en matraz aforado de volumen correspondiente, para aforar con la solución EtOH:H₂O. Inmediatamente se coloca en frasco ámbar y se almacena a temperatura ambiente.



Imagen 3. Fabricación del gel de Progesterona

5.2 Caracterización de la formulación (pruebas de calidad)

Para la caracterización de la formulación se siguieron los pasos planteados en las figuras que corresponden a cada prueba de calidad que se le realiza a este tipo de formas farmacéuticas.

- Inyectabilidad

Para esta prueba, se siguió lo descrito en la **Figura 7**. Las jeringas utilizadas fueron de 10mL y los calibres de aguja utilizados fueron: 16,18,20,21,22,23,25,26,27 y 30 G. Una vez montado y configurado el equipo se procedió a realizar las pruebas en aire y en pechuga de pollo con piel, para simular condiciones para realizar la inyectabilidad a nivel intramuscular y subcutáneo.

Se utilizó un texturómetro *MultiTestTM* 1-ícon una celda de carga de 50 N y un programa de compresión del sistema EmperorForceTestingSystem de MECMESIN FORCE & TORQUE TEST SOLUTIONS. La velocidad se ajustó a 50 mm/min, la rotura al 100%, carga máxima de 40 N y desplazamiento de 60 mm. La prueba se realizó a temperatura ambiente. Se determinó la fuerza necesaria para inyectar ocho muestras del gel de formación *in-situ* con dispersión sólida en aire y pechuga de pollo. Como blancos, se determinó la fuerza necesaria para desplazar el émbolo de la jeringa vacía, así como con la jeringa cargada con el gel de interés, después de hacer la calibración del instrumento.

- Determinación del pH

Se prepararon cinco geles de formación *in-situ* de acuerdo a la **Figura 8** y se diluyeron en una relación de 1:2 con la mezcla etanol:agua. Se midió el pH a temperatura ambiente con un potenciómetro Thermo ELECTRON CORPORATION ORION 3 STAR pH Benchtop.

- Formación del implante

Se inyectó 1 mL del gel con dispersión sólida a evaluar, en una gelatina de grenetina al 2.5% contenida en un tubo de ensayo y se observó la formación del gel. Pasadas 24 h se retiró el implante ya formado, colocándolo en un fondo blanco, para describirlo físicamente. **Figura 9**.

- Velocidad de intercambio entre disolventes

En la **Figura 10** se describe que debe colocarse 1mL del gel de interés en un tubo de ensayo con diámetro de 0.5 cm e invertirlo en un vaso de precipitados con agua y colorante rojo fresa (Droguería Cosmopolitan, México), para observar la formación del gel, y por lo tanto, la difusión del etanol en el medio y del agua en el gel, es decir, el intercambio de disolventes. El experimento fue cronometrado por 70 min, para que una vez finalizado, se midió la zona roja en el gel con una regla métrica.

- Reología

De acuerdo a la **Figura 11** se midieron las propiedades reológicas del gel de interés y de cada uno de los excipientes de la formulación, utilizando una mezcla de etanol:agua como vehículo que ya ha sido descrita anteriormente. Las mediciones se realizaron en un reómetro de esfuerzos controlados Hybrid Discovery HR-3 usando geometría de cilindros concéntricos. El intervalo lineal utilizado para las

lecturas de viscosidad fue de 0.1 (1/s) a 200 (1/s) a 25°C con los flujos de cizalla simple y oscilatoria. Los cuales están en el intervalo de observación de las pruebas mecánicas para una administración con jeringa de acuerdo a las condiciones previamente determinadas por nuestro grupo de trabajo.

5.3 Administración de la formulación en rumiantes

Una vez realizadas las pruebas de calidad, los geles con dispersión sólida se prepararon para su posterior aplicación por un equipo de Médicos Veterinarios. El gel de interés se comparó con otros productos presentes en el mercado. A continuación se presenta la calendarización de los tratamientos, así como la toma de muestra de los animales.

Tabla 9. Productos a evaluar

Lote	Nombre/Descripción
PN	Progesterona reactivo
B	CIDR
N	Implante de interés
N/2	Implante de interés con polímero reducido 50%

Tabla 10. Calendarización de los tratamientos y toma de muestras en los animales

Lote	Aplicación	Fecha	Sangrado	Muestras													
PN	IM	03-Jul	3-5-Jul	0	1h	2h	4h	10h	24h								
B				1h	2h	3h	4h	5h	6h	10h							
N	SC	22-Jul	22-31-Jul	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10...17 días			
N/2	SC	22-Jul		0	0.1h	0.2h	1h	2h	3h	4h	5h	6h	8h	9h			

5.4 Desarrollo del método analítico

Para el desarrollo del método analítico, se realizó una investigación y revisión bibliográfica en libros y artículos sobre cuantificación de progesterona por HPLC y su uso en bovinos.

5.4.1 Condiciones cromatográficas

Para la cuantificación de la progesterona, se trabajó con un detector UV-VIS, siguiendo parte de la metodología descrita en Maliwal, 2009, estableciendo las siguientes condiciones óptimas en el equipo HPLC, donde se varió la longitud de onda de emisión de 254 nm a 242 nm respectivamente.

Tabla 11. Condiciones de trabajo cromatográficas

Detector	UV-VIS
Longitud de onda de emisión	242nm
Columna	Columna HPLC Agilent Eclipse XDB-C8 (4.6 mm ID x 250 mm, 5µm)
Fase móvil	Metanol:Agua (80:20)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Tiempo de corrida	10 min
Tiempo de retención de la progesterona	6 min
Temperatura	Ambiente (23°C)

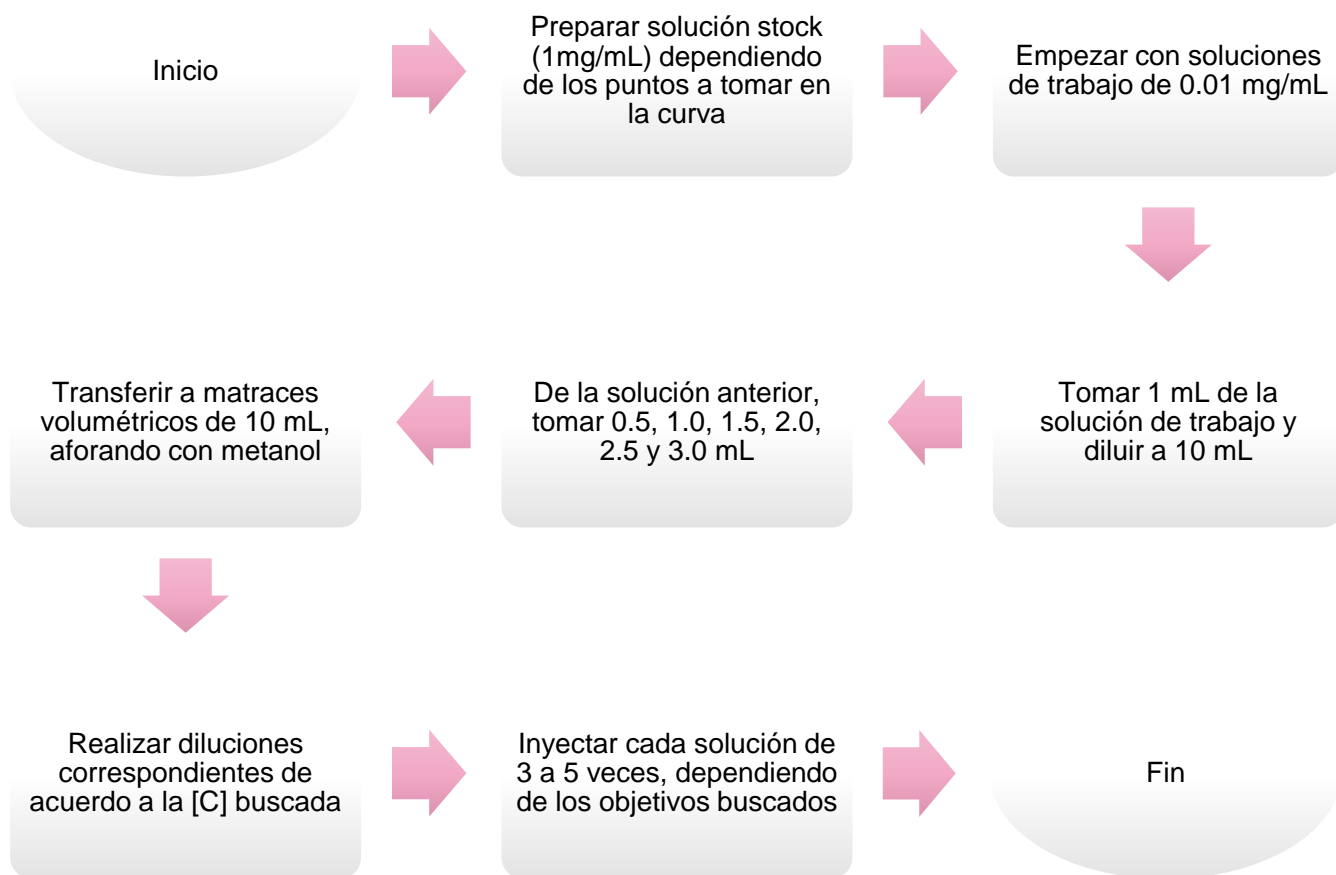
5.5 Validación del método analítico

Una vez realizada la revisión e investigación para el desarrollo analítico y siguiendo la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de QFB's se procedió a la validación del método analítico siguiendo lo indicado para cada prueba (**Figuras 12 a 18**) bajo las condiciones cromatográficas correspondientes a la **Tabla 11**.

- Curva estándar

De acuerdo al **Diagrama 1**, se realizó una curva estándar de progesterona donde se preparó una solución Stock de 1mg/mL de progesterona para después obtener una solución de trabajo de 0.01 mg/mL. Enseguida se tomó 1mL para diluirlo en 10 mL de Metanol grado HPLC, para después con pipetas de 1 a 100 µL transferir las alícuotas correspondientes a matraces de 10 mL hasta obtener las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 ng/mL. Se inyectaron 5 veces las soluciones, bajo las condiciones cromatográficas descritas en la **Tabla 11**.

Diagrama 1. Curva Estándar de Progesterona



- **Precisión del Sistema**

Se realizaron por sextuplicado cada uno de los puntos del intervalo a evaluar de 0.5 a 3ng/mL de Progesterona, de acuerdo a lo descrito en la **Figura 12**. Después, se midió la respuesta analítica bajo las mismas condiciones establecidas para la curva de calibración y muestras analíticas. Por último, se calculó el coeficiente de variación de la respuesta analítica.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación de la respuesta debe ser igual o menor al 2.0%.

- **Adecuabilidad del sistema**

Siguiendo la **Figura 13**, se procedió a inyectar por quintuplicado la solución de adecuabilidad y la respuesta del analito. Se calculó el coeficiente de variación de dicha respuesta.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación de la respuesta debe ser igual o menor al 2.0%.

- Linealidad del Sistema

La linealidad del sistema se evaluó con la determinación de la relación existente entre la concentración de Progesterona “X” y la respuesta “Y” (área absoluta), siguiendo los pasos descritos en la **Figura 14**, utilizando un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, donde la variable independiente “X”, es la concentración nominal (ng/mL) de Progesterona y la variable dependiente “Y” es la respuesta (área absoluta). Se calcularon: Pendiente (m), ordenada al origen (b), coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza al 95% de la pendiente (ICB). La linealidad se evaluó en los intervalos de 0.5 a 3ng/mL, donde cada punto se realizó por triplicado.

Criterio de aceptación: El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual al 0.98 y el intervalo de confianza de la pendiente no debió incluir al cero.

- Exactitud y Repetibilidad del Método

Se calculó el porcentaje recuperado para cada una de las réplicas de los niveles de concentración probados en la prueba de linealidad del método, así como el promedio del porcentaje recuperado para cada nivel de concentración probado y global, el coeficiente de variación del porcentaje recuperado y el intervalo de confianza al 95% siguiendo los pasos de la **Figura 15**. Enseguida, para la repetibilidad del método, se obtuvo el coeficiente de variación (CV) de las muestras utilizadas para evaluar la exactitud del método.

Criterio de aceptación: Coeficiente de variación debe ser menor al 2% en el caso de exactitud del método y menor o igual al 2% para la repetibilidad del método. El promedio del porcentaje recuperado por nivel y global, así como el intervalo de confianza al 95%, deben encontrarse entre 98 y 102% para el caso de exactitud del método.

- Linealidad del Método

Se siguieron los pasos descritos en la **Figura 16** para determinar la linealidad del método, que consiste en la relación existente entre la concentración adicionada de Progesterona X contenidas en el vehículo utilizado y la concentración recuperada (Y), preparando tres concentraciones por triplicado a partir de pesadas independientes e interpolando los valores a la curva patrón utilizada. Después se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, utilizando la concentración adicionada (ng/mL) como variable independiente “X” y la concentración recuperada (ng/mL) como variable dependiente “Y”, para calcular lo siguiente: ordenada al origen (b), pendiente (m), coeficiente de determinación (r^2), intervalos de confianza al 95% para la pendiente y la ordenada al origen, así como la pendiente relativa y el porcentaje de recobro.

Criterio de aceptación. El coeficiente de determinación (r^2) debe ser mayor o igual a 0.98, el intervalo de confianza de la pendiente (ICB) debe incluir a la unidad y el intervalo de confianza de la ordenada al origen (ICA) debe incluir el cero.

- Precisión del Método

Se analizaron por triplicado las muestras utilizadas anteriormente en dos días diferentes y por dos analistas diferente. Se utilizaron los mismos instrumentos y equipos. Por último, se calculó la media aritmética (\bar{x}), desviación estándar (S) y coeficiente de variación (CV). Se siguieron los pasos descritos en la **Figura 17**.

Criterio de aceptación. El coeficiente de variación debe ser igual o menor al 2.0%.

- Estabilidad analítica de la muestra

A temperatura ambiente. Se utilizaron las muestras preparadas anteriormente y se almacenaron a temperatura ambiente a ciclos normales de luz y oscuridad, analizándolas a las 24, 48, 72 y 96 horas.

En refrigeración. Se utilizaron algunas muestras preparadas anteriormente y se almacenaron en refrigeración (0-4°C) y se analizaron a las 24, 48, 72 y 96 horas de su preparación.

Para cada tiempo de análisis se obtuvo el promedio del porcentaje cuantificado de las muestras y el valor absoluto de la diferencia entre el promedio del porcentaje cuantificado de cada uno de los tiempos analizados, con respecto al promedio del porcentaje cuantificado al tiempo cero. Se siguieron los pasos indicados en la **Figura 18**. Se hizo lo mismo para 0, 7, 15 y 30 días.

Criterio de aceptación. La diferencia absoluta del promedio del porcentaje cuantificado de las muestras en cada tiempo de análisis con respecto al porcentaje al tiempo cero no debe ser mayor al 2%, para ser consideradas estables dentro de las condiciones de almacenamiento.

5.6 Obtención y tratamiento de muestras de fluidos biológicos bovinos

Se realizó la investigación bibliográfica correspondiente en libros y artículos de investigación para encontrar el método de extracción y tratamiento más adecuado para la PG en los fluidos biológicos bovinos, a continuación se presentan. La descripción dada tanto para los **Diagramas 2 y 3** fueron obtenidas de Kawasaki, 1999 y Na Li, 2015, respectivamente.

5.6.1 Extracción de Progesterona en fluidos biológicos bovinos

Diagrama 2. Extracción de Progesterona en suero de bovino

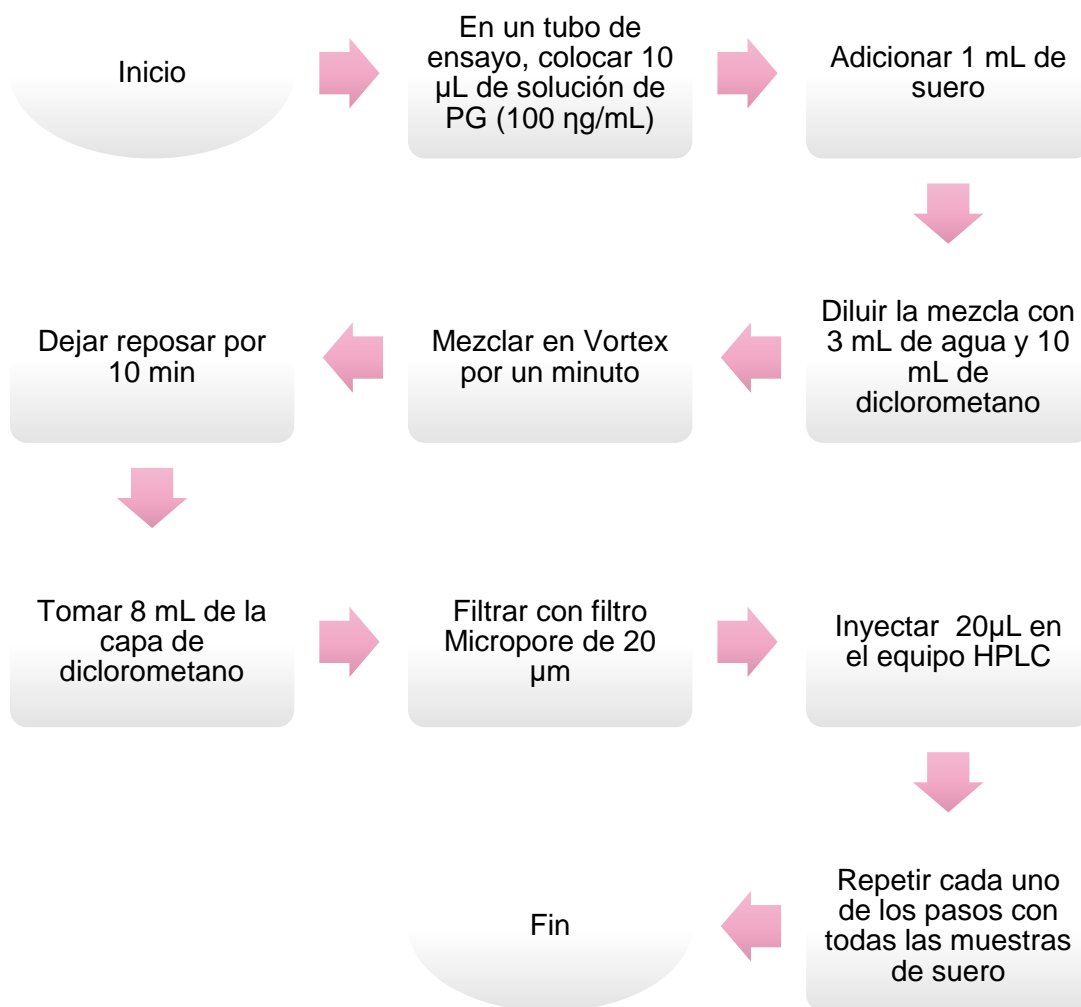
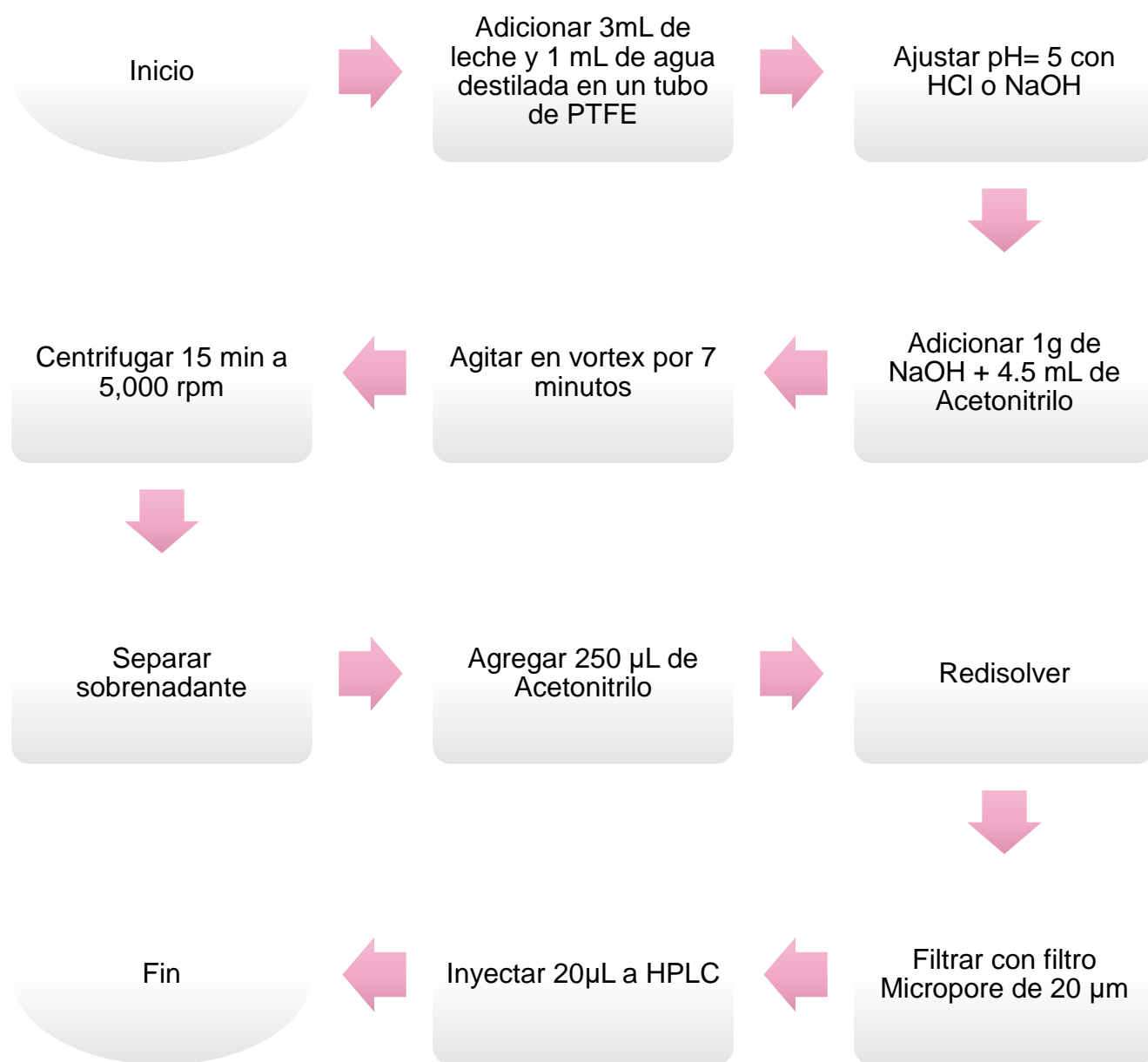


Diagrama 3. Extracción de Progesterona en leche de bovino



- Extracción de progesterona del suero

En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del suero, para después diluirlo con 3 mL de agua y 10 mL de diclorometano. Se mezcló en un mezclador Vórtex por un minuto y se dejó reposar por 10 minutos. Se tomó 8 mL de la capa de diclorometano (inferior) y se hizo pasar por una membrana Micropore de 20 μ m de diámetro para depositar el filtrado en un frasco ámbar. Se tomaron 20 μ L de esta solución y se inyectaron en el HPLC.

Se siguió el mismo método para todas las muestras de suero, de acuerdo al **Diagrama 2**.

- Extracción de progesterona de la leche

En un tubo de PTFE se adicionaron 3 mL de leche y 1 mL de agua destilada; enseguida, se midió el pH ajustándolo a 5 con la adición de HCl o NaOH para después agregar 1 mL de NaOH y 4.5 mL de acetonitrilo. Se mezcló en un mezclador Vórtex por 7 minutos y se centrifugó por 15 min a 5,000 rpm. Se separó el sobrenadante y se agregaron 250 μ L de acetonitrilo para redissolver, y después se hizo pasar por una membrana Micropore de 20 μ L de diámetro. Se tomaron 20 μ L para ser inyectados al HPLC.

Se siguió el mismo método para todas las muestras de leche, de acuerdo al **Diagrama 3**.

5.7 Evaluación del implante de formación in-situ

Una vez obtenidas y tratadas las muestras, se procedieron a inyectar 20 μ L en el equipo HPLC, bajo las condiciones previamente mencionadas. Se obtuvieron sus respectivas respuestas y por tratamiento matemático (despeje de la ecuación $y=mx + b$) se obtuvieron las concentraciones ng/mL para cada muestra de los lotes evaluados.

Entre cada inyección se hicieron lavados de la jeringa con Metanol, Isopropanol y Hexano, todos de grado HPLC, para retirar los residuos de progesterona que pudieran quedar en las paredes de la jeringa .

5.8 Comparación del implante de formación in-situ con respecto a los productos comerciales

Una vez obtenidas las concentraciones ng/mL de cada muestra evaluada, se procedieron a realizar las gráficas correspondientes (utilizando el eje "X" para los días donde se realizaron las tomas de muestras y en el eje "Y" la respuesta ng/mL correspondiente de cada lote y para cada día) y de este modo, observar el comportamiento de cada producto comercial, así como el de nuestro implante de interés en un intervalo de cero a 16 días.

Por último, en base a los resultados obtenidos, se describieron las ventajas y perspectivas del implante de interés en comparación con los productos presentes en el mercado.

6. Resultados y discusión

6.1 Formulación y caracterización de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida

6.1.1 Formulación del gel

Se obtuvieron los geles a partir del procedimiento anteriormente descrito, obteniendo la formación del implante con éxito. Esto indica, que al utilizar la técnica de dispersión sólida, el polímero (PEG 6000) y la progesterona presentaron cambios en sus interacciones con el disolvente, mejorando así la estabilidad de la suspensión, evitando la formación del fenómeno conocido como "cake", sedimento casi imposible de re-suspender.

La técnica de dispersión sólida, permite mejorar la interacción de un fármaco hidrofóbico con su medio acuoso, gracias a que mejora su solubilidad. Lo anterior, es debido a que la progesterona cambia de un estado cristalino a amorfo, además de que hay una disminución del tamaño de partícula, dando como resultado un incremento en el área superficial y un aumento en la humectabilidad del fármaco debido a la naturaleza hidrofílica del PEG 6000 (Nikghalb, Singh, Singh, 2012).

Cabe mencionar que la transición del estado cristalino a amorfo se debe a que el fármaco, PEG 6000 y el copolímero de acrilatos recrystalizan en conjunto, evitando así la formación de estructuras cristalinas. Las moléculas en su forma amorfa son más solubles, debido a que la energía que necesitan para romper los enlaces es menor (Taylor, Zografi, 1997). Y además tienen una mayor cantidad de energía interna que permite la formación de interacciones con las moléculas del disolvente, favoreciendo de este modo su disolución (Singh, Van den Mooter, 2016).

6.1.2 Pruebas de calidad

- Inyectabilidad

Se obtuvieron datos a partir de pruebas de inyectabilidad en aire, así como en condiciones que simulaban una administración del gel por vía subcutánea e intramuscular utilizando una gama de diferentes calibres de aguja.

Tabla 12. Resultados de la prueba de inyectabilidad en aire del gel de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida.

Calibre de aguja (G)	Muestra	Fuerza (N)	Calibre de aguja (G)	Muestra	Fuerza(N)
16	Blanco	0.5	18	Blanco	1.2
	1	2.4		1	3.8
	2	2.4		2	3.8
	3	2.5		3	4.1
	4	2.4		4	3.8
	5	2.5		5	3.9
	6	2.5		6	3.8
	7	2.5		7	3.9
	8	2.5		8	3.8
	Promedio	2.5		Promedio	3.9
	Desviación estándar	0.05		Desviación estándar	0.1
	CV	2.0%		CV	2.6%
20	Blanco	1.6	21	Blanco	2.1
	1	4.2		1	4.6
	2	4.4		2	4.5
	3	4.2		3	4.6
	4	4.4		4	4.5
	5	4.3		5	4.5
	6	4.2		6	4.5
	7	4.1		7	4.7
	8	4.4		8	4.6
	Promedio	4.3		Promedio	4.6
	Desviación estándar	0.1		Desviación estándar	0.08
	CV	2.3%		CV	1.7%
22	Blanco	2.8	23	Blanco	3.7
	1	5.1		1	5.1
	2	5.0		2	5.1
	3	4.9		3	5.0
	4	5.0		4	5.2
	5	5.0		5	5.2

	6	5.1		6	5.0
	7	5.0		7	5.2
	8	5.1		8	5.2
	Promedio	5.0		Promedio	5.1
	Desviación estándar	0.07		Desviación estándar	0.08
	CV	1.4%		CV	1.5%
25	Blanco	4.4	26	Blanco	4.7
	1	5.9		1	6.5
	2	6.1		2	6.9
	3	6.0		3	6.5
	4	6.1		4	6.6
	5	6.1		5	6.9
	6	6.0		6	6.7
	7	6.1		7	6.6
	8	5.9		8	6.9
	Promedio	6.0		Promedio	6.7
	Desviación estándar	0.08		Desviación estándar	0.1
	CV	1.3%		CV	2.6%
	27	Blanco		5.3	30
1		7.1	1	8.7	
2		7.0	2	8.8	
3		7.2	3	8.7	
4		7.1	4	8.5	
5		7.1	5	8.7	
6		7.2	6	8.5	
7		7.1	7	8.8	
8		7.0	8	8.7	
Promedio		7.1	Promedio	8.7	
Desviación estándar		0.08	Desviación estándar	0.11	
CV		1.1%	CV	1.3%	

En el caso de la aguja con calibre 32G, no fue posible obtener los valores, pues sobrepasaba el límite establecido para la celda de carga.

Tabla 13. Resultados de la prueba de inyectabilidad bajo condiciones que simulan una administración de tipo subcutánea del gel de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida.

Calibre de aguja (G)	Muestra	Fuerza (N)	Calibre de aguja (G)	Muestra	Fuerza (N)
16	Blanco	2.5	18	Blanco	3.8
	1	7.8		1	12.5
	2	8.1		2	12.1
	3	8.3		3	11.9
	4	7.7		4	12.4
	5	8.2		5	11.8
	6	7.9		6	12.3
	7	8.1		7	12.2
	8	7.8		8	12.5
	Promedio	7.9		Promedio	12.2
	Desviación estándar	0.2		Desviación estándar	0.3
	CV	2.5%		CV	2.5%
23	Blanco	5.2	25	Blanco	6.1
	1	23.4		1	25.4
	2	24.7		2	26.3
	3	23.9		3	26.9
	4	25.5		4	25.7
	5	23.2		5	27.4
	6	23.7		6	26.1
	7	23.1		7	25.7
	8	23.4		8	26.6
	Promedio	23.0		Promedio	26.3
	Desviación estándar	0.6		Desviación estándar	0.7
	CV	2.6%		CV	2.7%

Tabla 14. Resultados de la prueba de inyectabilidad bajo condiciones que simulan una administración de tipo intramuscular del gel de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida.

Calibre de aguja (G)	Muestra	Fuerza (N)	Calibre de aguja (G)	Muestra	Fuerza (N)
16	Blanco	2.5	18	Blanco	3.8
	1	18.1		1	22.1
	2	12.1		2	22.9
	3	11.9		3	23.5

	4	12.4		4	22.7
	5	11.8		5	23.1
	6	12.3		6	22.4
	7	12.2		7	23.7
	8	12.5		8	23.8
	Promedio	12.2		Promedio	23.0
	Desviación estándar	0.3		Desviación estándar	0.6
	CV	2.5%		CV	2.6%
18 ½	Blanco	4.0	20	Blanco	4.9
	1	23.2		1	30.3
	2	23.4		2	32.1
	3	22.9		3	31.6
	4	23.7		4	31.9
	5	23.9		5	30.7
	6	22.4		6	31.5
	7	22.8		7	32.4
	8	23.7		8	31.2
	Promedio	23.2		Promedio	31.5
	Desviación estándar	0.5		Desviación estándar	0.7
	CV	2.2%		CV	2.2%
	23	Blanco		5.2	
1		34.2			
2		35.0			
3		34.7			
4		35.0			
5		34.6			
6		33.1			
7		34.5			
8		34.6			
Promedio		34.5			
Desviación estándar		0.6			
CV		1.7%			

Se dio inició con la respectiva experimentación a partir de 16G, pues debe de tomarse en cuenta el calibre que realmente se utiliza para la administración de las vacas *in-vivo*, que oscilan entre los 16 y 18 G (Acerbi, 2009). Por lo que el gel puede ser inyectado con la seguridad de que el animal no sufre dolor en el momento de la aplicación, ya que de acuerdo a la **Tabla 12**, el gel es de muy fácil aplicación (aire), fácil aplicación (subcutánea) e inyectable en el caso de la administración intramuscular (Rungseevijitprapa, Bodmeier, 2008).

Tabla 15. Correlación de fuerza de inyección in-vitro,in-vivo (Rungseevijitprapa, Bodmeier, 2008).

Fuerza de inyección N (in-vitro)	Inyectabilidad (in-vivo)
0-10	Muy fácil de inyectar. Se recomienda una medida de aguja más pequeña
11-25	Fácil de inyectar
26-50	Inyectable
51-100	Se inyecta con dificultad
100-130	Difícil de inyectar. Se recomienda una medida de aguja más grande
>130	Muy difícil de inyectar. Se recomienda una medida de aguja más grande

El calibre de las agujas utilizadas se miden en Gauge (G) que es una escala inversa que va desde la aguja más gruesa 1G de 12,7 mm hasta la aguja más fina de 36G con 0.102 mm. En este caso se inició con 16G hasta 32G, donde en los últimos calibres se observó una diferencia significativa en la dificultad y fuerza de aplicación del implante (Medical Market, 2019).

La ecuación de Poiseuille describe el flujo de un fluido a través de un tubo estrecho, lo cual puede ser aplicado para una jeringa. Sin embargo, debido a que el tipo de fluido que presenta el gel evaluado es pseudo-plástico, dicha ecuación no tiene validez, ya que la viscosidad no es constante y al ser no newtoniano, es necesario realizar la prueba de inyectabilidad, para asegurarse de que es una suspensión posible de inyectar y que no lastimará al animal durante la administración (Runseevijitprapa, Bodmeier, 2008).

$$\Delta P = P_2 - P_1 = \frac{8Q\eta L}{\pi r^4}$$

- Determinación de pH

En la **Tabla 16** se observan valores de pH constantes, lo que indica principalmente ausencia de procesos de degradación en los componentes de la formulación, y la no presencia de sustancias contaminantes. Evitando así que puedan generarse alteraciones en la distribución de tamaño de partícula o la tendencia de la suspensión a formar dos fases (Tiburcio, 2018). A su vez, el mantener condiciones de pH adecuado, permite que la suspensión posea mayor estabilidad, y que la probabilidad de formación de sedimentos de difícil re-suspensión o crecimiento de cristales, disminuya (Patel, 2010).

Tabla 16. Determinación del pH en geles de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida

Muestra	pH
1	5.1
2	5.0
3	5.1
4	5.3
5	5.1
Promedio (\bar{x})	5.1
Desviación estándar (s)	0.1
Coefficiente de Variación (CV)	1.6%

Una de las ventajas presentadas en la prueba, es que al obtener los valores de pH mencionados anteriormente, el Kollicoat MAE 30 DP (copolímero de acrilatos), se encuentra disuelto antes de la administración, gracias a que es soluble en medio acuoso a pH ácidos, para que después, al entrar en contacto con el medio que tenga un pH mayor, por ejemplo la subdermis que tiene un valor cercano a pH 7.4, precipite y forme el implante de interés (Dickson, Sharp, 1985). Otro punto importante, es que debido a que la progesterona no se ve afectada por el pH del medio, no se ioniza, y por lo tanto no existen reportes de inestabilidad o descomposición a algún pH específico, por lo que se mantiene activa en el pH de la formulación del gel (SpectrumLaboratoryProducts INC. 2013).

- Formación del implante

La formulación del gel de progesterona, posee un polímero de ácido metacrílico insoluble en agua y soluble en etanol; debido a esto, cuando la formulación entra en contacto con el agua presente en el medio, se genera un intercambio de disolventes, donde el etanol comienza a difundir, induciendo a que el polímero entre en contacto con el medio acuoso, y precipite para generar el implante sólido, de morfología adaptable a su contenedor, que permitirá la liberación sostenida del fármaco progesterona (Phaechamud, Jantadeee, Mahadlek, et, al. 2017).



Imagen 4. Gel de PG en dispersión sólida formado en grenetina al 2.5% a la izquierda y a la derecha la formación del implante.

Por último, el gel obtenido fue sólido, opaco, ligeramente blanco, sin sedimento de fármaco. Su textura fue lisa, y mostró un comportamiento pseudoplástico al ejercer presión manual, es decir, recuperaba su forma original después de dejar de ejercerla. Este tipo de características son indicadores de que es posible que se de la formación del implante en el sitio en el cual es aplicado. Esta estructura es la que aloja al fármaco y permite la liberación sostenida.

- Velocidad de intercambio de disolventes

La prueba tiene como objetivo, mostrar la velocidad a la que ocurre el intercambio de disolventes etanol-agua, para generar el gel sólido tipo matriz de interés (Phaechamud, Jantadeee, Mahadlek, et, al. 2017). En el presente experimento, se observó una velocidad de difusión que depende de la formación del implante, pues una vez creada la barrera que retarda la penetración de agua al sistema y la salida de etanol, la velocidad que inicialmente era mayor, disminuyó paulatinamente, demostrando que dicha velocidad de difusión no es constante (Phaechamud, Jantadeee, Mahadlek, et, al. 2017).

La importancia de la velocidad de intercambio de disolventes permite pronosticar el tiempo que le puede tomar al sistema formar el implante, así como los primeros momentos en los que se llevará a cabo la liberación del fármaco; sin embargo, ha de tomarse en cuenta que al inyectarse *in-vivo* los valores observados de tiempo

para la formación del implante presenten una variación debido a que la disponibilidad del agua en el tejido subcutáneo es menor, mientras que el área de contacto es mucho mayor (Phaechamud, Jantadeee, Mahadlek, et, al. 2017).

Tabla 17. Velocidad de intercambio de disolventes en el gel para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida

Muestra	1	2	3	4	5	Promedio
Distancia (mm)	77	80	80	80	80	79.40
Velocidad (mm/min)	1.1	1.1	1.3	1.0	1.1	1.12

Tabla 18. Tiempo de formación de un implante in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida

Velocidad (mm/min)	Velocidad (mL/min)	Formación de implante (min)
1.12	0.10	61.70

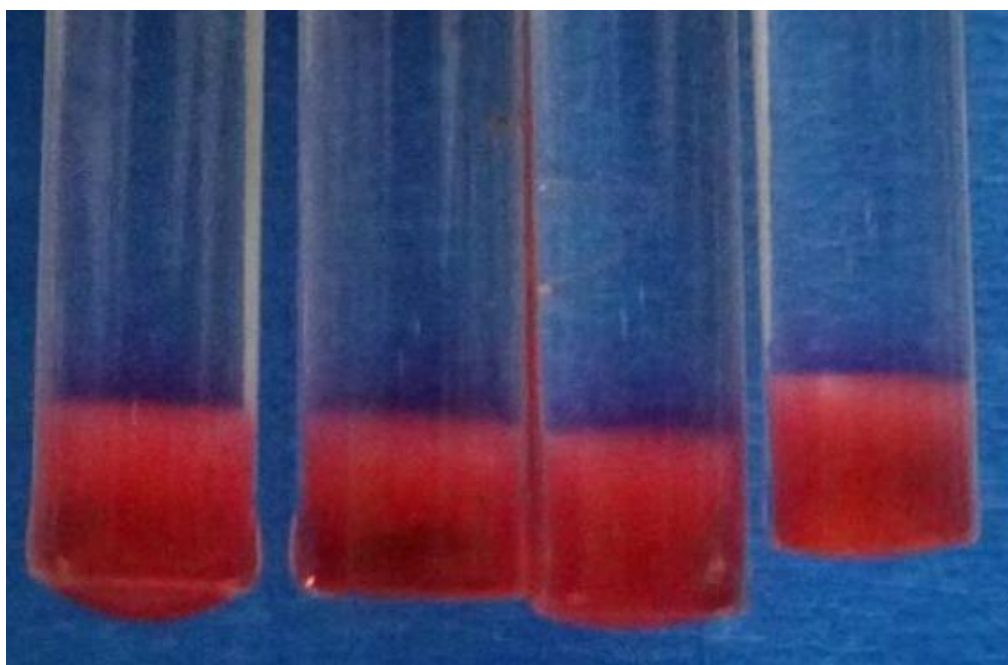


Imagen 5. Difusión del etanol de la suspensión del gel de formación in-situ en un medio acuoso con colorante rojo fresa.

- Reología

Se evaluaron las propiedades reológicas de cada excipiente utilizado en la formulación, para asegurar el comportamiento de los reactivos y que éstos, actúen del mismo modo en que lo hicieron antes, al producir geles en trabajos previos (Tiburcio, 2018). Se utilizó un reómetro de esfuerzos controlados Hybrid Discovery HR-3 con geometría de cilindros concéntricos bajo condiciones previamente establecidas por nuestro equipo de trabajo, utilizando flujos de cizalla simple y oscilatoria.

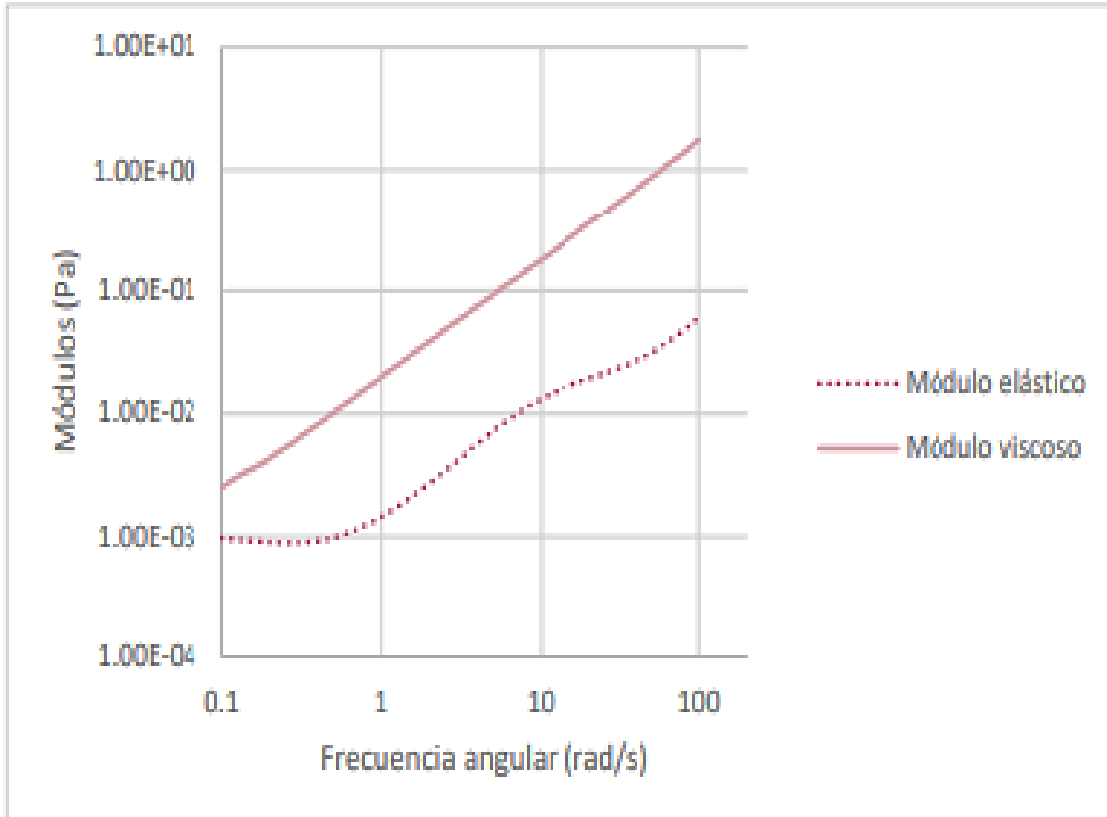


Figura 19. Estudio reológico de PEG 6000 disuelto en una mezcla 3:1 de EtOH:H2O. Flujo de cizalla oscilatoria

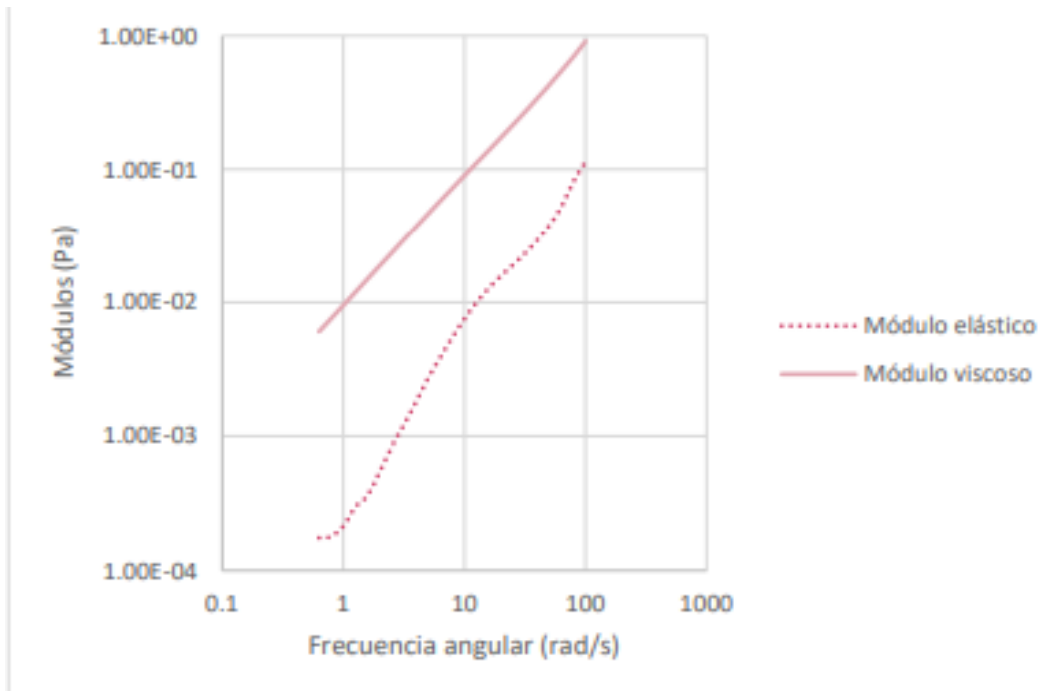


Figura 20. Estudio reológico de Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H2O. Flujo de cizalla oscilatoria

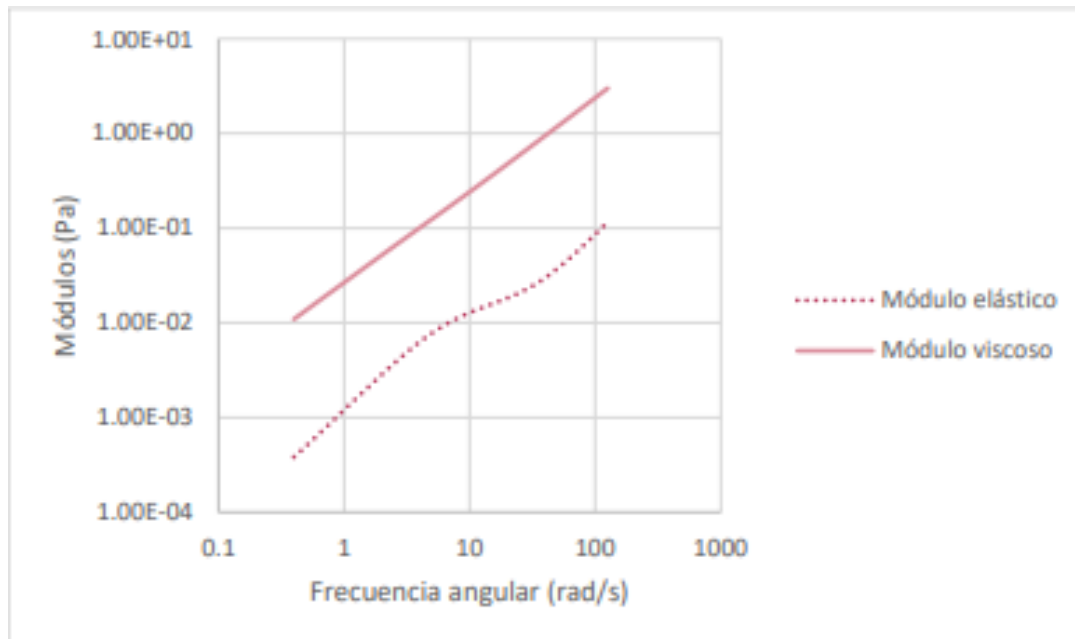


Figura 21. Estudio reológico de PEG 6000 con Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H2O. Flujo de cizalla oscilatoria

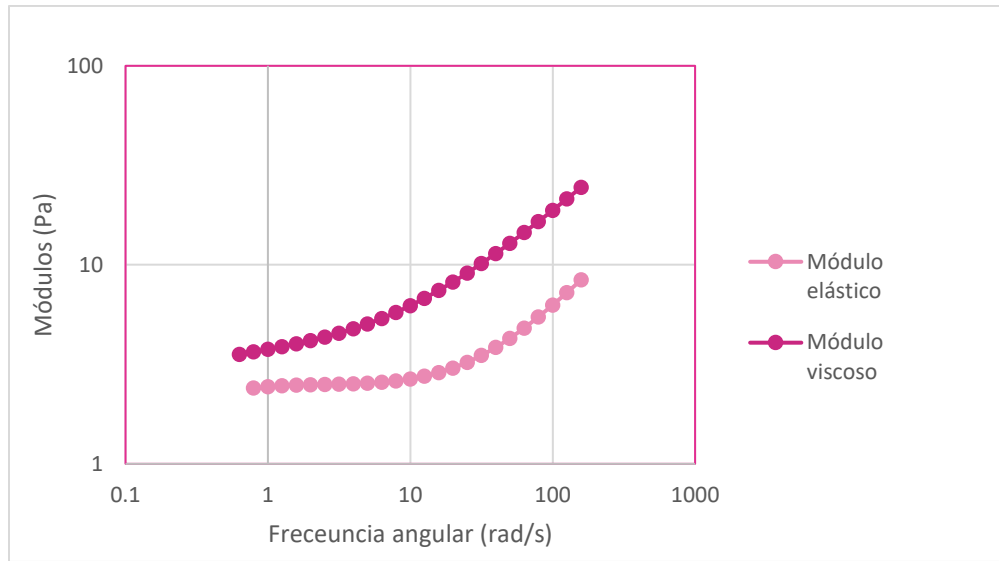


Figura 22. Estudio reológico de PEG 6000 con Progesterona y Kollicoat dispersada en una mezcla 3:1 de EtOH:H₂O. Flujo de cizalla oscilatoria

De acuerdo a los resultados obtenidos, el comportamiento viscolástico del gel de progesterona es similar a los mostrados en Tiburcio, 2018 y presenta un predominio del módulo viscoso sobre el elástico. El módulo viscoso representa la energía perdida por el sistema al aplicar una fuerza paralela en él, mientras que el módulo elástico, se refiere a la cantidad de energía que puede almacenar el sistema. Cuando en un sistema hay una mayor pérdida que almacenamiento de energía, se dice que el sistema fluye. Por lo que las muestras analizadas sugieren ser consideradas como fluidos estructurados con propiedades viscolásticas, y que pueden presentar tanto comportamiento de tipo newtoniano como no newtoniano.

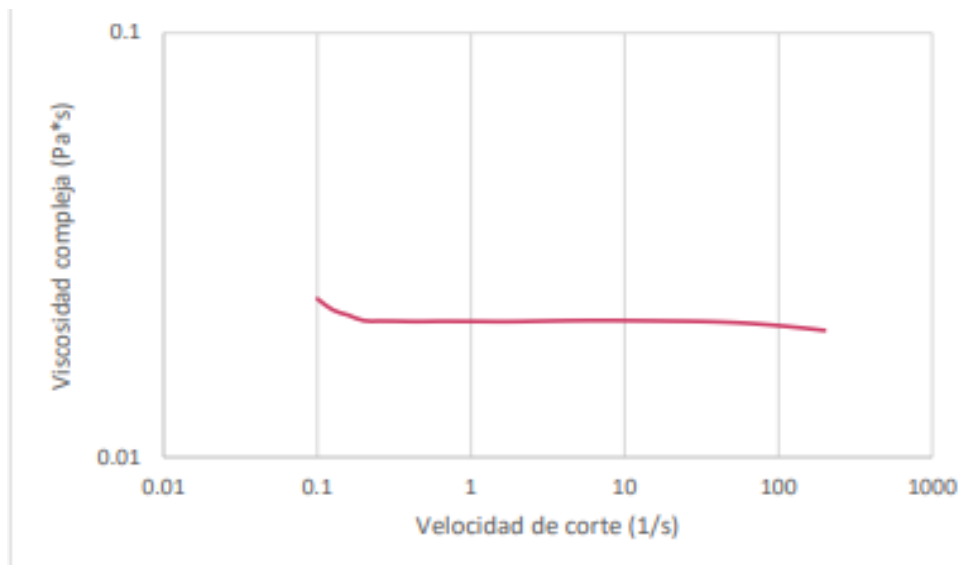


Figura 23. Estudio reológico de PEG 6000 disuelto en mezcla 3:1 de EtOH:H₂O. Flujo de cizalla simple

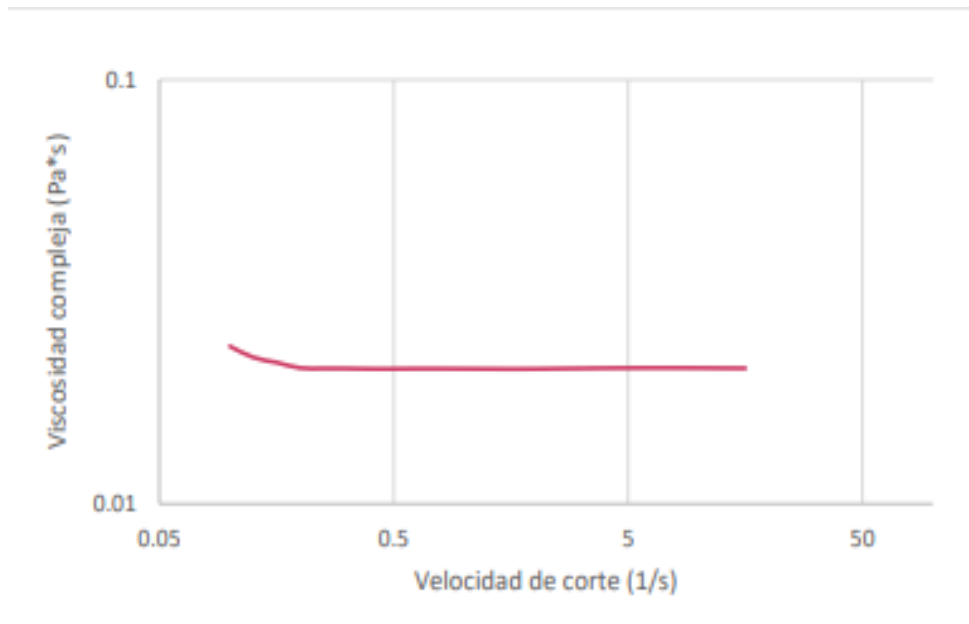


Figura 24. Estudio reológico de Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H2O. Flujo de cizalla simple

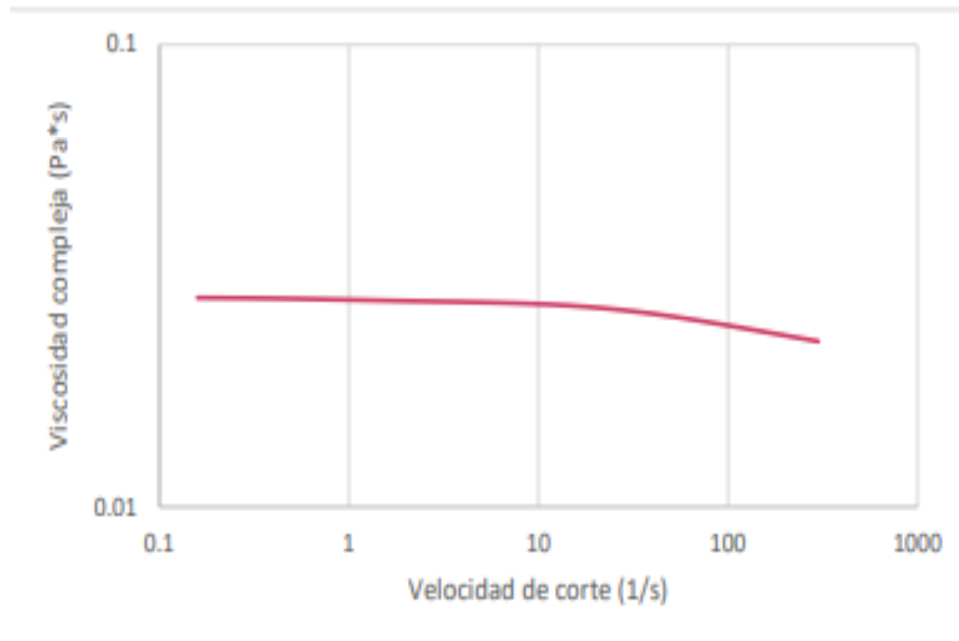


Figura 25. Estudio reológico de PEG 6000 con Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H2O. Flujo de cizalla simple

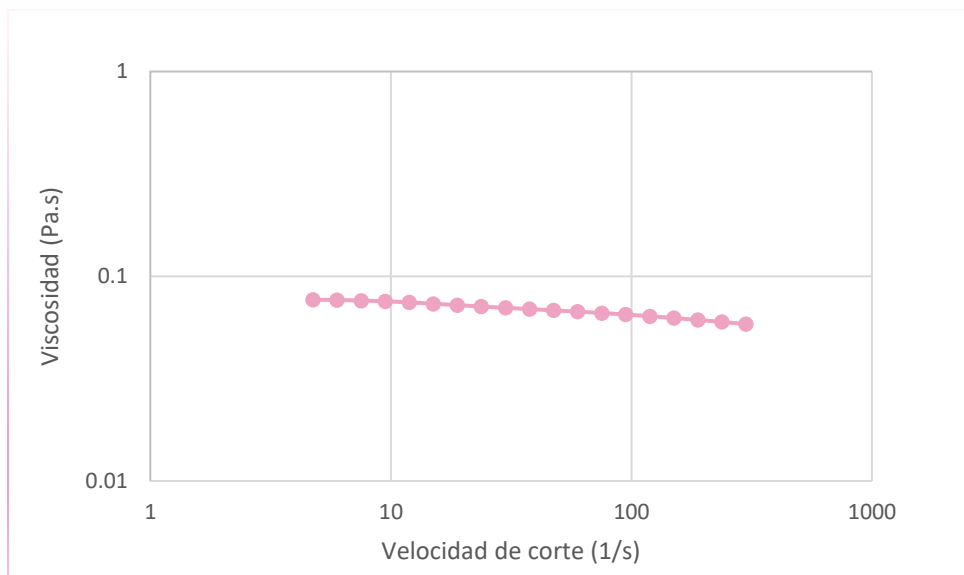


Figura 26. Estudio reológico de PEG 6000 con Progesterona y Kollicoat en mezcla 3:1 de EtOH:H₂O. Flujo de cizalla simple

Una vez obtenidos los resultados anteriores, se observó que la viscosidad es adelgazante al flujo, lo que indica que disminuye conforme aumenta la velocidad de corte. Este comportamiento de tipo no newtoniano es característico de fluidos estructurados, a causa de interacciones fisicoquímicas, en este caso en particular, entre la progesterona y el disolvente. El sistema comenzó a fluir inmediatamente en el momento que se aplicó tensión resultante del aumento de la velocidad de corte, lo cual indica, que se trata de una suspensión pseudo-plástica (TA instruments, 1982).

Estos resultados son indicadores de que es necesario agitar las formulaciones para re-suspender la progesterona antes de su uso, pero este movimiento, no afectará el llenado de la jeringa ni su inyectabilidad; pues dependen únicamente de las propiedades de la aguja, la jeringa y la viscosidad de las propias suspensiones (Runseevijitprapa, Bodmeier, 2008).

Formulación	Viscosidad (cP)
Dispersión sólida de Progesterona + Kollicoat® MAE 30 DP + PEG 6000	84.60-20.37

Como se observa, el gel presenta una baja viscosidad, por lo que permite tener mejores propiedades de inyectabilidad y con menor dolor de aplicación (Runseevijitprapa, Bodmeier, 2008). Aunado a lo anterior, las ventajas que presenta son: una mejor re-suspensión y menor cantidad de fármaco adherido a las paredes de su contenedor (Tiburcio, 2019).

6.2 Desarrollo y validación del método analítico

6.2.1 Desarrollo del método analítico

- Cromatograma

Se partió de los resultados obtenidos en Maliwal, 2009 ya que se utilizaron las mismas condiciones de trabajo; donde se esperaba la respuesta de progesterona entre los minutos 6.0-6.3 sin interferencia de algún otro compuesto a 254 nm.

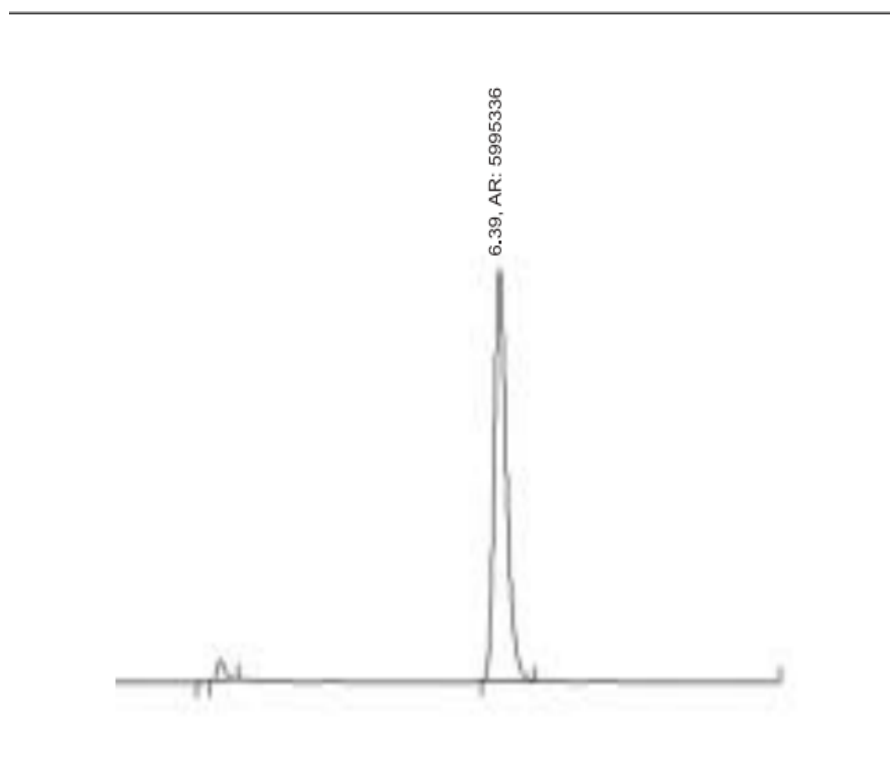


Ilustración 6. Cromatograma típico de progesterona bajo condiciones de HPLC. (Maliwal, 2009).

Sin embargo, la respuesta generada por el equipo utilizado a dicha longitud de onda, no era tan amplia como se esperaba incluso a concentraciones de mg/mL. Por lo que se optó por hacer un barrido, utilizando diferentes longitudes de onda, con el cual se decidió utilizar la de 242 nm pues presentaba una mejor respuesta con respecto a la indicada en la bibliografía consultada.

- Curva estándar

En la **Tabla 19**, se muestran las respuestas obtenidas en la curva estándar, tanto en UA como las áreas de los picos (ngV*sec) de cada inyección.

Tabla 19. Curva Estándar de Progesterona

[C]	Respuesta	Inyección1	Inyección2	Inyección3	Inyección4	Inyección5
0.5	Absorbancia (UA)	23555	21248	21861	19994	20720
	Área (ngV*sec)	246871	227982	238828	216131	222921
1	Absorbancia (UA)	40491	41070	39743	40478	40484
	Área (ngV*sec)	436176	443660	433606	450845	438654
1.5	Absorbancia (UA)	58228	60312	60757	56136	65617
	Área (ngV*sec)	637518	653303	675019	613882	628010
2	Absorbancia (UA)	84455	78822	81099	77182	81888
	Área (ngV*sec)	943162	877131	888952	856059	893034
2.5	Absorbancia (UA)	98646	87701	91228	89690	97212
	Área (ngV*sec)	1124608	977330	1047097	1002484	1080114
3	Absorbancia (UA)	103747	99523	103736	108763	104473
	Área (ngV*sec)	1134036	1075498	1146946	1179577	1146743

A continuación, en la **Figura 27** se puede observar que existe una respuesta proporcional entre la concentración de progesterona y la altura del pico (ngV*sec).

Una curva de calibración es una representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. Esta calibración incluye la selección de un modelo para estimar los parámetros que permitan determinar la linealidad de esa curva y en consecuencia, la capacidad del método analítico para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto de interés de la muestra, dentro de un intervalo determinado de trabajo (Lugo, 20014). Se observa a la pendiente(m) = 38194, que corresponde al valor del incremento que se produce en la altura del pico (mV) cuando la concentración aumenta. Por otro lado la ordenada al origen (b)= 71924, que es el valor en el que la recta corta al eje Y (altura del pico en ngV*sec). El coeficiente de correlación $r^2=0.9827$, la cual indica el grado de relación entre la concentración y la respuesta. Cabe señalar que si r^2 es cercano a la unidad, esto significa que existe correlación. Es importante mencionar que se eligieron estos niveles de concentración pues se optó por seguir la metodología descrita en Maliwal, 2009, que posee un

procedimiento ya validado y para observar el comportamiento del equipo a concentraciones bajas de nuestro analito de interés.

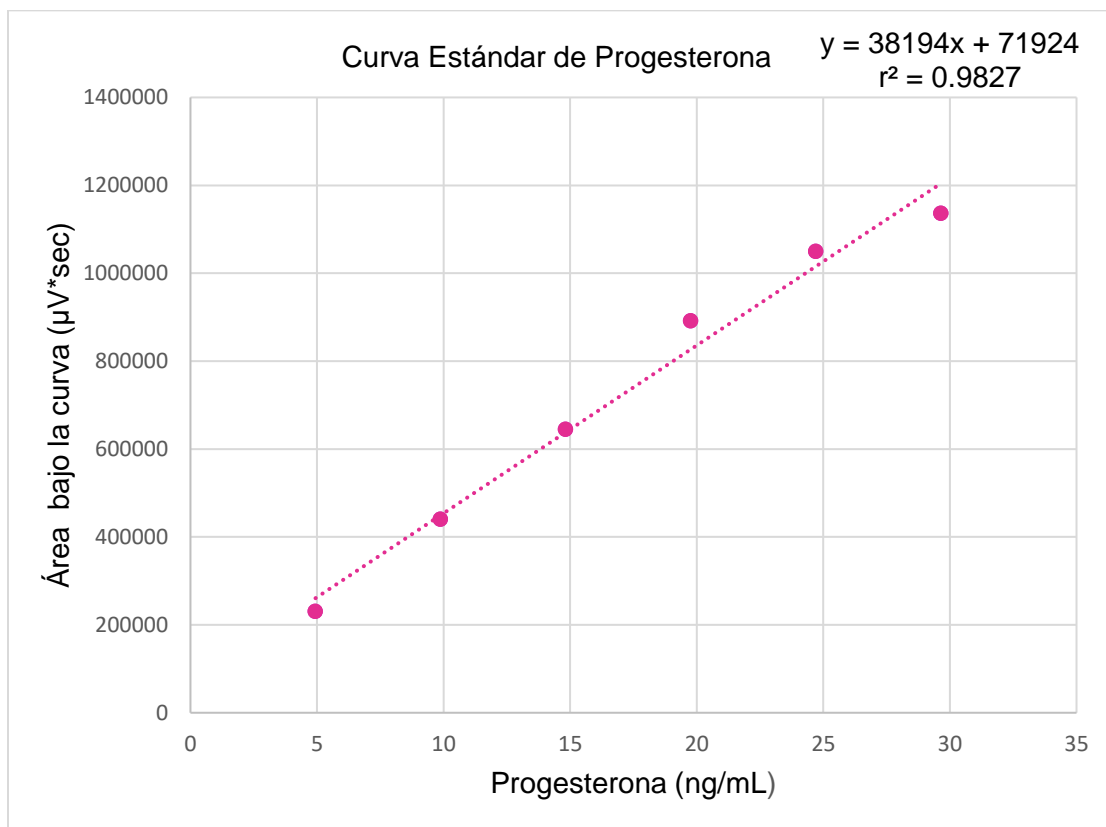


Figura 27. Curva Estándar de Progesterona

6.2.2 Validación del método analítico

A continuación se muestran los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros evaluados para la validación del método analítico.

- Precisión del sistema

Enseguida, se muestran los resultados de la precisión del sistema, donde el CV presenta una respuesta no mayor al 2%, por lo que se concluye que el sistema es preciso.

Respuesta analítica [Área del pico (nV*sec)]

436176	443660	433606	450845	438654	434522
--------	--------	--------	--------	--------	--------

Promedio y desviación estándar

439577.2	6591.9
----------	--------

CV

$$\frac{6591.9}{439577.2} \times 100\% = 1.5$$

El $CV \leq 2\%$ por lo tanto, el sistema es preciso.

- Adecuabilidad del sistema

Los resultados de adecuabilidad del sistema se muestran a continuación, donde el CV presenta una respuesta menor al 2%, por lo tanto, se concluye que el sistema tiene adecuabilidad.

Respuesta analítica [Área del pico (nV*sec)]

40491	41070	39743	40478	40484
-------	-------	-------	-------	-------

Promedio y desviación estándar

40453.2	471.1
---------	-------

CV

$$\frac{471.120685}{40453.2} \times 100\% = 1.2$$

El $CV \leq 2\%$ por lo tanto, el sistema es adecuado.

- Linealidad del sistema

En las **Tablas 20 y 21**, se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, utilizando como variable independiente “X” a la concentración (ng/mL) y como variable dependiente “Y” a la respuesta dada por Progesterona, en los intervalos de 0.5 a 3 ng/mL. Se presenta la ecuación de la línea recta y los resultados estadísticos, donde el coeficiente de determinación es igual a 0.98, el error relativo por la regresión de los puntos no es mayor al 2% y el intervalo de confianza (ICB) al 95% de la pendiente no incluye el cero.

Tabla 20. Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo de 0.5 -3 ng/mL)

Concentración (ng/mL)	Respuesta	Inyección1	Inyección2	Inyección3	Inyección4	Inyección5
0.5	Absorbancia (UA)	23555	21248	21861	19994	20720
	Área (ngV*sec)	246871	227982	238828	216131	222921
1	Absorbancia (UA)	40491	41070	39743	40478	40484
	Área (ngV*sec)	436176	443660	433606	450845	438654
1.5	Absorbancia (UA)	58228	60312	60757	56136	65617
	Área (ngV*sec)	637518	653303	675019	613882	628010
2	Absorbancia (UA)	84455	78822	81099	77182	81888
	Área (ngV*sec)	943162	877131	888952	856059	893034
2.5	Absorbancia (UA)	98646	87701	91228	89690	97212
	Área (ngV*sec)	1124608	977330	1047097	1002484	1080114
3	Absorbancia (UA)	103747	99523	103736	108763	104473
	Área (ngV*sec)	1134036	1075498	1146946	1179577	1146743

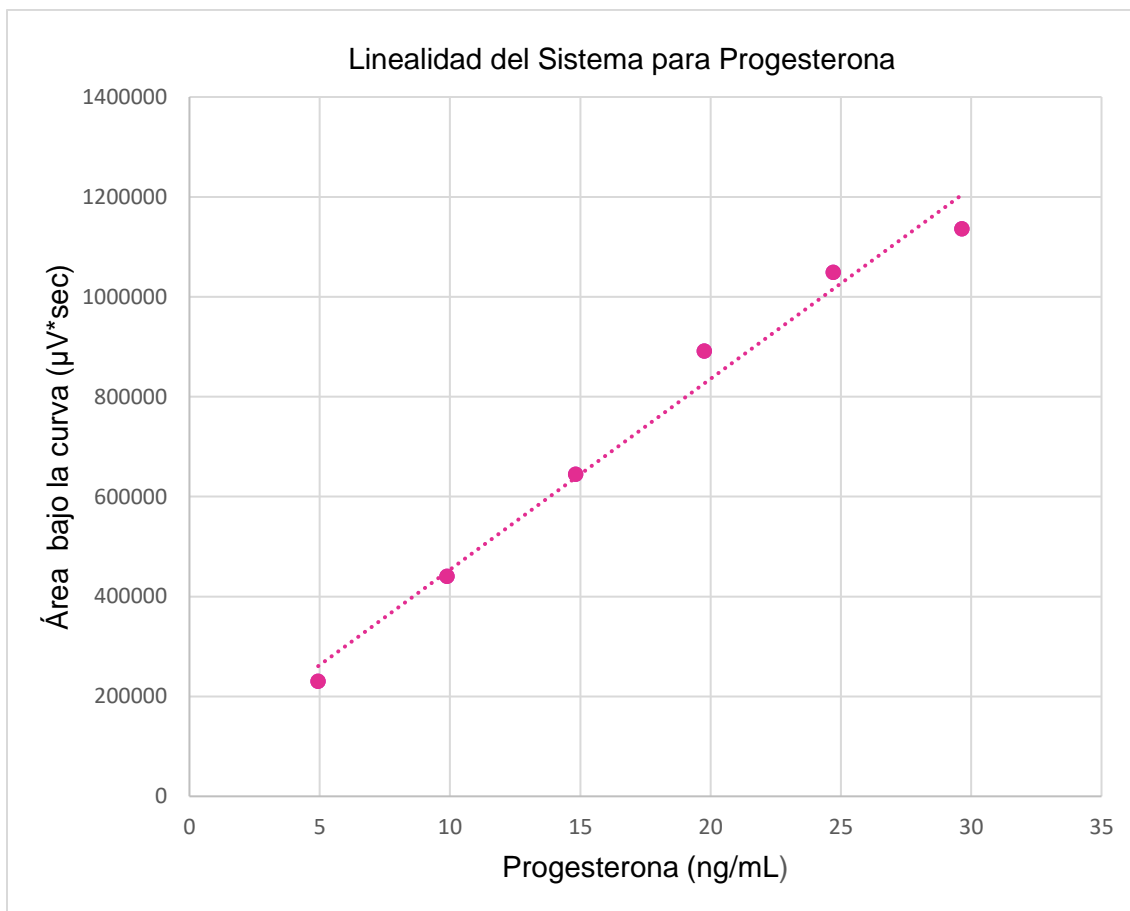


Figura 28. Gráfica de Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo 0.5-3 ng/mL)

Tabla 21. Parámetros a evaluar para Linealidad del Sistema

Parámetro a evaluar	Valor
m	38194
b	71924
r^2	0.9827
t Tablas	3.182
ICB (Intervalo de Confianza al 95% para la Ordenada al Origen y la Pendiente)	197572.2, -121184.2

Cálculo de ICB

$$m \pm t_{0.95n-2} S_m$$

$$38194 + 2.048 \times 77821.39 = 197572.20$$

$$38194 - 2.048 \times 77821.39 = -121184.20$$

Ejemplo de cálculo

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{2.056984072 \times 10^{13} - 38194 \times 46635064 - 71924 \times 21936177}{30 - 2}}$$

$$= 823584.27$$

$$S_m = 823584.27 \sqrt{\frac{1}{113.75 - \frac{52.5}{30}}} = 77821.39$$

De acuerdo a lo anterior, se concluye que el sistema es lineal en los intervalos dados para la Progesterona (las fórmulas utilizadas fueron tomadas de la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de QFB's).

- Exactitud y repetibilidad del método

En las **Tablas 22 y 23**, se muestran los resultados de la evaluación de la exactitud del método para la Progesterona, donde a partir de los ng/mL cuantificados en la prueba de Linealidad del método, se calculó el porcentaje cuantificado para cada réplica en los niveles de concentración probados (1 a 3 ng/mL), los cuales se encuentran entre el 98 y 102%, así como el porcentaje global, por lo que se cumple con el criterio de exactitud del método. Es decir, el método es exacto.

Mientras que para la repetibilidad, se observan los resultados de la evaluación en la **Tabla 22**, donde el coeficiente de variación (CV) del porcentaje recuperado por nivel y global no fue mayor al 2%, por lo cual, se concluye que el método es repetible y exacto.

Tabla 22. Exactitud y Repetibilidad del Método para Progesterona

Réplica	% Recuperado		
1	98.5	99.4	100.1
2	102.0	99.1	99.7
3	98.6	99.3	100.1
n	3	3	3
Promedio	99.7	99.3	99.9
D.E	1.9	0.1	0.2
CV	1.9	0.1	0.2

Tabla 23. Exactitud y Repetibilidad del Método. Valor Global

Global	
n	9
Promedio	99.6
D.E	1.0

CV	1.0
----	-----

- Linealidad del método

A continuación, se muestran los datos con los que se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados utilizando como variable independiente “X” a la concentración nominal (ng/mL) y como variable dependiente “Y” a la concentración cuantificada para la progesterona (ng/mL), se presenta la ecuación de la recta y los resultados estadísticos, donde se observa que el coeficiente de determinación es igual a 0.98

Tabla 24. Linealidad del Método para Progesterona (Intervalo de 1-3 ng/mL)

Placebo analítico adicionado	Cantidad adicionada (ng/mL)	Cantidad recuperada (ng/mL)
1	1.10	0.80
2	1.08	0.97
3	1.09	1.00
4	2.11	2.04
5	2.10	2.02
6	2.07	2.00
7	3.09	3.02
8	3.12	3.09
9	3.06	3.04

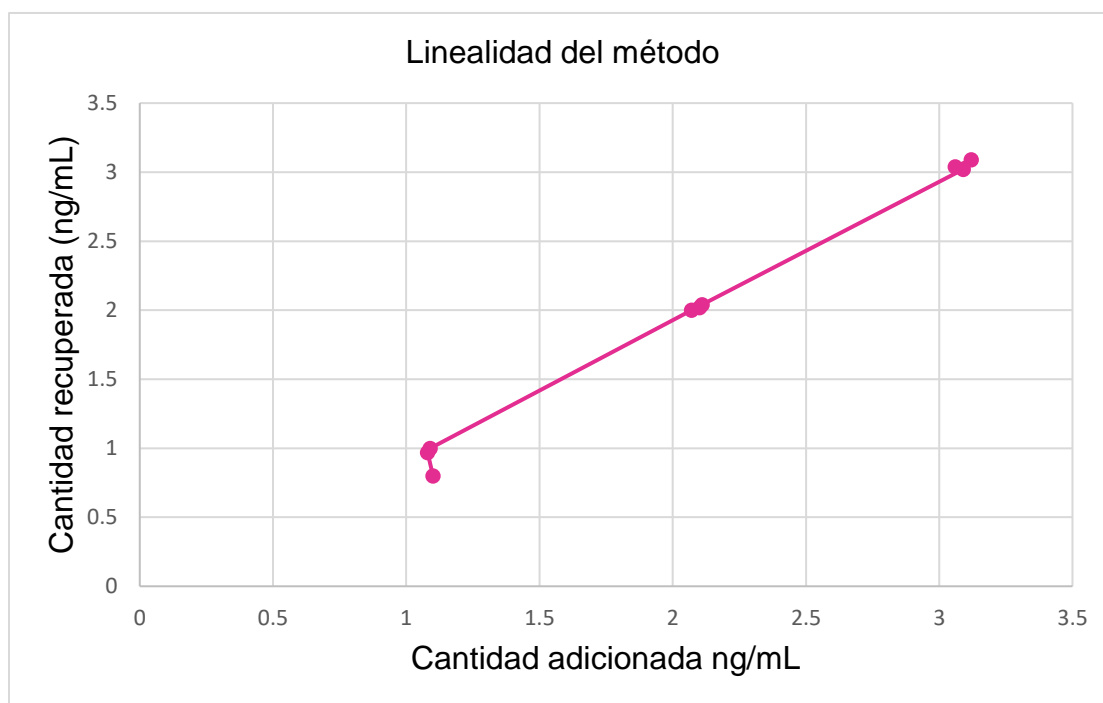


Figura 29. Gráfica de Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo 1-3 ng/mL)

Tabla 25. Parámetros a evaluar para Linealidad del Método

Parámetro a evaluar	Valor
M	1.063
B	-0.225
r^2	0.9955
t Tablas	2.365
ICB	14.521, -5.515
ICA	12.198, -14.763

Cálculo de ICB

$$m \pm t_{0.95n-2} S_m$$

$$1.063 + 2.365 \times 4.236 = 14.521$$

$$1.063 - 2.365 \times 4.236 = -5.515$$

Cálculo de ICA

$$b \pm t_{0.95n-2} S_b$$

$$\text{ICA} = -0.225 + 2.365 \times 5.70 = 12.198$$

$$-0.225 - 2.365 \times 5.70 = -14.763$$

CV

$$\frac{0.02}{1.99} \times 100\% = 1.0\%$$

El intervalo de confianza de la ordenada al origen (ICA), incluye el cero. En el caso del ICB no incluye a la unidad, de forma que cumple con el criterio de aceptación y el $CV \leq 2\%$. De acuerdo a lo anterior, se concluye que el método es lineal en el intervalo de 0.5 a 3 ng/mL para la progesterona.

- Precisión del Método

Se realizó la metodología indicada en la **Figura 17**, donde de acuerdo al criterio de aceptación establecido y a los valores obtenidos en la prueba, el método es preciso.

Respuesta analítica Área del pico (nV*sec)

41795	40596	41827	40491	40478	40484
-------	-------	-------	-------	-------	-------

Promedio y desviación estándar

40945.2	672.2
---------	-------

CV

$$\frac{672.2}{40945.2} \times 100\% = 1.6\%$$

El $CV \leq 2\%$ por lo tanto, el método es preciso.

- Estabilidad analítica de la muestra

A Temperatura Ambiente

En las **Tablas 26 a 28**, se muestran los resultados de la prueba de estabilidad de las muestras a temperatura ambiente, en ellas se observa que la diferencia absoluta del porcentaje cuantificado con respecto al porcentaje cuantificado inicial para todos los niveles de concentración para la Progesterona probados, no es mayor al 2% hasta las 96 horas.

A Temperatura ambiente

Tabla 26. Estabilidad analítica de la muestra, (1ng/mL)

Tiempo (h)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	100.8	-----
24	101.3	0.5
48	100.7	0.1
72	100.4	0.4
96	100.2	0.6

$|d| \leq 2\%$ por tanto, es estable.

A temperatura ambiente

Tabla 27. Estabilidad analítica de la muestra, (2ng/mL)

Tiempo (h)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.0	-----
24	100.4	1.4
48	100.1	1.1
72	100.4	0.5
96	100.2	0.6

$|d| \leq 2\%$ por tanto, es estable.

A temperatura ambiente

Tabla 28. Estabilidad analítica de la muestra (3ng/mL)

Tiempo (h)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	98.9	-----
24	100.0	1.1
48	100.0	1.1
72	99.9	1.0
96	99.0	0.1

$|d| \leq 2\%$ por tanto, es estable.

En condiciones de refrigeración

A continuación, en las **Tablas 29 a 31**, se muestran los resultados de la prueba de estabilidad de las muestras en refrigeración (0-4°C), en ellas se observa que la diferencia absoluta del porcentaje cuantificado con respecto al porcentaje cuantificado inicial para todos los niveles de concentración de Progesterona probados, no es mayor al 2%, hasta las 96 horas.

Refrigeración (0-4°C)

Tabla 29. Estabilidad analítica de la muestra (1ng/mL)

Tiempo (h)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	100.8	-----
24	101.4	0.6
48	100.5	0.3
72	100.1	0.7
96	100.7	0.1

$|d| \leq 2\%$ por tanto, es estable.

Refrigeración (0-4°C)

Tabla 30. Estabilidad analítica de la muestra, (2ng/mL)

Tiempo (h)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.0	-----
24	99.5	0.5
48	99.5	0.5
72	100.3	1.3
96	99.5	0.5

$|d| \leq 2\%$ por tanto, es estable.

Refrigeración (0-4°C)

Tabla 31. Estabilidad analítica de la muestra, (3ng/mL)

Tiempo (h)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	98.9	-----
24	100.0	1.1
48	99.9	1.0
72	99.9	1.0
96	99.4	0.5

$|d| \leq 2\%$ por tanto, es estable.

Por último, se hicieron evaluaciones en días para observar hasta cuando la Progesterona podía permanecer estable. Dicha prueba inició en el día cero, hasta cumplir un periodo de 30 días, analizando los resultados obtenidos en los días 7, 15 y 30. En las **Tablas 32 a 34** que corresponden a temperatura ambiente, las muestras se mantuvieron estables hasta el día 7, ya que a partir del día 15 se observa una alta degradación del principio activo, pues la diferencia absoluta del porcentaje cuantificado con respecto al porcentaje cuantificado inicial, es mayor al 2%.

A temperatura ambiente

Tabla 32. Estabilidad analítica de la muestra (1ng/mL)

Tiempo (Días)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	100.5	-----
7	98.3	1.1
15	69.9	31.0
30	43.7	56.6

$|d| \geq 2\%$, por tanto no es estable.

A temperatura ambiente

Tabla 33. Estabilidad analítica de la muestra (2ng/mL)

Tiempo (Días)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.8	-----
7	98.7	1.0
15	69.5	30.2
30	44.2	56.2

$|d| \geq 2\%$, por tanto no es estable.

A temperatura ambiente

Tabla 34. Estabilidad analítica de la muestra (3ng/mL)

Tiempo (Días)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	100.1	-----
7	100.2	1.1
15	70.3	30.0
30	43.1	56.6

$|d| \geq 2\%$, por tanto no es estable.

En las **Tablas 35 a 37**, que pertenecen a condiciones de refrigeración (0-4°C), las muestras evaluadas presentaron estabilidad hasta el día 7, lo cual no cumple con las especificaciones de calidad descritas en la Farmacopea; sin embargo, indican que el principio activo mantiene los parámetros que determinan su calidad durante ese tiempo (Abreau, 2010), ya que a partir del día 15 se observa una degradación significativa de la progesterona, dado que la diferencia absoluta del porcentaje cuantificado con respecto al porcentaje cuantificado inicial es mayor al 2%.

Refrigeración (0-4°C)

Tabla 35. Estabilidad analítica de la muestra, (1ng/mL)

Tiempo (Días)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	100.1	-----
7	100.2	1.0
15	72.3	27.6
30	45.1	54.9

$|d| \geq 2\%$, por tanto no es estable.

Refrigeración (0-4°C)

Tabla 36. Estabilidad analítica de la muestra, (2ng/mL)

Tiempo (Días)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.7	-----
7	98.9	1.0
15	73.1	26.6
30	46.8	53.6

$|d| \geq 2\%$, por tanto no es estable.

Tabla 37. Estabilidad analítica de la muestra, (3ng/mL)

Tiempo (Días)	Promedio %Cuantificado	% Diferencia Relativa con Respecto a Tiempo Cero
0	99.7	-----
7	99.4	1.1
15	73.9	26.7
30	46.4	53.8

$|d| \geq 2\%$, por tanto no es estable.

Cálculo de $|d|$

Ejemplo de cálculo:

Donde y_0 corresponde al promedio de % inicial, n al número de muestras y $y_{1,2,3y 4}$ corresponden a los promedios de cada condición de almacenamiento (horas o días).

$$y_0 = \frac{300.1}{3} = 100.0$$

$$y_1 = \frac{296.0}{3} = 98.6$$

$$y_2 = \frac{296.9}{3} = 98.9$$

$$y_3 = \frac{298.70}{3} = 99.5$$

$$y_4 = \frac{298.46}{3} = 99.4$$

$$|d| = |y_1 - y_0| = |98.6 - 100.0| = 1.4$$

$$|d| = |y_2 - y_0| = |98.9 - 100.0| = 1.1$$

$$|d| = |y_3 - y_0| = |99.5 - 100.0| = 0.5$$

$$|d| = |y_4 - y_0| = |99.4 - 100.0| = 0.6$$

Las pruebas de estabilidad analítica de la muestra se realizaron en base a lo descrito en la Guía de Validación del Colegio de QFB's. Las temperaturas elegidas para evaluar nuestro analito de interés, se seleccionaron en base a la estabilidad del principio activo (progesterona), pues se ha observado que la estabilidad de la progesterona para una prueba de validación de un método analítico, se mantiene en condiciones de refrigeración hasta 8°C, y a temperatura ambiente hasta los 25°C

a ciclos normales de luz y oscuridad (Aranda, 2011). En nuestra prueba, se eligió la temperatura de refrigeración de 4°C, en base al equipo de almacenamiento con el que se cuenta en el laboratorio y a que se pretendía observar el comportamiento de la progesterona a la mitad del intervalo donde se sabe, es estable. Si bien, la estabilidad de nuestro analito se mantuvo hasta las 96 horas bajo condiciones de refrigeración 4°C y a temperatura ambiente, se esperaba que la estabilidad perdurara por más tiempo, debido a los otros compuestos que conforman el gel, sin embargo, se mostró que estos no influyen en la mantención de la estabilidad de la progesterona.

De acuerdo a la Guía de Validación del Colegio de QFB's se realizaron las pruebas respectivas para la validación del sistema y método analítico a evaluar, donde en cada una de ellas se cumplieron con los criterios de aceptación y por lo tanto, el método está validado. Sin embargo es importante mencionar que en el caso de la prueba de estabilidad, la progesterona en condiciones de temperatura ambiente y refrigeración permanece estable durante un periodo máximo de 7 días; dado que a partir del día 15, se observa una degradación y/o pérdida significativa en ambas condiciones, por lo que será necesario realizar la experimentación correspondiente en la primera semana de su preparación.

6.3 Obtención y tratamiento de las muestras de fluidos biológicos bovinos

Siguiendo los pasos indicados en los **Diagramas 2 y 3**, se realizó el tratamiento respectivo de las muestras para inyectarlas al equipo HPLC y obtener las respuestas (áreas) de cada una. En el caso de algunas muestras, fue necesario hacerlas pasar por el mezclador Vórtex por más de un minuto, debido a que la mezcla con el diclorometano no se llevaba a cabo. Como se observa en la **Imagen 6** solo la muestra que posee un color blanquecino, es la que presenta un buen mezclado, las demás debieron de mezclarse por un tiempo mayor.



Imagen 6.
Obtención y extracción de Progesterona en muestras de sangre de bovino

6.4 Evaluación del implante de formación in-situ en un sistema in-vivo

- Muestras en sangre

Una vez preparadas las muestras para ser inyectadas al equipo HPLC, se procedió a obtener el área absoluta y su respuesta correspondiente en 242 nm. Para que después con el tratamiento matemático, se obtuvieran los valores mostrados a continuación:

Tabla 38. Lote B (CIDR)

Muestra	[C] ng/mL
B1	3.36
B2	6.03
B3	3.63
B4	4.22
B5	2.43
B6	1.07
B10	1.06

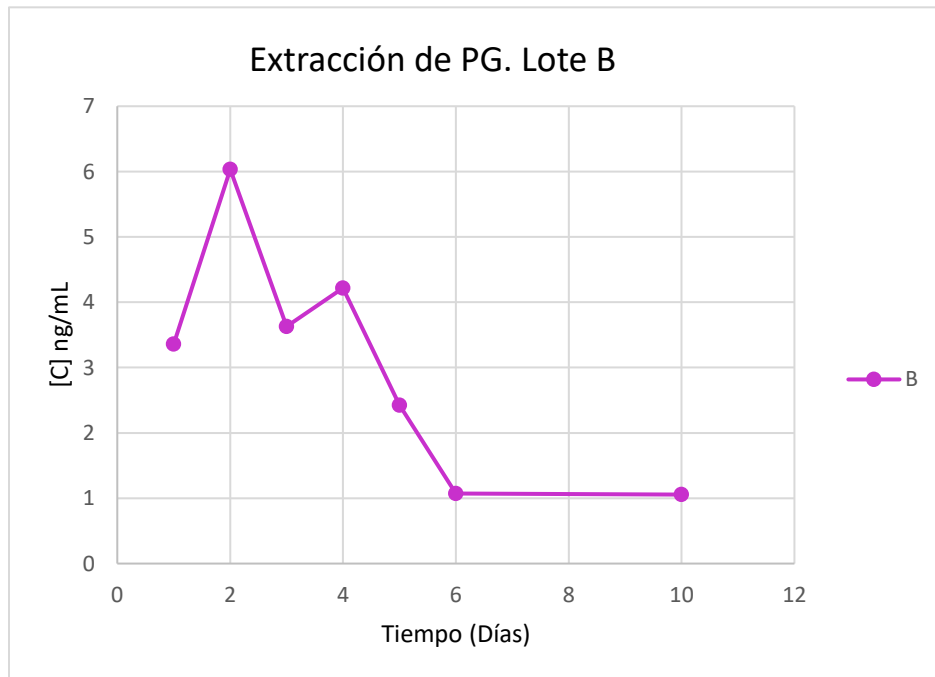


Figura 30. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote B

Tabla 39. Lote PN (Progesterona comercial)

Muestra	[C] ng/mL
PN/0	0.61
PN/1	1.04
PN/2	0.44
PN/4	0.53
PN/10	0.71
PN/24	1.63

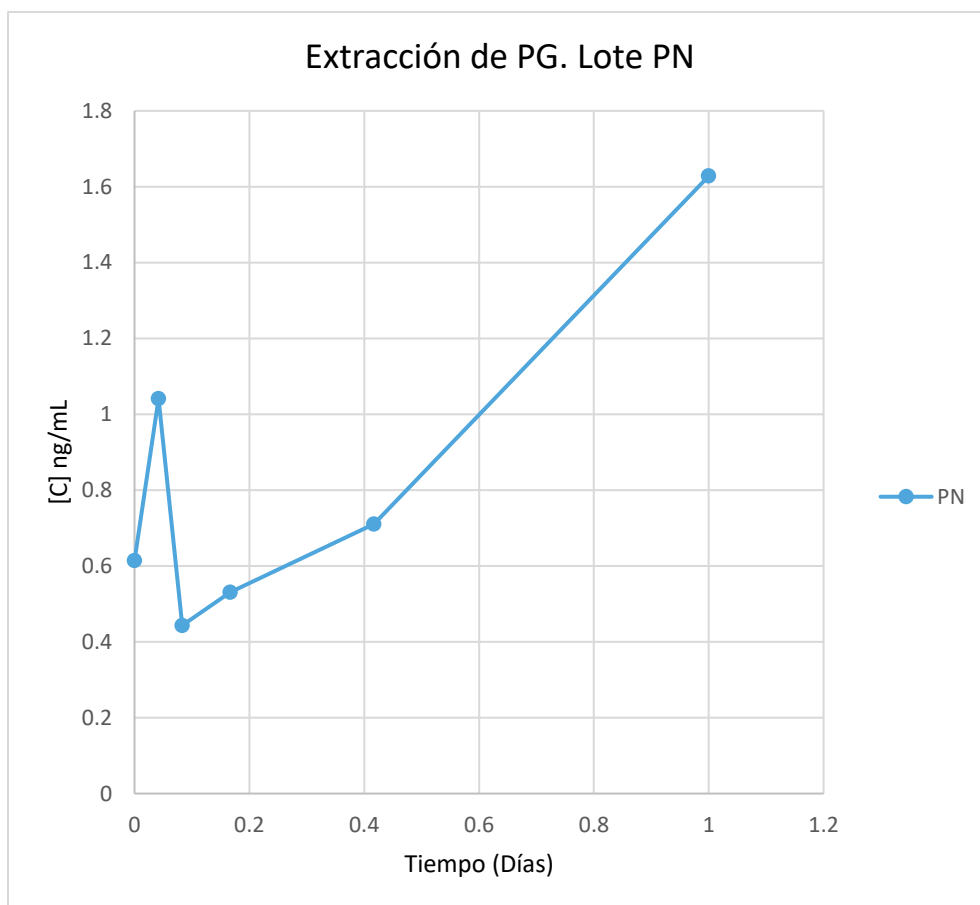


Figura 31. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote PN

Tabla 40. Lote N (Implante de interés)

Muestra	[C] ng/mL
N-0	0.07
N-1	0.17
N-2	0.12
N-3	0.13
N-4	19.34
N-5	4.20
N-6	0.47
N-7	4.24
N-8	4.28
N-9	3.06
N-10	0.08
N-11	0.12
N-12	0.14
N-13	0.11
N-14	0.28
N-15	0.18
N-16	0.29

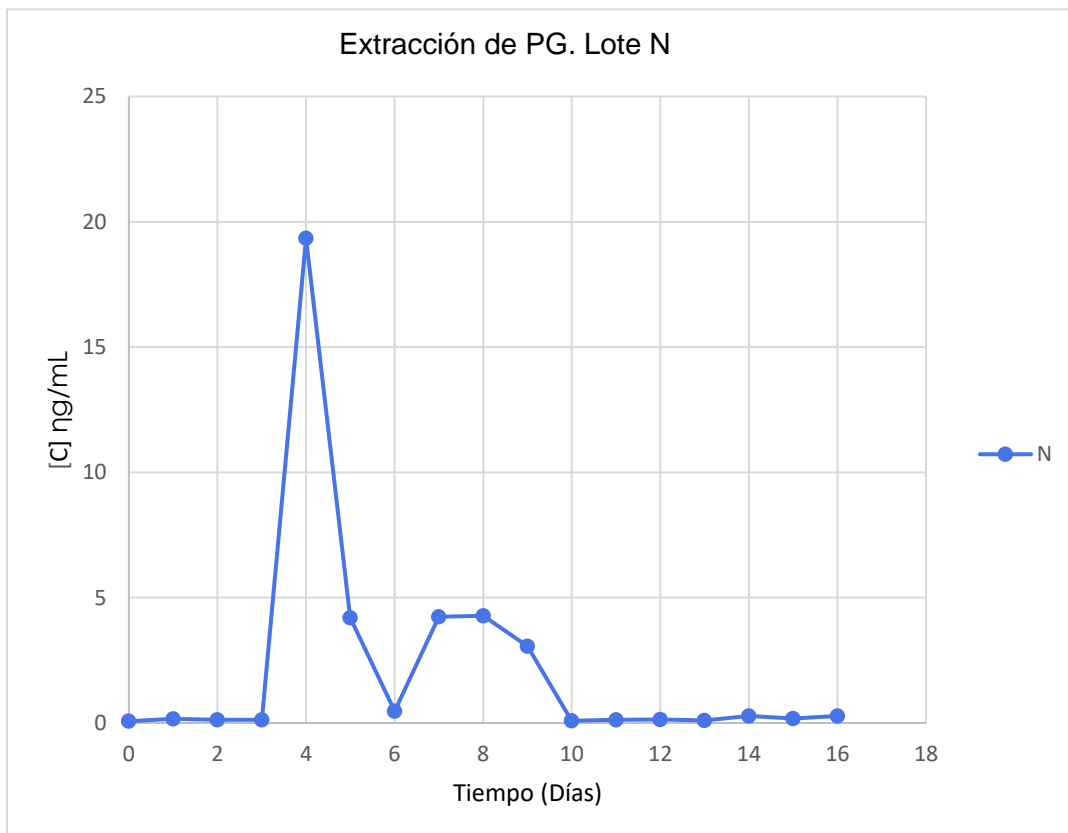


Figura 32. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote N

Tabla 41. Lote N/2 (Implante de interés con 50% de polímero)

Muestra	[C] ng/mL
N/2 0H	0.77
N/2 0.10H	0.43
N/2 0.20 H	0.54
N/2 1H	0.47
N/2 2H	0.48
N/2 3H	1.56
N/2 4H	0.42
N/2 5H	0.24
N/2 6H	0.24
N/2 7H	0.90
N/2 8 H	0.92
N/2 9 H	0.81

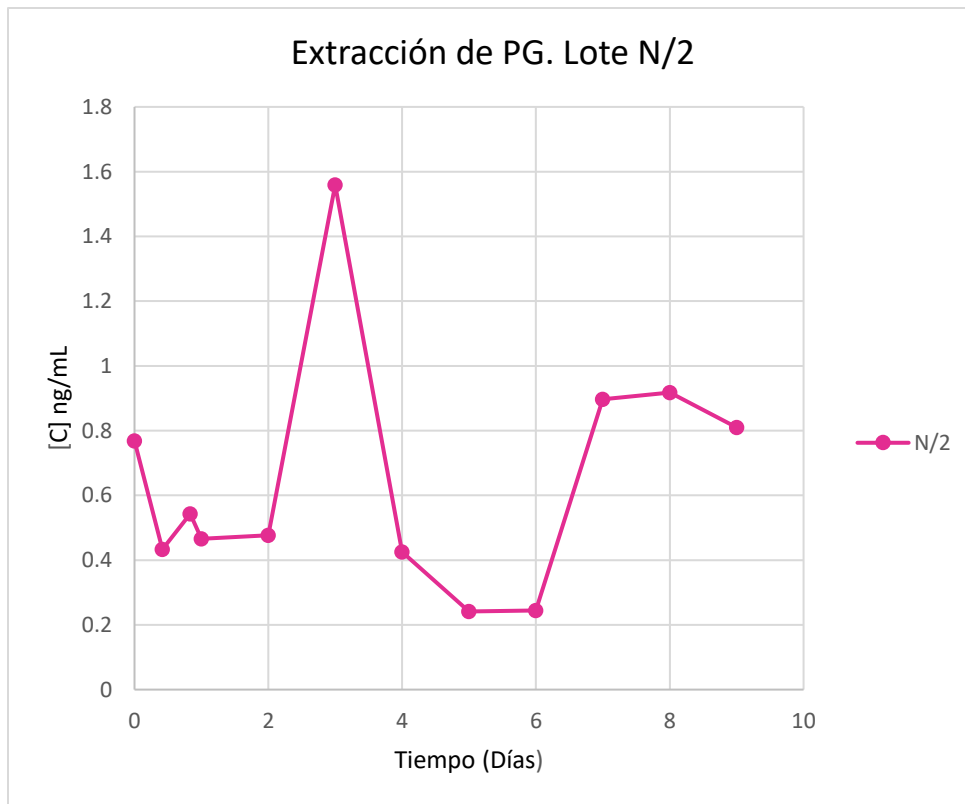


Figura 33. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote N/2

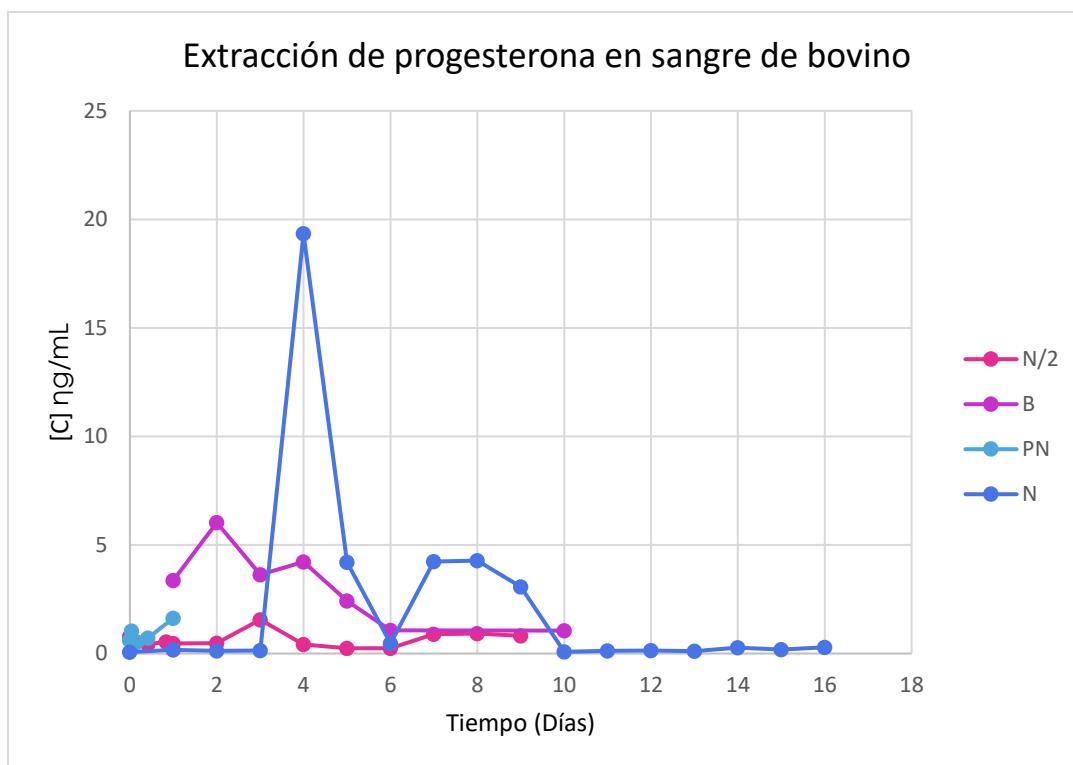


Figura 34. Gráfica de Extracción de progesterona en sangre de bovino

Como se observa en la **Figura 34**, las muestras analizadas de los lotes evaluados presentan un comportamiento similar, ya que entre los días 2 a 4 se presentaron los niveles más altos de cuantificación de Progesterona, mientras que a partir del día 5 hay una disminución para después mantener una concentración sostenida hasta llegar al día 10, donde a partir de ese momento hay un decremento hasta llegar a niveles mínimos, lo que indica que el fármaco ha sido totalmente eliminado de la sangre del animal. El lote N (**Figura 32**), que corresponde a nuestro implante de interés, presentó las concentraciones de Progesterona más altas, lo cual es un buen indicio de que el implante de formación *in-situ* se comporta de acuerdo a lo esperado estando en un ambiente *in-vivo*.

Por otro lado, N/2 (**Figura 33**) corresponde también al implante de interés pero con una reducción del polímero del 50% de la formulación original, puesto que las vacas implantadas con el lote N presentaron irritación en la zona de aplicación. Como puede observarse, las concentraciones de Progesterona son significativamente diferentes a las del lote N, lo que demuestra que el polímero utilizado es clave para el buen funcionamiento del implante.

Lo antes descrito, confirma que tanto el comportamiento del implante evaluado, así como el polímero son adecuados ya que al compararlo con el lote PN (**Figura 31**), correspondiente a Progesterona comercial, ésta no consigue estar si quiera 24 horas en torrente sanguíneo, demostrando que la eliminación del fármaco es rápida y requiere el uso por ejemplo, de un polímero, para alargar su tiempo de vida media

dentro del organismo. Por último al compararlo con el Lote B (**Figura 30**) correspondiente al CIDR, que es uno de los métodos más utilizados en el mercado, se observa que las concentraciones del Lote N son mayores, y que la actividad y comportamiento entre ambos es similar, lo cual también es un buen indicio de que nuestro implante funciona adecuadamente en condiciones *in-vivo*.

- Muestras en leche

Tabla 42. Lote N

Muestra	[C] ng/mL
N1	165.31
N6	676.23
N7	69.94
N8	97.17

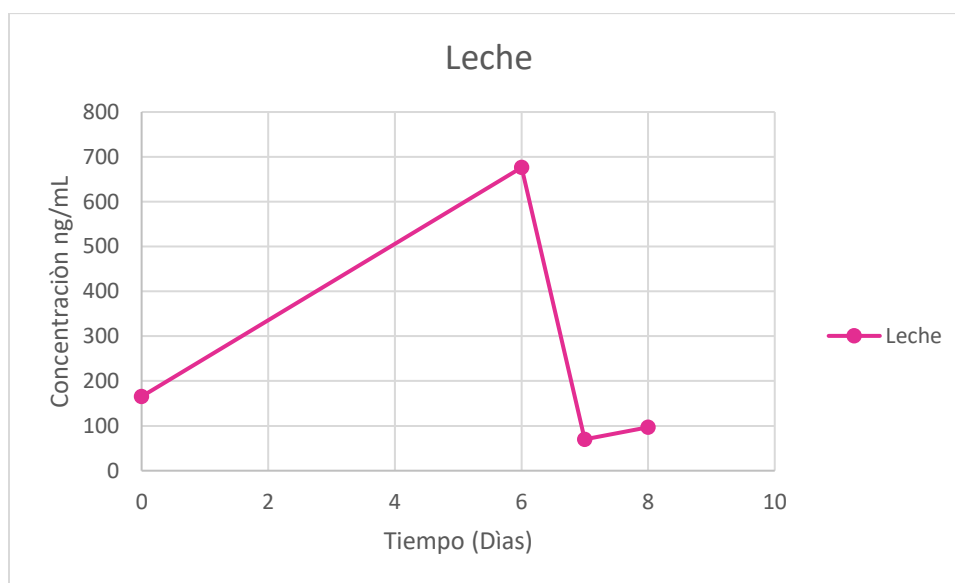


Figura 35. Gráfica de extracción de progesterona. Lote N.

Finalmente se analizaron muestras extraídas de leche de bovino (**Figura 35**) donde se obtuvieron niveles altos de Progesterona derivados del implante de formación *in-situ* de interés (Lote N). Si bien no se analizaron otros lotes bajo estas condiciones para poder ser comparados, es posible que en su mayoría, la Progesterona del implante, es excretada por esta vía.

6.5 Comparación del implante de formación *in-situ* con respecto a los productos comerciales.

Una vez terminada la evaluación del implante de formación *in-situ*, se observa que cumple primeramente con las pruebas de calidad requeridas para este tipo de sistemas, por lo que es posible continuar con la etapa de administración a animales (*in-vivo*) y evaluar su comportamiento en dicho medio, apoyándonos en un desarrollo y validación de un método analítico adecuado a las características y necesidades de nuestro sistema.

Con los resultados obtenidos, se observa que el implante de interés tiene un comportamiento similar a los productos comerciales en condiciones *in-vivo* y además presenta concentraciones mayores de Progesterona en sangre y por mayor tiempo, lo que indica a su vez un tiempo de vida media mayor a la presentada por los productos ofrecidos en el mercado. Lo cual, representa una ventaja importante sobre los demás sistemas donde los niveles de la hormona no son suficientes para que el fármaco sea capaz de realizar su función de manera adecuada. Mientras que, por otro lado, este tipo de implantes, asegura la administración del medicamento; ya que por ejemplo, en el caso del CIDR es fácil que el propio animal se retire el sistema y por tanto, se pierda su función.

A su vez, el implante evaluado presenta las siguientes características: aplicación indolora, fácil y sencilla para el animal; así como una mejora en la uniformidad de las concentraciones plasmáticas terapéuticas, reducción de efectos tóxicos y reducción de reacciones adversas gracias a su composición; facilita el seguimiento terapéutico, debido a que es más sencillo en comparación a otros tratamientos en el mercado y mejora el uso racional de medicamentos así como de terapia debido al tipo de sistema que representa. Además, presenta una disminución de los costos diarios del tratamiento, en comparación con los productos existentes en el mercado.

Lo anterior, muestra que el implante evaluado podría significar otra opción con grandes ventajas para la industria ganadera al ser comparado con los sistemas que existen hoy en día en el mercado. Sin embargo, es necesario seguir realizando evaluaciones a mayor escala y con un mayor número de animales, para observar y asegurar que su comportamiento sea similar, así como los resultados generados en una población mayor.

7. Conclusiones

- Se fabricaron geles de PG para la obtención de implantes de formación *in-situ* con la técnica de dispersión sólida, que mejoran las características de la formulación descrita en la patente MX/a/2015/007665.
- Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas del gel, obteniendo los siguientes resultados: pH 5.1, fácil de inyectar para los calibres de aguja 16 y 18G respectivamente, comportamiento pseudoplástico de acuerdo a la reología obtenida y característica de este tipo de formas farmacéuticas; así como una velocidad de intercambio entre disolventes que aproxima un tiempo de formación del implante a 61.70 min, donde el gel obtenido es sólido, opaco, sin sedimento de fármaco y textura lisa. Los resultados obtenidos permitieron su administración en un organismo vivo, en este caso rumiantes.
- Se desarrolló un método analítico que permite realizar la cuantificación de progesterona en fluidos biológicos bovinos, para la caracterización del implante de formación *in-situ* de interés, utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) acoplado a UV-VIS.
- Se validó el método analítico desarrollado, de acuerdo a lo establecido en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Donde:
 - ✓ El sistema es lineal, en los intervalos de 0.5-3 ng/mL para la Progesterona.
 - ✓ El sistema es preciso, con un coeficiente de variación de respuesta no mayor al 2%.
 - ✓ El sistema tiene adecuabilidad, pues presenta un coeficiente de variación de respuesta no mayor al 2%.
 - ✓ El método es lineal, en los intervalos de 1-3 ng/mL para la Progesterona.
 - ✓ El método es preciso, con un coeficiente de variación de respuesta no mayor al 2%.
 - ✓ El método es exacto al demostrar que el porcentaje cuantificado en cada réplica de los niveles de concentración probados se encuentran entre el 98 y 102% en el intervalo de cuantificación de 1-3 ng/mL para la Progesterona.
 - ✓ El método es repetible al presentar un coeficiente de variación global no mayor al 2%, en el intervalo de cuantificación de 1-3 ng/mL para la Progesterona.
 - ✓ Las muestras conteniendo Progesterona al ser almacenadas en refrigeración (0-4°C) o temperatura ambiente (23°C) son estables hasta 96 horas.

- Se logró la obtención y tratamiento correspondiente de las muestras de fluidos biológicos de bovino (sangre y leche) para la cuantificación de progesterona (ng/mL), una vez desarrollado y validado el método analítico de cuantificación.
- Se evaluó el comportamiento del implante de formación *in-situ* en condiciones *in-vivo* frente a los productos que ofrece el mercado actual, demostrando que las concentraciones plasmáticas y comportamiento son similares a los productos que ya están a la venta.
- Al comparar las concentraciones de progesterona obtenida de los productos comerciales, respecto a la cantidad de progesterona liberada por los implantes de formación *in-situ* de interés, se demostró que las concentraciones plasmáticas, así como su comportamiento *in-vivo* es similar a los productos comerciales.

8. Referencias

1. Abreau, M., García, M., Martínez, L., Muñoz, A., (2010). *Validación del método analítico aplicable al estudio de estabilidad de risperidona solución oral 1 mg/mL*. Revista Cubana de Farmacia., Vol.44, n. 3.
2. Acerbi, R (2009). *Apropiada Aplicación de Inyectables*. Sitio Argentino de Producción Animal. [online] Available at: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/sanidad_en_general/10-aplicacion_inyectables.pdf [Accessed 12 Sep. 2018].
3. Adams, E., Coomans, D., Smeyers-Verbeke, J. and Massart, D (2002). *Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles*. International Journal of Pharmaceutics, 240 (1-2), pp. 37-53.
4. Al Jasem, Y., Khan, M., Taha, A. and Thiemann, T. (2014). *Preparation of steroidal hormones with an emphasis on transformations of phytosterols and cholesterol a review*. Mediterranean Journal of Chemistry, 3(2), pp. 796-830.
5. Allahham, A., Mainwaring, D., Stewart, P. and Marriott, J. (2004). *Development and application of a micro-capillary rheometer for in-vitro evaluation of parenteral injectability*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 56(6), pp. 709-716.
6. Aranda, J. [2011]. *Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar muestras de 17- β estradiol y progesterona provenientes de perfiles de disolución*. Facultad de Química. UNAM.
7. BASF (2009). *Kollicoat MAE grades*. Technical Information. p.3.
8. Bernad, M. (2017). *Formas Farmacéuticas de liberación modificada*. Facultad de Química, UNAM.
9. Bernad, M., Lugo Espinosa, A. and Urbiola Verdejo, G. (2017). *COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE USO VETERINARIO BASADA EN UNA SUSPENSIÓN DE PROGESTERONA EN UN SISTEMA POLIMÉRICO, QUE TIENE PROPIEDADES DE GELIFICACIÓN INSITU*. MX/a/2015/007665.
10. Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M., Hoemann, C., Leroux, J., Atkinson, B., Binette, F. and Selmani, A. (2000). *Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ*. Biomaterials, 21(21), pp. 2155-2161.
11. Cilurzo, F., Selmin, F., Minghetti, P., Adami, M., Bertoni, E., Lauria, S. and Montanari, L. (2011). *Injectability Evaluation: An Open Issue*. AAPS PharmSciTech, 12(2), pp. 604-609.
12. Colazo, M., y otros. (2007). *El uso de tratamientos hormonales para sincronizar el celo y la ovulación en vaquillonas*. Ciencia Veterinaria, 1(9).
13. Costa, E., Arancibia, A. and Aiache, J. (2004). *Sistemas Matriciales*. Acta Farm. Bonaerense, 23(2), pp. 259-265.
14. Costa, F. and Sousa Lobo, J. (2001). *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 13(2), pp. 123-133.

15. Crescenzi, V., Dentini, M. and Coviello, T. (1990). *Solution and Gelling Properties of Microbial Polysaccharides of Industrial Interest: The Case of Gellan*. *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, pp. 277-284.
16. Cunningham, N. (2018). *Rheology & Viscosity Testing & Profiling Techniques & Methods*. [online] Rheologyschool.com. Available at: <http://www.rheologyschool.com/testing/testing-examples> [Accessed 18 Oct 2018].
17. Cutaia, L., Tríbulo, R. and Taurus, B. (2015). *TRATAMIENTOS HORMONALES PARA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL A TIEMPO FIJO EN BOVINOS PARA CARNE: ALGUNAS EXPERIENCIAS REALIZADAS EN ARGENTINA*. Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), 4(14), pp. 6-14.
18. Dasha, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R., Chiellini, E., (2011). Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *ELSEVIER, Progress in Polymer Science.*, s.1., pp. 981-1014.
19. Dickson, M. and Sharpe, D. (1985). *Continuous subcutaneous tissue pH measurement as monitor of blood flow in skin flaps: an experimental study*. *British Journal of Plastic Surgery*, 38(1), pp. 39-42.
20. Drugbank.ca. (2018). *Progesterone*-DurgBank. [online] Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00396> [Accessed 21 Oct. 2018].
21. Fda.gov. (2018). *The Cattle Estrous Cycle and FDA-Approved Animal Drugs to Control and Synchronize Estrus- A Guide for Producers*. [online] Available at: <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/ProductSafetyInformation/ucm536713.htm> [Accessed 14 Sep. 2018].
22. Dumitriu, S., Vidal, P. and Chornet, E. (1996). *Hydrogels based on polysaccharides. Polysaccharides in medical applications*. New York: Marcel Dekker Inc, 28(12), pp. 125-242.
23. *Estabilidad de la Progesterona* (2018) [online] Available at: <http://www.siplaslab.com/progesterona> [Accessed 2 Sep. 2018].
24. Fideicomisos Instituidos en relación con la agricultura (2017). *Panorama Agroalimentario*. México, pp.2, 14,18.
25. González, K. (2018). *El Ciclo Estral de la Vaca*. [online] Available at: <https://zoovetespasion.com/ganaderia/reproduccion-bovina/el-ciclo-estral-de-la-vaca/> [Accessed 15 Dic. 2018].
26. *Guía de validación de métodos analíticos*. (2002). México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
27. Haan, P. and Lerk, C. (1984). *Oral controlled release dosage forms*. A review. *Pharmaceutisch Weekblad*, 6(2), pp. 57-67.
28. Hatefi, A. and Amsden, B. (2002). *Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems*. *Journal of Controlled Release*, 80(1-3), pp. 9-28.

29. Ismail, F., Napaporn, J., Hughes, J. and Brazeau, G. (2000). *In Situ Gel Formulations for Gene Delivery: Release and Myotoxicity Studies*. *Pharmaceutical Development and Technology*, 5(3), pp. 391-397.
30. Jensen, S., Jensen, H., Møller, E., Cornett, C., Siepmann, F., Siepmann, J. and Østergaard, J. (2016). *In vitro release studies of insulin from lipid implants in solution and in a hydrogel matrix mimicking the subcutis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, pp. 103-112.
31. Kato, Y., Onishi, H., Machida, Y., (2003). *Current Pharmaceutical Biotechnology*. Vol. 4, p.303.
32. Kawasaki, N., Ohkura, R., Miyazaki, S., Uno, Y., Sugimoto, S. and Attwood, D. (1999). *Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 181(2), pp. 227-234.
33. Lugo, K., (2014). *Caracterización Reológica de Geles de Liberación Modificada y su Cuantificación en suero*. Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", UNAM.
34. MERCK. (2019). *Polyethylene Glycol*. [online] Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/material-science/polyethylene-glycol-selection-guide.html>. [Accessed 13 Sep. 2018].
35. Na, Li., Xiao, Yang., Li, Nian., Zhibing, Wang., Lei, Lei., (2015). *Determination of steroid hormones in milk using aqueous two-phase extraction coupled to liquid chromatography*. *Analytical Methods*. ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 7, 2514.
36. Nikghalb, L., Singh, G. and Singh, G., (2012). *Solid Dispersion: Methods and Polymers to increase the solubility of poorly soluble drugs*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. Vol. 2 (10). pp. 170-175.
37. Nirmal, H., Bakliwal, S. and Pawar, S. (2010). *In-Situ gel: New trends in Contolled and Sustained Drug Delivery System*. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), pp. 1398-1408.
38. Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M. and Macheras, P. (2006). *On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms*. *International Journal of Pharmaceutics*, 309 (1-2), pp. 44-50.
39. Phaechamud, T., Jantadee, T., Mahadlek, J., Charoensuksai, P. and Pichayakorn, W. (2016). *Characterization of Antimicrobial Agent Loaded Eudragit RS Solvent Exchange-Induced In Situ Forming Gels for Periodontitis Treatment*. *AAPS PharmSciTech*, 18(2), pp. 494-508.
40. Pérez, J. (2005). *CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA*. Badalona: ContLabClin, SEQC, Vol. 8, pp. 49-62.
41. PISA AGROPECUARIA. (2018). *Salud animal, bienestar humano®*. [online] Available at: <https://www.ganaderia.com/micrositio/Pisa-Agropecuaria/Qu%C3%A9-son%2C-c%C3%B3mo-funcionan-y-qu%C3%A9-detalles-debes-cuidar-cuando-utilizas-implantes-anab%C3%B3licos-esteroides-en-bovinos-en-engorda> [Accessed 17 Dic. 2018].

42. Plinio, A., Sandoval, H., Baena, Y., et, al., *Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosa*. Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. Vol. 37 (2), pp. 105-121.
43. Rajgor, N., Bhaskar, V. and Patel, M. (2001). *Implantable drug delivery systems: An overview*. Systematic Reviews in Pharmacy, 2(2), p.91.
44. Rivera, C.,(2019). *Métodos Analíticos de Separación*. Facultad de Química, UNAM.
45. Rojas, O., Moya, M., Sibaja, M., Ruepert, C., Vega-Baudrit, M., (2007) *Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (Pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas*. Revista iberoamericana de Polímeros, 3, vol. 5, p. 133.
46. Rungseevijitprapa, W. and Bodmeier, R. (2009). *Injectability of biodegradable in situ forming microparticle systems (ISM)*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 36(4-5), pp. 524-531.
47. SÁNCHEZ, B., SIBAJA, A., VEGA-BAUDRIT, M., MADRIGAL, J.,(2007). *Síntesis y caracterización de hidrogeles de quitosano obtenido a partir del camarón langostino (Pleuroncodes planipes) con potenciales aplicaciones biomédicas*. Revista iberoamericana de Polímeros, 4, vol.8, pp. 241-267.
48. Sastre, R. (2004). *Biomateriales*. Italia: Litográfica Faenza.
49. Séchoy, O., Tissié, G., Sébastian, C., Maurin, F., Driot, J. and Trinquand, C. (2000). *A new long acting ophthalmic formulation of Carteolol containing alginic acid*. International Journal of Pharmaceutics, 207 (1-2), pp. 109-116.
50. Singh, A. and Van den Mooter, G. (2016). *Spray drying formulation of amorphous solid dispersions*. Advanced Drug Delivery Reviews, 100, pp. 27-50.
51. Solanki, H., Thakkar, J. and Jani, G. (2010). *RECENT ADVANCES IN IMPLANTABLE DRUG DELIVERY*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 4(3), pp. 168-177.
52. Spectrum Laboratory Products (2013). *Progesterone*. Material Safety Data Sheet. New Brunswick, NJ: Sonia Owen.
53. TA Instruments (1964). *Understanding Rheology of Structured Fluids*. A. Frank.
54. Tabilo-Munizaga, G. and Barbosa-Cánovas, G. (2005). *Rheology for the food industry*. Journal of Food Engineering, 67 (1-2), pp. 147-156.
55. Taylor, L. and Zografis, G. (1997). *Pharmaceutical Research*, 14(2), pp. 1691-1698.
56. Tiburcio, D. (2018). *Desarrollo y evaluación de un gel de formación in-situ para la administración de progesterona para el control de la fertilidad en rumiantes*. Facultad de Química, UNAM.
57. Troxel, T. (1982). *The Bovine Estrous Cycle Dynamics and Control*. Illinois, pp.3-7.

58. Troxel, T. (2013). *Synchronization of estrus in cattle*. [Little Rock, Ark.]: Cooperative Extension Service, University of Arkansas.
59. Ummadi, S., Shrivani, B., Rao, N., Reddy, M. and Nayak, B. (2013). *Overview on Controlled Release Dosage Form*. International Journal of Pharma Sciences, 3(4), pp. 258-269.
60. Volker, BÜHLER. (2007). *Kollicoat grades. Functional polymers for the pharmaceutical industry*. Alemania: BASF. The chemical company. pp. 69-72
61. Wolfgang, K., ed. (1995). *Veterinary reproductive ultrasonography*. 1a ed., Mosby-Wolfe. pp 95-101.
62. Yagües, V. (2008). *Cromatografía de líquidos de alta resolución* [online]. Available at: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf?fbclid=IwAR3hNAMt3hzMI9lgtHGCS3hgm_03R-m7dxSZWV4ov2EAuCkTQBFBAAtOcZl8 [Accessed 02 Ene. 2018].

POLIETILENGLICOL

El polietilenglicol (PEG) es un polímero hidrofílico. Se puede sintetizar fácilmente mediante la polimerización aniónica de apertura de anillo de óxido de etileno, en un rango amplio de pesos moleculares y una gran variedad de grupos terminales. Los PEG se pueden sintetizar en geometrías lineales, ramificadas, en forma de Y o de brazos múltiples. Los PEG pueden activarse mediante la sustitución del grupo terminal hidroxilo, con una variedad de grupos terminales funcionales reactivos que permiten la reticulación y la química de conjugación. Cuando se reticula en redes, el PEG puede tener un alto contenido de agua, formando "hidrogeles". La formación del hidrogel puede iniciarse mediante reticulación de PEG mediante radiación ionizante o mediante reticulación covalente de macrómeros de PEG con extremos de cadena reactivos (MERCK, 2019).

El PEG es un material adecuado para aplicaciones biológicas porque no desencadena una respuesta inmune.

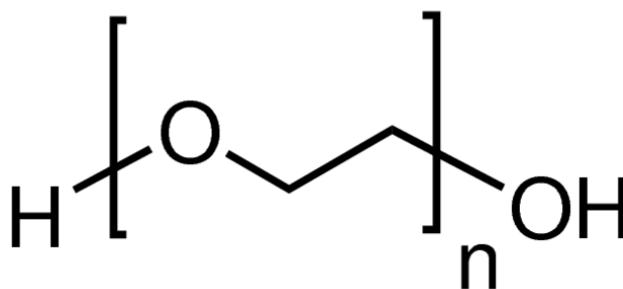


Figura 36. Estructura química general del polímero PEG

Los PEG no son tóxicos, están aprobados por la FDA y generalmente son, no inmunogénicos. Se usan con frecuencia en muchas aplicaciones biomédicas, incluida la bioconjugación, la administración de fármacos, funcionalización de superficies y la ingeniería de tejidos. La bioconjugación con PEG (también conocida como PEGilación) es la conjugación covalente de objetivos farmacológicos tales como péptidos, proteínas u oligonucleótidos con PEG para la optimización de las propiedades farmacocinéticas. En la administración de fármacos, los PEG se pueden usar como conectores para conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) o como un recubrimiento de superficie en nanopartículas para mejorar la administración sistémica de fármacos. Los hidrogeles de PEG son redes poliméricas tridimensionales hinchadas en agua, resistentes a la adhesión de proteínas y a la biodegradación. Los hidrogeles de PEG se producen mediante la reticulación de grupos terminales reactivos de PEG y se usan comúnmente en ingeniería de tejidos y administración de fármacos (MERCK, 2019).

Para elegir el PEG adecuado, es necesario considerar cuatro características generales, de acuerdo a lo descrito en la **Tabla 43**.

Tabla 43. Características generales para la elección adecuada de PEG (MERCK, 2019).

Característica	Descripción
Funcionalidad	<p>Los PEG monofuncionales contienen un único extremo químicamente reactivo y se usan para PEGilación, conjugación de superficie y recubrimiento de nanopartículas.</p> <p>Los PEG que contienen dos extremos reactivos, que pueden tener los mismos grupos reactivos (PEG homobifuncional) o diferentes (PEG heterobifuncional) son útiles para la conjugación y la reticulación de hidrogeles.</p>
Reactividad	<p>Conjugación covalente: los PEG con grupos terminales reactivos, como un éster de N-hidroxisuccinimida, tiol o grupo carboxilo, se pueden conjugar covalentemente a grupos funcionales correspondientes. La química de conjugación elegida determina el sitio de unión y el número de PEG por molécula.</p> <p>La química de clics requiere PEG con grupos reactivos azida o alquino. La química de clic es un método rápido, selectivo y bioortogonal para la conjugación o la formación de hidrogel. Obtenga más información sobre la química del clic.</p> <p>La polimerización y la fotopolimerización se pueden lograr rápidamente utilizando PEG terminados en acrilato en condiciones reactivas leves.</p>
Peso molecular	<p><i>Bioconjugación:</i> los PEG con pesos moleculares ≥ 5 kDa se usan típicamente para la conjugación con moléculas pequeñas, ARNip y péptidos. Los PEG de bajo peso molecular (≤ 5 kDa) se usan a menudo para la PEGilación de proteínas.</p> <p>La conjugación de superficie y la reticulación se pueden completar con PEG que son < 40 kDa</p> <p><i>Formación de hidrogel:</i> el peso molecular del PEG influirá en el tamaño del hidrogel y las propiedades mecánicas. Típicamente, se usan PEG de peso molecular ≥ 5 kDa.</p>
Estructura del polímero	<ul style="list-style-type: none"> -Los PEG lineales se usan comúnmente para PEGilación, bioconjugación y reticulación -Los PEG de brazos múltiples (4, 6, 8 brazos) se pueden reticular en hidrogeles y andamios para la administración de fármacos o ingeniería de tejidos -Los PEG en forma de Y se usan típicamente para PEGilación, ya que la estructura ramificada puede mejorar la estabilidad <i>in vivo</i>.

POLIETILENGLICOL 6000 (PEG 6000)

- *Estructura química y composición*

El polietilenglicol 6000 es un sólido duro, ceroso y no higroscópico. Generalmente se presenta en forma de hojuelas. Es soluble en agua y en disolventes orgánicos. Algunos sinónimos de PEG 6000 son: Pluracol E 6000 y Carbowax 6000. Su fórmula química se presenta como: $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$.

Tabla 44. Información fisicoquímica de PEG 6000 (MERCK, 2019) .

Información fisicoquímica	
Densidad	1.2 g/cm ³ (20 °C)
Punto de inflamabilidad	270 °C
Temperatura de ignición	420 °C
Punto de fusión	58 - 63 °C
Valor de pH	5 - 7 (100 g/l, H ₂ O, 20 °C)
Presión de vapor	<0.01 hPa (20 °C)
Solubilidad	550 g/l

- *Solubilidad y estabilidad.*

El PEG 6000 es soluble en agua (aproximadamente 630mg/ml, 20°C). El PEG 6000 también es soluble en muchos solventes polares como la acetona, alcoholes y solventes clorados. Es insoluble en disolventes no polares como los hidrocarburos.

Las soluciones acuosas de PEG 6000 o realizadas con él, son estables a temperatura ambiente. Los enlaces del PEG 6000 no se hidrolizan bajo estas condiciones. El PEG 6000 se puede disolver en agua tibia a 80-90 ° C sin efectos adversos.

KOLLICOAT GRADO MAE.

Los grados de Kollicoat MAE comprenden dos tipos que difieren en composición y forma de la disponibilidad (Kollicoat MAE 30DP y 100P).

. Kollicoat MAE 30DP es una dispersión acuosa, mientras que Kollicoat 100P es un polvo para la preparación de dispersiones acuosas o soluciones en disolventes orgánicos (Volker, 2007).

- *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 relación 1:1. Es un copolímero aniónico que puede ser neutralizado por bases como el hidróxido de sodio.

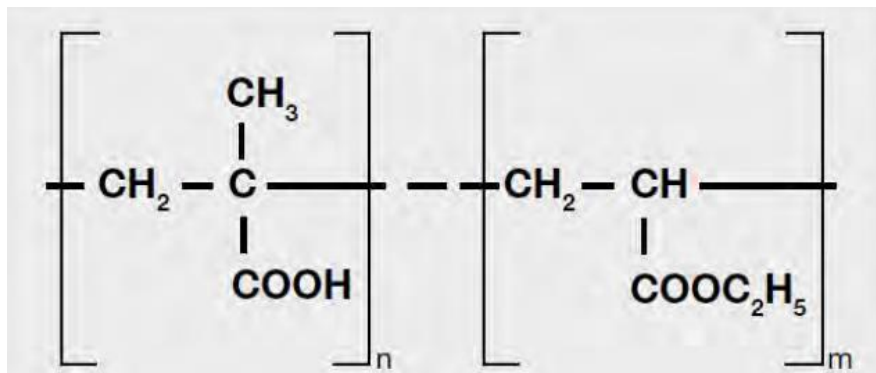


Figura 37. Estructura química del polímero Kollicoat grado MAE

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; lo cual, impide la sedimentación y separación de los copolímeros. A continuación, en la **Tabla 45** se muestra la composición exacta de su composición. En el caso de los componentes grasos de los estabilizadores, son de origen vegetal.

Tabla 45. Composición del Kollicoat MAE 30DP (Volker, 2007).

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

- *Solubilidad, miscibilidad, dispersión.*

Kollicoat MAE 30DP es miscible en agua en cualquier proporción sin perder su aspecto lechoso y blanco. Kollicoat MAE 30DP se disuelve fácilmente en una proporción 1:5 (v/v) en 2-propanol, etanol y acetona. Forma una solución clara o ligeramente opalescente. Cuando se añade primeramente el disolvente

orgánico, se da la formación de un precipitado, sin embargo, este se vuelve a disolver en la adición de más disolvente (Volker, 2007).

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 cercano a 50 μm , la viscosidad de los poloxámeros se puede ver afectada por adición de electrolitos, humectantes, tensoactivos aniónicos, alcoholes o pH bajo.

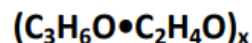
Existen copolímeros formados de tres bloques como los poloxámeros sólidos porosos que tienden a ser ligeramente elásticos. Los geles físicos o reversibles de este tipo, tienen la capacidad de formar, modificar o romper los enlaces responsables de mantener la red polimérica unida; dadas sus propiedades cohesivas y difusivas.

Las soluciones acuosas de un poloxámero son estables cuando se encuentran en presencia de sólidos, bases e iones metálicos.

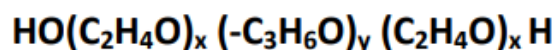
Los poloxámeros son mayormente solubles en agua fría, debido a un incremento en la solvatación y deformación de puentes de hidrógeno a dichas temperaturas. Las soluciones acuosas en un intervalo de concentraciones entre el 20 y 30% p/p poseen la característica de gelación térmica reversa, es decir, a temperaturas entre 4 y 5°C y a esas concentraciones, son soluciones; sin embargo, a temperatura ambiente, se aprecia la formación de un gel. Dicho proceso es reversible al enfriar el gel.

Las moléculas de poloxámeros a bajas temperaturas, son rodeadas por una capa de hidratación, pero cuando la temperatura aumenta, las cadenas hidrofílicas se desolvatan como resultado del rompimiento de los puentes de hidrógeno entre el solvente y las cadenas etilénicas. Dado el proceso de deshidratación, los grupos hidroxilo se vuelven más accesibles, y se piensa que el gel es micelar. Al estar en fase micelar, un líquido, es estable a bajas temperaturas, después se transforma en un arreglo cúbico al incrementarla, para finalmente formar una base de cilindros hexagonales.

- *Estructura condensada*



- *Fórmula general*



- *Forma estructural*

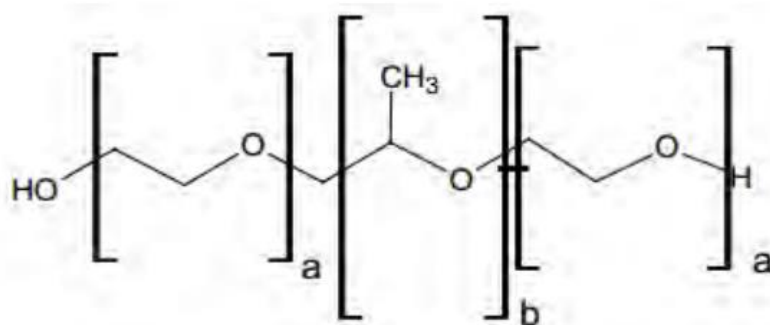


Figura 38. Estructura del poloxámero

- *Usos*

Se emplean 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. A su vez, pueden ser empleados para la formación de geles o en la industria cosmética en los geles colorantes para el cabello.

- *Características*

Este tipo de compuestos tienen la propiedad de ser termorreversos y de gelación inversa, ya que la máxima viscosidad de estos, se da a temperaturas de entre 60 y 75°C.

- *Aspecto*

En general, presenta una forma de microesferas blancas a amarillo ligero con débil olor.

- *Solubilidad*

El poloxámero es soluble en agua, generando una solución opalescente, presenta solubilidad en etanol, insoluble en éter dietílico y ácidos grasos. La solubilidad es selectiva en solventes orgánicos. Cloroformo 40%, acetonitrilo 20% y acetona 2%.

QUITOSANO

La estructura de la quitina, presenta similitudes con las de la celulosa. La diferencia radica en el segundo carbono de sus cadenas, pues éste, presenta un grupo acetamida en la quitina y un grupo hidroxilo en la celulosa (Kato, 2003). La quitina es un polímero de cadena lineal formado por poli[β-(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-Dglucopiranos], con un peso molecular alto (Sastre, 2004).

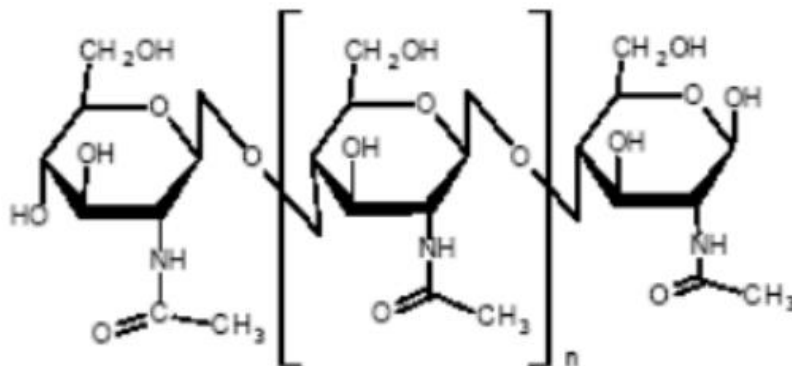


Figura 39. Estructura molecular de la quitina

Mientras que, el quitosano, es el producto parcialmente desacetilado de la quitina. Es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades β -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y β -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (Nacetyl-D-glucosamina (Sánchez, 2007). El quitosano presenta una configuración helicoidal tridimensional estabilizada por medio de enlaces de hidrógeno entre los monómeros que lo conforman (Rojas, 2007).

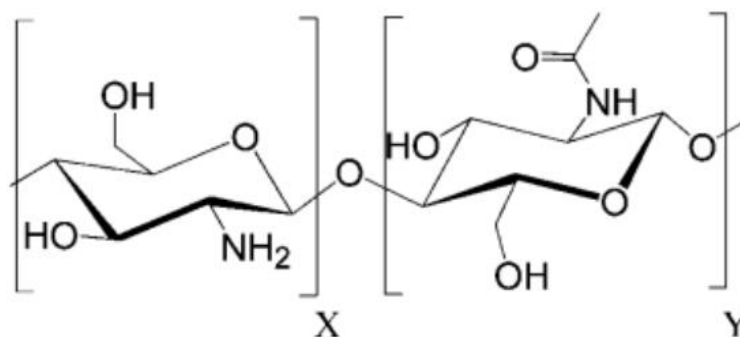


Figura 40. Estructura molecular del quitosano

Dada la capacidad del quitosano por formar películas o soportes, ha podido ser utilizado en ingeniería de tejidos y liberación de fármacos, debido a sus propiedades mecánicas y a su biodegradación. Estos soportes pueden mantener, reforzar e incluso organizar la regeneración tisular. Como matriz, puede ser utilizado para la liberación de materiales bioactivos o influenciar de manera directa el crecimiento celular.

Las condiciones usadas para la desacetilación determinan el peso molecular del polímero y el grado de acetilación (DD). Los grupos amino primarios en la molécula que son reactivos, proporcionan sitios para fijación de grupo lateral, empleando condiciones de reacción suaves. Además, el quitosano presenta características generales como: catiónico, hemostático e insoluble a pH alto. Se puede invertir por

sulfatación de la amina que hace a la molécula aniónica y soluble en agua y posee propiedades anticoagulantes. Los grupos laterales unidos en quitosano, proporcionan materiales versátiles con funcionalidad específica, alterar las propiedades biológicas o modificar las propiedades físicas (Sánchez, 2007).

- *Relación de sus propiedades y estructura*

El quitosano, presenta su principal diferencia estructural en la proporción relativa de N-acetyl-D-glucosamina y residuos de D-glucosamina, que proviene de los cambios estructurales. Dicha diferencia da lugar a varios lotes de quitosano que se distinguen sobre la base de su DD y su peso molecular. El DD y el peso molecular afectan directamente las propiedades químicas y biológicas del polímero (Dasha, 2011).

Tabla 46. *Relación entre parámetros estructurales y propiedades*

Propiedad	Característica estructural
Solubilidad	DD↑
Cristalinidad	DD↓
Biodegradabilidad	DD↓, peso molecular↓
Viscosidad	DD↑
Biocompatibilidad	DD↑
Mucoadesión 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, dada la cuaternización de los grupos amino que tienen 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, haciendo que el quitosano sea un polielectrolito catiónico soluble en agua.

Por otro lado, cuando el pH se encuentra arriba de 6.0, las aminas del quitosano se desprotonan y el polímero pierde su carga. Por lo tanto se vuelve insoluble. La transición soluble en insoluble se produce en su valor de pKa alrededor de pH entre 6.0 y 6.5.

El valor de pKa depende en gran medida del grado de N-deacetilación, la solubilidad del quitosano es dependiente del DD y el método de desacetilación utilizado. Además de DD, el peso molecular es también un parámetro que afecta significativamente la solubilidad y otras propiedades. La viscosidad de la solución del quitosano aumenta con un aumento en su concentración, con la disminución de la temperatura y con el aumento del DD (Dasha, 2011).

ANEXO 2. Índice de Figuras

Figura 1. Estructura de la Progesterona	10
Figura 2. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica inerte	13
Figura 3. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica hidrofílica	14
Figura 4. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica lipofílica	14
Figura 5. Liberación de un principio activo en sistemas de tipo reservorio y matricial	16
Figura 6. Proceso de fabricación de un gel para la obtención de un implante de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	22
Figura 7. Inyectabilidad de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	24
Figura 8. Determinación del pH de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	25
Figura 9. Formación de implantes de formación in-situ de progesterona con el método de dispersión sólida	26
Figura 10. Determinación de velocidad de intercambio entre disolventes de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	27
Figura 11. Determinación de la reología de geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	29
Figura 12. Diagrama de proceso para evaluar la Precisión del Sistema del Método Analítico	39
Figura 13. Diagrama de proceso para evaluar la Adecuabilidad del Sistema del Método Analítico	40
Figura 14. Diagrama de proceso para evaluar la Linealidad del Sistema del Método Analítico	41
Figura 15. Diagrama de proceso para evaluar la Exactitud y Repetibilidad del Método Analítico	42
Figura 16. Diagrama de proceso para evaluar la Linealidad del Sistema Analítico	43
Figura 17. Diagrama de proceso para evaluar la Precisión del Método Analítico	44
Figura 18. Diagrama de proceso para evaluar la Estabilidad Analítica de la muestra	45
Figura 19. Estudio reológico de PEG 6000 disuelto en una mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla oscilatoria	67
Figura 20. Estudio reológico de Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla oscilatoria	68
Figura 21. Estudio reológico de PEG 6000 con Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla oscilatoria	68
Figura 22. Estudio reológico de PEG 6000 con Progesterona y Kollicoat dispersada en una mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla oscilatoria	69
Figura 23. Estudio reológico de PEG 6000 disuelto en mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla simple	69
Figura 24. Estudio reológico de Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla simple	70
Figura 25. Estudio reológico de PEG 6000 con Kollicoat MAE 30 DP en mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla simple	70
Figura 26. Estudio reológico de PEG 6000 con Progesterona y Kollicoat en mezcla 3:1 de EtOH:H ₂ O. Flujo de cizalla simple	71
Figura 27. Curva Estándar de Progesterona	74

Figura 28. Gráfica de Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo 0.5-3 ng/mL)	77
Figura 29. Gráfica de Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo 1-3 ng/mL)	79
Figura 30. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote B	88
Figura 31. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote PN	89
Figura 32. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote N	90
Figura 33. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote N/2	91
Figura 34. Gráfica de Extracción de Progesterona en sangre de bovino	92
Figura 35. Gráfica de Extracción de Progesterona. Lote N	93
Figura 36. Estructura química general del polímero PEG	102
Figura 37. Estructura química del polímero Kollicoat grado MAE	105
Figura 38. Estructura del poloxámero	107
Figura 39. Estructura molecular de la quitina	108
Figura 40. Estructura molecular del quitosano	108

ANEXO 3. Índice de Tablas

Tabla 1. Régimen de medicamentos para el control de la sincronización del ciclo estral en rumiantes. Clases Gonadorelina/Prostaglandina	8-9
Tabla 2. Régimen de medicamentos para el control de la sincronización del ciclo estral en rumiantes. Clase Progestina/Prostaglandina	9
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de la progesterona	11
Tabla 4. Sistemas de liberación modificada. Principales ventajas y desventajas	12
Tabla 5. Polímeros principalmente utilizados en la formulación de implantes de formación in-situ	19
Tabla 6. Composición de diferentes geles para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona	20-21
Tabla 7. Formulación para la fabricación de un gel para la obtención de un implante de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	21
Tabla 8. Parámetros de desempeño a evaluar en función de la aplicación analítica del método	38
Tabla 9. Productos a evaluar	50
Tabla 10. Calendarización de los tratamientos y toma de muestras en los animales	50
Tabla 11. Condiciones de trabajo cromatográficas	51
Tabla 12. Resultados de la prueba de inyectabilidad en aire del gel de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida	59-60
Tabla 13. Resultados de la prueba de inyectabilidad bajo condiciones que simulan una administración de tipo subcutánea del gel de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida	61
Tabla 14. Resultados de la prueba de inyectabilidad bajo condiciones que simulan una administración de tipo intramuscular del gel de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida	61-62
Tabla 15. Correlación de fuerza de inyección in-vitro, in-vivo	63
Tabla 16. Determinación del pH en geles de progesterona para la obtención de implantes de formación in-situ por el método de dispersión sólida	64
Tabla 17. Velocidad de intercambio de disolventes en el gel para la obtención de implantes de formación in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	66
Tabla 18. Tiempo de formación de un implante in-situ de progesterona por el método de dispersión sólida	66
Tabla 19. Curva Estándar de Progesterona	73
Tabla 20. Linealidad del Sistema para Progesterona (Intervalo de 0.5-3 ng/mL)	76

Tabla 21. <i>Parámetros a evaluar para la Linealidad del Sistema</i>	77
Tabla 22. <i>Exactitud y Repetibilidad del Método para Progesterona</i>	78
Tabla 23. <i>Exactitud y Repetibilidad del Método. Valor Global</i>	78-79
Tabla 24. <i>Linealidad del Método para Progesterona (Intervalo de 1-3 ng/mL)</i>	79
Tabla 25. <i>Parámetros a evaluar para Linealidad del Método</i>	80
Tabla 26. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (1ng/mL)</i>	81
Tabla 27. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (2ng/mL)</i>	81
Tabla 28. <i>Estabilidad analítica de la muestra (3ng/mL)</i>	82
Tabla 29. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (1ng/mL)</i>	82
Tabla 30. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (2ng/mL)</i>	83
Tabla 31. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (3ng/mL)</i>	83
Tabla 32. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (1ng/mL)</i>	84
Tabla 33. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (2ng/mL)</i>	84
Tabla 34. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (3ng/mL)</i>	84
Tabla 35. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (1ng/mL)</i>	85
Tabla 36. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (2ng/mL)</i>	85
Tabla 37. <i>Estabilidad analítica de la muestra, (3ng/mL)</i>	86
Tabla 38. <i>Lote B (CIDR)</i>	88
Tabla 39. <i>Lote PN (Progesterona comercial)</i>	89
Tabla 40. <i>Lote N (Implante de interés)</i>	90
Tabla 41. <i>Lote N/2 (Implante de interés con 50% de polímero)</i>	91
Tabla 42. <i>Lote N</i>	93
Tabla 43. <i>Características generales para la elección adecuada de PEG (MERCK, 2019)</i>	103
Tabla 44. <i>Información fisicoquímica de PEG 6000 (MERCK, 2019)</i>	104
Tabla 45. <i>Composición del Kollicoat MAE 30DP (Volker, 2007)</i>	105
Tabla 46. <i>Relación entre parámetros estructurales y propiedades</i>	109