



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

## Facultad de Química

Desarrollo y evaluación de un gel de  
formación *in-situ* para la administración  
de progesterona para el control de la  
fertilidad en rumiantes.

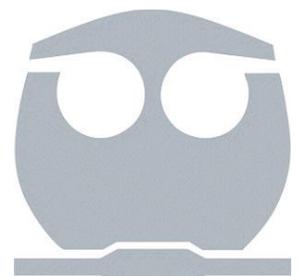
### Tesis

Para obtener el título de:

*Química Farmacéutico Bióloga*

Presenta:

Diana Tiburcio González



■ México, CDMX

2018



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 de tesis**

<i>Presidente</i>	Profesora: María del Socorro Alpizar Ramos
<i>Vocal</i>	Profesora: Verónica Zamora Salazar
<i>Secretario</i>	Profesora: Viridiana Gisela Llera Rojas
<i>1er Suplente</i>	Profesora: Luz Antonia Borja Calderón
<i>2º Suplente</i>	Profesora: María Josefa Bernad Bernad

*Sitio donde se desarrolló el tema* Laboratorio 001 del Departamento de Farmacia edificio F, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria.

*Asesor del tema* M. en C. Viridiana Gisela Llera Rojas

*Supervisor Técnico* Dra. María Josefa Bernad Bernad

*Sustentante* Diana Tiburcio González

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a la Dra. Viridiana Gisela Llera Rojas por su apoyo, tiempo, y buen humor durante la elaboración de este proyecto.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad por su apoyo creativo y técnico durante mi estancia en su laboratorio.

A mis compañeros Analí Martínez Cruz y Daniel Mora Toledo por estar conmigo en cada experimento y momento de incertidumbre, su apoyo y sus ideas creativas, que sin duda fueron fundamentales para la conclusión exitosa del proyecto.

A mi familia, por el cariño y soporte que han sido para mí, no sólo en el ámbito académico, sino en cada uno de los aspectos de mi vida.

A Rodolfo Martínez Carranza, Chantal C. Blaizac Iza, Nallely M. García Gómez, Camila Campos Escamilla, Diego I. Torres Velázquez, Fernando Torres Santander, Sofía Casillas Popova y Frida Lagar Quinto por haber compartido conmigo la mayor parte de las dificultades y éxitos que viví durante mi carrera y siempre darme ánimos, apoyo y sonrisas incondicionales.

## Índice

Abreviaturas	5
1.0 Introducción	6
2.0 Objetivos	9
3.0 Antecedentes	10
3.1 Ciclo estral de las vacas y su control en la industria ganadera.	10
3.2 Sistemas de liberación modificada	15
3.3 Implantes	20
3.3.1 Implantes de formación <i>in-situ</i>	24
3.4 Caracterización	29
3.4.1 Inyectabilidad	29
3.4.2 Reología	31
3.4.3 Morfología microscópica del implante de formación <i>in-situ</i> de progesterona.	34
3.4.4 Liberación	34
4.0 Metodología	39
4.1 Fabricación del gel	39
4.2 Reología	40
4.3 Valoración	42
4.4 Determinación del pH	43
4.5 Inyectabilidad	43
4.6 Formación del implante	45
4.7 Velocidad de intercambio de disolventes	46
4.8 Liberación in-vitro	48
4.9 Morfología microscópica del implante de formación <i>in-situ</i> de progesterona.	49
5.0 Resultados y discusión	51
5.1 Fabricación del gel	51
5.2 Reología	52

5.3 Valoración	59
5.4 Determinación del pH	60
5.5 Inyectabilidad	61
5.6 Formación del implante	62
5.7 Velocidad de intercambio de disolventes	63
5.8 Morfología microscópica del implante de formación <i>in-situ</i> de progesterona.	65
5.9 Liberación <i>in-vitro</i>	70
6.0 Conclusiones	74
7.0 Referencias	75
8.0 Anexos	79

## Abreviaturas

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
Amp	Amplificador	mm	Milímetro
Cbp y cbp	Cuanto baste para	N	Newton
Cm	Centímetro	NA	No aplica
cP	Centipois	nm	Nanómetro
CV, %CV	Coefficiente de variación	NMP	N-metilpirrolidona
DS	Dispersión sólida	PA	Principio activo
EVA	Acetato de vinil-etileno	PEG	Polietilenglicol
F <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>	PG	Progesterona
FDA	Food and Drug Administration	PGS	Solución de gel
FEI	Tipo de microscopio electrónico de barrido	pH	Potencial de hidrógeno
FIRA	Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura		
FSH	Hormona folículoestimulante	PK	PEG 6000 + Kollicoat® MAE 30 DP
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina	PNIPAAm	poli-iso-propilacrilamida
HPMC	Hidroxi-propil-metil-celulosa	PPG	PEG 6000 + Progesterona
IC(μ)	Intervalo de confianza para la media poblacional.	PPGK	PEG 6000 + Progesterona + Kollicoat® MAE 30 DP
IC(β1)	Intervalo de confianza para la pendiente poblacional.	QFB's	Químicos farmacéuticos biólogos
IC(βo)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen poblacional	S	Desviación estándar
kV	Kilovolt	SEI	Electrones secundarios
LABE	Electrones retrodispersados	SEM	Scanning electron microscopy
LCST	low critical solution temperature	SG1	Solución del gel 1
LEI	Electrones secundarios retrodispersados	ySS	Solución stock
LH	Hormona luteinizante	SS2	Solución stock 2
mg	Miligramo	UCST	Upper critical solution temperature
min	Minuto	V	Volt
mL	Mililitro	X	Media, promedio

## 1.0 Introducción

La producción mundial de carne de bovino ha mantenido una ligera tendencia de crecimiento durante los últimos diez años. Para 2017 se esperaba que la producción se ubicara en un máximo histórico de 61.3 millones de toneladas, lo que representaría un aumento anual de 1.4 por ciento. El aumento en la producción de carne de bovino ha sido impulsado por la recuperación de la industria ganadera en los principales países productores, principalmente Estados Unidos de América, así como por la amplia disponibilidad de granos y pasturas para la alimentación animal. De igual manera, un mayor peso del ganado destinado al sacrificio ha contribuido a incrementar el volumen disponible de la carne. Se ha observado que, a nivel global, se consume todo el producto cárnico que es producido (Figura 1) y, gracias a la tendencia de crecimiento, es necesario incorporar medidas que vuelvan más eficiente a la producción (FIRA, 2017).

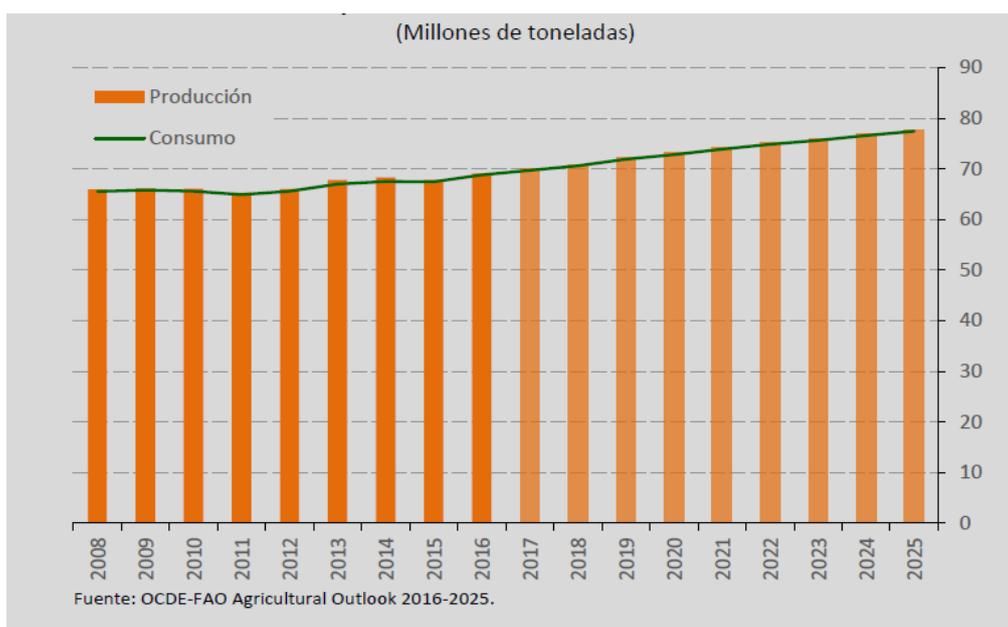


Figura 1. Producción y consumo de carne de bovino a nivel mundial, 2008-2025 (FIRA, 2017).

En México, la producción de carne de bovino creció a una tasa promedio anual de 1.8 en el periodo de 2007 a 2016. Para 2017, se estima que ésta se ubique en un máximo histórico de 1.91 millones de toneladas, es decir, que se registre un crecimiento anual de 1.6 por ciento. De igual manera, se espera que la industria ganadera nacional continúe con una tendencia de aumento. Se esperaba que durante 2017 el consumo nacional aumentará a 1.8 millones de toneladas, lo que

significaría un incremento anual de 0.2 por ciento. La producción de ganado en México no es suficiente para cubrir con la demanda total de consumo y exportaciones, por lo que se ha recurrido a la importación de carne de bovino (Figura 2). Es posible que, si se optimizara la producción nacional, las importaciones se verían reducidas y se tendría una ganancia mayor en la industria ganadera (FIRA, 2017).

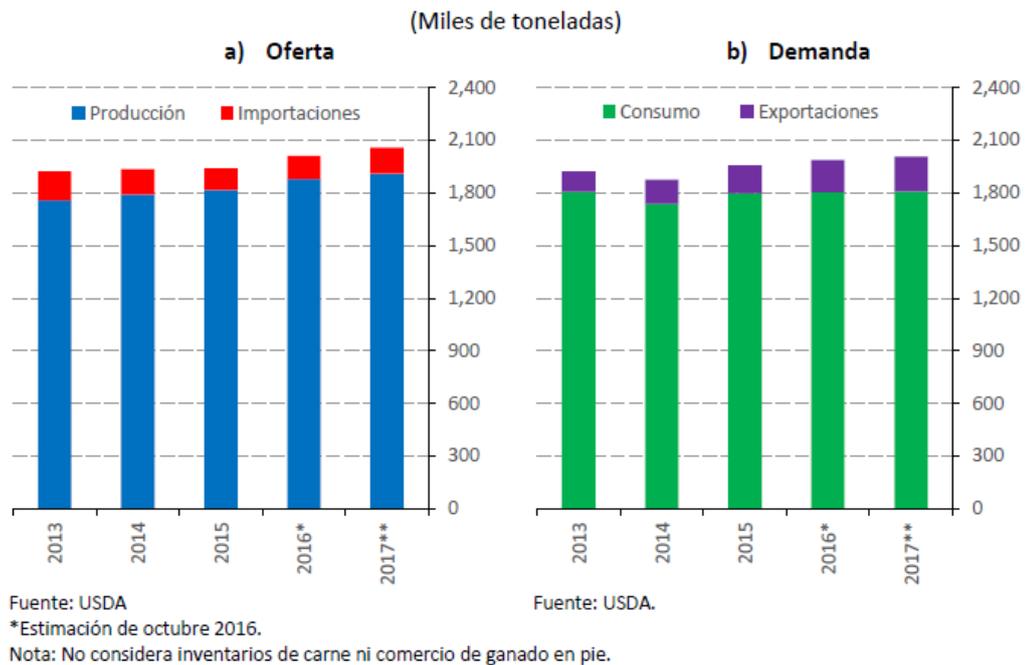


Figura 2. Oferta y demanda de carne de bovino en México, 2013-2017 (FIRA, 2017).

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 puede conseguirse al regular hormonalmente el ciclo estral de las vacas. Esto puede 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 todas en el mismo periodo de tiempo. Además, esto permite que la calidad del ganado aumente, pues es posible que los mismos genes de un toro genéticamente superior sean utilizados dando como resultado adicional una reducción del periodo de gestación (Troxel, 1982).

En este trabajo se busca desarrollar un implante de formación in-situ que libere progesterona de manera sostenida con el propósito de sincronizar el ciclo estral del ganado.

## 2.0 Objetivos

### 2.1 Objetivo general

- Desarrollar un implante de formación *in-situ* para la administración de progesterona y realizar estudios para la caracterización fisicoquímica y el perfil de liberación del sistema obtenido.

### 2.2 Objetivos particulares

- Fabricar un implante de formación *in-situ* utilizando la técnica de dispersión sólida para obtener una formulación de mejores características que aquella descrita en la patente MX/a/2015/007665.
- Evaluar la reología de la formulación de los geles de formación *in-situ* fabricados utilizando un reómetro Hibrid Discovery HR-3 para determinar su comportamiento viscoelástico y seleccionar el de viscosidad menor.
- Determinar el contenido de fármaco en la formulación del gel fabricado a través de una prueba de valoración, así como el pH empleando métodos químicos para caracterizarlo.
- Definir la fuerza necesaria para inyectar la formulación utilizando un texturómetro para determinar si su administración es viable.
- Realizar pruebas de formación del implante a través de un modelo que simule las condiciones acuosas del medio subcutáneo, así como un experimento que determine la velocidad de la formación a través del intercambio de disolventes para asegurar que es posible lograr la formación *in-situ* en el área de administración.
- Observar la morfología del implante obtenido utilizando la microscopía electrónica de barrido (SEM) para determinar su estructura macromolecular.
- Obtener el perfil de liberación del implante de formación *in-situ* utilizando condiciones que simulen el medio subcutáneo para determinar la cinética de liberación del sistema.

### 3.0 Antecedentes

#### 3.1 Ciclo estral bovino y su control en la industria ganadera.

##### Ciclo estral bovino

El ciclo estral se define como el tiempo que transcurre entre dos ovulaciones o dos estros. El estro, comúnmente referido como el día cero del ciclo, corresponde al tiempo en el cual una hembra puede aceptar sexualmente a un macho. En el caso de las vacas, este ciclo tiene una duración de 21 días y el estro de 15 horas aproximadamente, aunque se han reportado estros desde 6 hasta 24 horas. La interrupción del ciclo estral, o anestro, puede deberse a varios factores como el embarazo, lactancia, edad, enfermedades y desórdenes hormonales e inclusive infecciones (Trojer, Kesler, 1982).

El ciclo estral puede dividirse en dos fases principales, la primera, la fase folicular se caracteriza por el desarrollo del folículo, una estructura en el ovario que contiene al óvulo, y la producción de estrógenos. Una vaca generalmente tiene dos o tres grupos de folículos en el ovario desarrollándose en cada ciclo estral, un folículo en cada "ola" se convierte en el folículo dominante. Al inicio del ciclo estral, cuando los niveles de progesterona son altos, el folículo dominante no sufrirá ovulación, sino que tendrá una regresión y permitirá que surja una nueva ola de folículos. La última ola ocurre cuando el nivel de progesterona es bajo, entonces el folículo dominante en vez de regresión, presentará crecimiento y se observará una producción aumentada de estrógenos (Trojer, Kesler, 1982).

Los altos niveles de estrógeno producidos por el folículo dominante ocasionan que la vaca entre en estro, o "celo". Los signos físicos de que el animal está en celo son la producción abundante de mucosa vaginal y un incremento en su nivel de actividad, también es posible que se presente un aumento en la vocalización y que intente montar a otras vacas. Los niveles de estrógeno alcanzados también tienen como consecuencia la estimulación del hipotálamo para que libere la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), justo antes de la ovulación. La GnRH 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 y regular la actividad de los folículos (FDA.gov, 2018).

La FSH es secretada poco antes y durante el estro y ocasiona el desarrollo de una nueva ola de folículos en el ovario. La presencia de la LH provoca que el folículo dominante se rompa aproximadamente de 24 a 32 horas después, liberando al óvulo. La ovulación marca la transición de la fase folicular a la fase lútea (FDA.gov, 2018).

Durante la fase lútea, los niveles de estrógeno disminuyen rápidamente y las células del folículo roto empiezan a crecer y a dividirse para formar el *corpus luteum*. El cuerpo lúteo produce progesterona y si existe fecundación, la estructura se mantiene, ya que esta hormona es requerida para que se mantenga 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. Bajo la influencia de las altas concentraciones de esta hormona, se presentan varias olas de folículos en el ovario con sus respectivas regresiones sin que ninguno sufra ruptura, ésta sólo se presentará en la siguiente fase folicular cuando los niveles de progesterona hayan descendido lo cual ocurre después de 16 o 17 días si no se presenta fecundación. Esto ocurre porque el útero produce prostaglandina  $F_2\alpha$  que destruye el cuerpo lúteo, a esto se le conoce como luteólisis. Posteriormente se produce estrógeno y se libera la LH y la FSH dando paso a una nueva fase folicular (FDA.gov, 2018).

Cuando existe fecundación, la presencia del embrión inhibe que el útero produzca prostaglandina  $F_2\alpha$  por lo que los niveles de progesterona se mantienen y el ciclo estral es interrumpido. El periodo de gestación dura alrededor de 283 días. La edad más conveniente para el primer parto en una vaca es a los dos años por lo que debe alcanzar la pubertad y quedar preñada a los 14 o 15 meses de edad (FDA.gov, 2018).

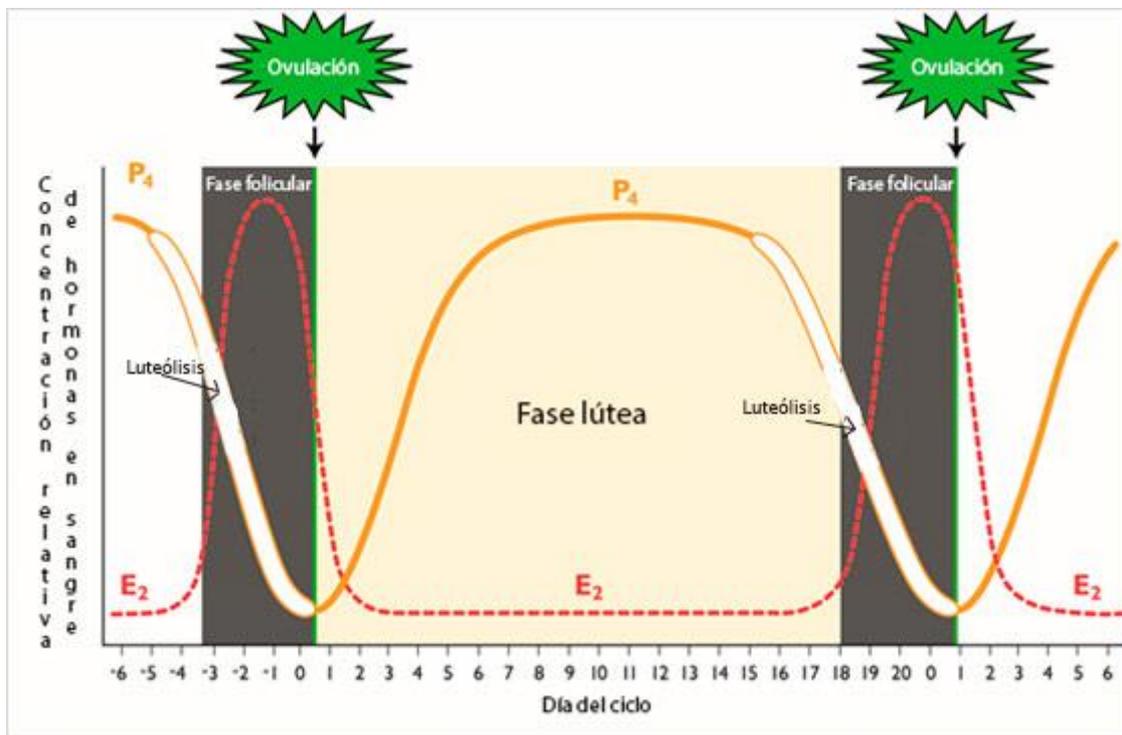


Figura 3. Ciclo estral bovino (FDA.gov, 2018)

Control del ciclo estral y su sincronización en el ganado.

Las hormonas exógenas pueden imitar a las hormonas liberadas en el ciclo estral natural, al administrar hormonas exógenas al ganado, los productores de esta industria pueden controlar y sincronizar el estro, así como disminuir el tiempo que duran los ciclos con lo que se reducen 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 después de dar a luz, y también que un becerro adelante su primer estro (FDA.gov, 2018).

Existen diferentes tratamientos para lograr la sincronización del estro en el ganado, pero principalmente se basan en 3 clases de fármacos. Los regímenes de tratamiento se encuentran en la tabla 2.

- Clase gonadorelina

Actúan similar a la GnRH liberada del hipotálamo en el ciclo estral. Por lo tanto, propician la secreción de LH y FSH promoviendo que una ola de folículos se desarrolle en el ovario y la ovulación. Estos medicamentos también pueden utilizarse para tratar quistes en el ovario (FDA.gov, 2018).

- Clase progestina

Simulan la acción de la hormona progesterona secretada naturalmente por el cuerpo lúteo. Estos fármacos pueden suplementar los niveles de progesterona en la vaca con el propósito de influenciar la liberación de FSH y LH por la glándula pituitaria, suprimir el estro, bloquear la ovulación y sincronizar el ciclo estral (FDA.gov, 2018).

La síntesis de progesterona con fines terapéuticos ha progresado desde sus inicios. Las primeras hormonas utilizadas eran extraídas de animales, principalmente porcinos, posteriormente se encontraron precursores en la forma de esteroides vegetales, saponinas, como la diosgenina, proveniente de las plantas del género *Dioscorea*. Los avances tecnológicos continuaron y fue posible sintetizar la progesterona a partir del colesterol e inclusive sin utilizar ningún precursor, sin embargo, los rendimientos de estos procesos eran muy bajos, alrededor del 1% (Al Jasem, Khan, Taha et al, 2014). Actualmente, se ha optado por una opción más rentable que incluye el uso de fitoesteroides como el sitosterol, stigmasterol, campesterol y otros análogos. A través de reacciones enzimáticas llevadas a cabo por bacterias, principalmente del género *Mycobacterium*, empezaron a sintetizarse precursores con alto rendimiento que

posteriormente dieron paso a hormonas esteroideas al someterlos a pirólisis en condiciones de vacío (Al Jasem, Khan, Taha et al, 2014).

La progesterona es una hormona esteroidea, por lo que la mayor parte de su estructura es hidrofóbica, sin embargo, tiene dos grupos carbonilo que le permiten una interacción mínima con el agua y no se ha reportado inestabilidad, ni ionización, dependiente del pH. Tiene una vida media alta, de 34.8 a 55.13 horas, debido a su alta unión a proteínas plasmáticas que va del 96 al 99%. Su metabolismo incluye glucuronidación y sulfatación y los metabolitos son excretados en la orina y en la bilis (Drugbank.ca, 2018).

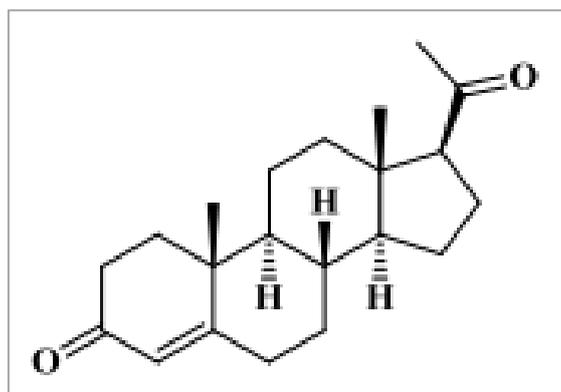


Figura 4. Progesterona (Al Jasem, Khan, Taha et al, 2014).

A continuación, se presenta una tabla que contiene algunas propiedades fisicoquímicas de la progesterona.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de la progesterona (Drugbank.ca, 2018).

<b>Propiedad</b>	<b>Valor</b>
Punto de fusión	121°C
Solubilidad en agua	8.81 mg/L
Log P	3.87
Log S	-4.43

- Clase prostaglandina

Su actividad mimetiza a la de la prostaglandina  $F_{2\alpha}$  liberada por el útero en condiciones naturales cuando no se presenta embarazo. Los fármacos de esta clase promueven la luteólisis cuando el cuerpo lúteo madura lo suficiente, conllevando al reinicio del ciclo estral, sin embargo, si se utilizan en los primeros

5 días del ciclo, estos fármacos no presentan efecto debido a que un cuerpo lúteo inmaduro no reacciona a la prostaglandina F<sub>2α</sub> (FDA.gov, 2018).

Cabe mencionar que todos los tratamientos descritos en la tabla 2, con excepción del CIDR, son formas farmacéuticas convencionales. En este trabajo se busca una alternativa al CIDR de administración más sencilla y con una menor dosis de progesterona a partir del uso de un sistema de liberación modificada.

Tabla 2. Régimen de medicamentos para sincronizar el ciclo estral (FDA.gov, 2018)

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

### 3.2 Sistemas de liberación modificada

Una forma farmacéutica es la mezcla de una o más sustancias con actividad terapéutica con sustancias preferentemente inertes que en conjunto constituyen un medicamento. Las formas farmacéuticas convencionales no ejercen control en la liberación de los fármacos ni del lugar donde ésta se presenta, únicamente obedecen especificaciones para asegurar su desintegración en tiempos adecuados en el caso las tabletas y cápsulas. La farmacocinética en estos sistemas inicia con la liberación del fármaco, posteriormente se absorbe al torrente sanguíneo, llega a su sitio de acción y finalmente es eliminado, el paso limitante es la absorción del fármaco ya que la liberación es inmediata (Bernad 2017).

En los sistemas de liberación modificada, la liberación es el paso limitante en la farmacocinética del fármaco ya que ésta suele ser más lenta que su absorción al torrente sanguíneo (Bernad, 2017). Estos sistemas presentan ventajas tanto terapéuticas como económicas, las primeras incluyen a concentraciones plasmáticas terapéuticas uniformes, reducción de efectos tóxicos y de reacciones adversas, así como un régimen terapéutico más fácil de seguir por los pacientes. Las ventajas económicas incluyen, en algunos casos, tratamientos diarios menos costosos, mejora de la terapia y uso racional de los medicamentos mejorado. Las desventajas principales de estos sistemas son la flexibilidad reducida de la dosificación, así como la posibilidad de llegar a concentraciones plasmáticas tóxicas en caso de una mala administración del medicamento, principalmente debida al desconocimiento del paciente sobre la misma (De Haan, Lerck, 1984).

Los sistemas de liberación modificada se enfocan en diferentes tipos de liberación para los fármacos. Existen diversos sistemas que pueden entrar en esta categoría de modo que pueden clasificarse según la cinética de liberación que presentan o los estímulos que los regulan; a continuación, se explicarán brevemente algunos de ellos (De Haan, Lerck, 1984).

- Liberación regulada por estímulos físicos, químicos o bioquímicos.

Estas formas farmacéuticas dependen de la acción de algún estímulo. Éste puede ser de naturaleza física y presentarse en el ambiente como la presión osmótica, hidrodinámica o de vapor o puede inducirse externamente al activar los sistemas de forma mecánica, magnética, o usando sonoforesis, iontoforesis e hidratación. Los estímulos químicos que pueden regular la liberación pueden ser el pH, ambiente iónico e hidrólisis, mientras que los bioquímicos serían las enzimas (De Haan, Lerck, 1984).

- Liberación pulsátil

Estas formas farmacéuticas se caracterizan por liberar una dosis terapéutica de tipo inmediata y, cierto tiempo después, una segunda dosis (De Haan, Lerck, 1984).

- Liberación prolongada

Estos sistemas permiten que el tiempo de dosificación sea al menos 2 veces el convencional. La liberación se presenta paulatinamente para permitir que se presente un efecto terapéutico en un tiempo determinado (De Haan, Lerck, 1984).

- Liberación retardada

El fármaco no es liberado de forma inmediata después de la administración. El periodo de latencia es mucho mayor que el de una forma farmacéutica convencional. Sin embargo, no se altera la concentración plasmática máxima ni el tiempo de vida media del fármaco (De Haan, Lerck, 1984).

- Liberación sostenida

Cuando se presenta este tipo de liberación, los sistemas se caracterizan por liberar una dosis del fármaco suficiente para que se presente la actividad terapéutica y

posteriormente una dosis menor que permite mantenerla por un periodo específico (De Haan, Lerck, 1984).

Una de las estrategias más utilizadas para lograr una liberación controlada en formas farmacéuticas, debido a su costo y facilidad de fabricación, es el uso de sistemas matriciales. Las matrices contienen al principio activo uniformemente disperso y sus características están determinadas por el polímero que las constituye. Según las mismas, estos sistemas se caracterizan en inertes, también denominadas plásticas o insolubles, hidrofílicas y lipofílicas (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

Las matrices inertes forman una red sólida porosa compuesta de sustancias no tóxicas, que no pueden metabolizarse o disolverse en el medio donde se alojarán en su administración *in-vivo*. Dependiendo de esta última puede ser que su eliminación sea por el tracto gastrointestinal de forma íntegra o que sea necesario removerlas en el caso de una administración parenteral. La liberación que presentan es de tipo difusión y depende de la solubilidad del fármaco, los excipientes y el tamaño de los mismos, la forma y el área superficial del sistema (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

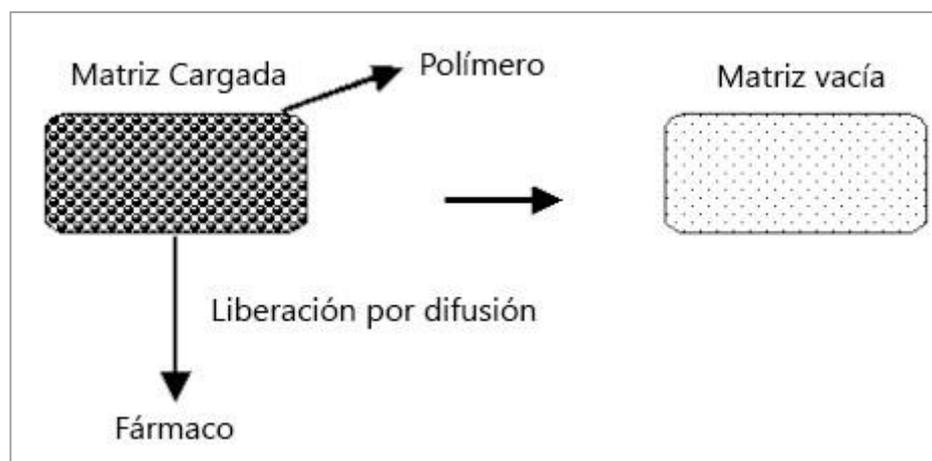


Figura 5. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica inerte (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

Las matrices hidrofílicas se conforman de uno o más polímeros que actúan como agentes gelificantes y un fármaco relativamente soluble. Cuando el sistema entra en contacto con los líquidos corporales, se hidrata e hincha formando una capa de gel que aumenta de espesor conforme el agua difunde al interior del mismo, posteriormente se erosiona y disuelve totalmente. La liberación se presenta por difusión. Sus ventajas incluyen su baja dependencia a las condiciones fisicoquímicas y fisiológicas, la disponibilidad de excipientes y la capacidad de crear microambientes de pH seleccionado para controlar la solubilidad del fármaco y por lo tanto su liberación (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

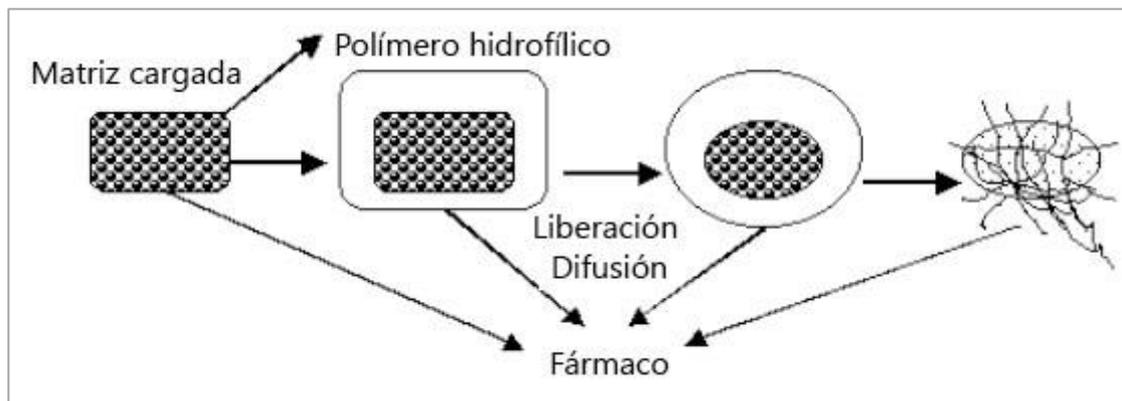


Figura 6. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica hidrofílica (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

Las matrices lipídicas son constituidas por glicéridos, ácidos y alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y ceras principalmente además del principio activo liposoluble y algunos otros excipientes. Estos compuestos presentan biocompatibilidad bastante aceptable y sensibilidad a algunas enzimas y pH's. Su liberación se presenta principalmente debido a procesos de erosión y en caso de que exista en la formulación algún formador de poros, de difusión en menor medida (Costa, Arancibia, Aiache, 2004).

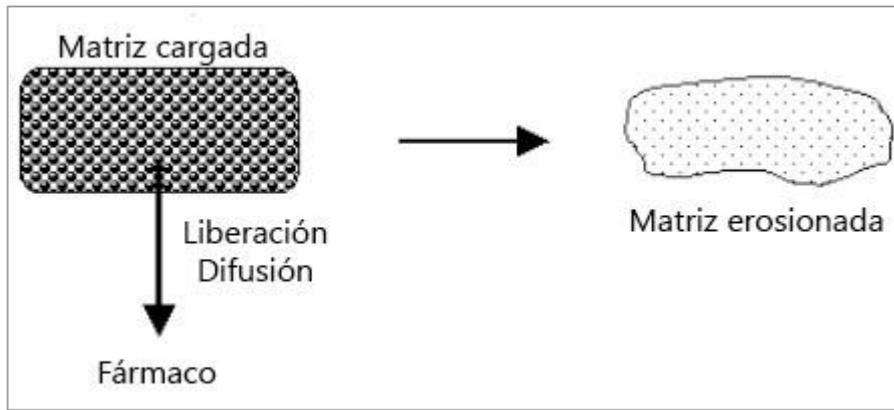


Figura 7. Liberación de un fármaco a partir de una matriz polimérica lipofílica basada en Costa, Arancibia, Aiache, 2004.

Cuando las matrices son administradas por vía parenteral, es posible que estos sistemas sean usados como implantes.

### 3.3 Implantes

Estos sistemas comenzaron su desarrollo en los años 30's por el equipo de Danckwerts con la búsqueda de un nuevo sistema de liberación sostenida implantable administrado por vía subcutánea. Desde su publicación, se incrementó el interés general por estas formas farmacéuticas y sus estudios y demanda crecieron a una tasa anual del 14% hasta 1998. Estos sistemas han sido considerados cuando se desea una liberación de principio activo controlada y continua por un periodo largo (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

Las características ideales de estos sistemas incluyen la estabilidad ambiental, biocompatibilidad, esterilidad, bioestabilidad, disminución de la frecuencia de dosificación, que sea posible eliminarlo del paciente y, por supuesto, bajo costo y facilidad de producción. Sus principales ventajas son principalmente un incremento en la eficacia de la terapia y de su eficiencia, la disminución de las dosis y efectos secundarios, principalmente los sistémicos, liberación en el sitio de acción, posibilidad de tener terapias de una duración de semanas a meses y manutención de los niveles plasmáticos deseables y administración prolongada de fármacos con tiempos de vida media cortos. Sin embargo, también existen factores que pueden presentar desventajas para los sistemas implantables como son la posible toxicidad de sus componentes o rechazo fisiológico, dolor, dificultad para interrumpir la administración del fármaco y, en ciertos casos, la necesidad de una microcirugía para administrarlos (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

La liberación de principio activo en los implantes puede regularse principalmente por tres mecanismos:

- Control de hinchamiento
- Bombeo osmótico
- Difusión

Los sistemas implantables pueden ser clasificados como biodegradables o no-biodegradables dependiendo del polímero por el cual estén compuestos. Algunos implantes no-biodegradables están compuestos de siliconas u otros plásticos como el EVA (acetato de vinil-etileno), poliuretanos y algunos hidrogeles de acrilatos. Con lo que respecta a los polímeros usados en implantes biodegradables, se tiene al ácido poli-lactoglicólico o PLGA que se hidroliza produciendo ácido láctico y ácido glicólico. También se ha investigado el uso de policarbonatos con derivados de tirosina (Arps, 2013) y de copolímeros de lactide y caprolactona (Solanki, Thakkar, Jani, 2010).

Existen varios tipos de sistemas implantables, pero los más comunes son los de tipo reservorio y las matrices. Los sistemas tipo reservorio consisten en un núcleo compacto del principio activo recubierto por una membrana no biodegradable. Su grosor y permeabilidad determinan la velocidad de difusión del fármaco al sistema. La cinética de liberación de este sistema sugiere que, si la concentración del fármaco en el reservorio está en equilibrio con la superficie interna de la membrana, ésta es de orden cero. Sin embargo, estos implantes presentan ciertos inconvenientes, entre ellos está la necesidad de aplicar microcirugía para poder retirarlo del paciente, y el riesgo de que la membrana se rompa liberando toda la dosis que contienen provocando que se presenten concentraciones plasmáticas tóxicas del principio activo. Cabe mencionar la existencia de sistemas biodegradables de esta naturaleza, sin embargo, no son los más comunes. En estos casos, se utiliza una membrana polimérica que tardará más en degradarse que el tiempo que le toma a la dosis completa de PA difundir (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

Los sistemas matriciales son utilizados para implantes tanto biodegradables como no-biodegradables dependiendo del polímero que se seleccione para su formulación. La cinética de liberación es principalmente debida al mecanismo de difusión, pero no es constante de formulación a formulación y depende de la

fracción del volumen del principio activo disuelto, entre mayor sea, la liberación se ve incrementada (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011). En los sistemas biodegradables es importante tener en cuenta la velocidad de la erosión de la matriz para que no influya sin control en la liberación del fármaco, así como las variaciones en el área de contacto que se presentarán por lo que es necesario el uso de formas geométricas en el diseño del implante (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011). Además, es importante considerar que las alteraciones en el medio *in-vivo* pueden acelerar o frenar la erosión de estos sistemas. Algunos ejemplos son el pH y la temperatura (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

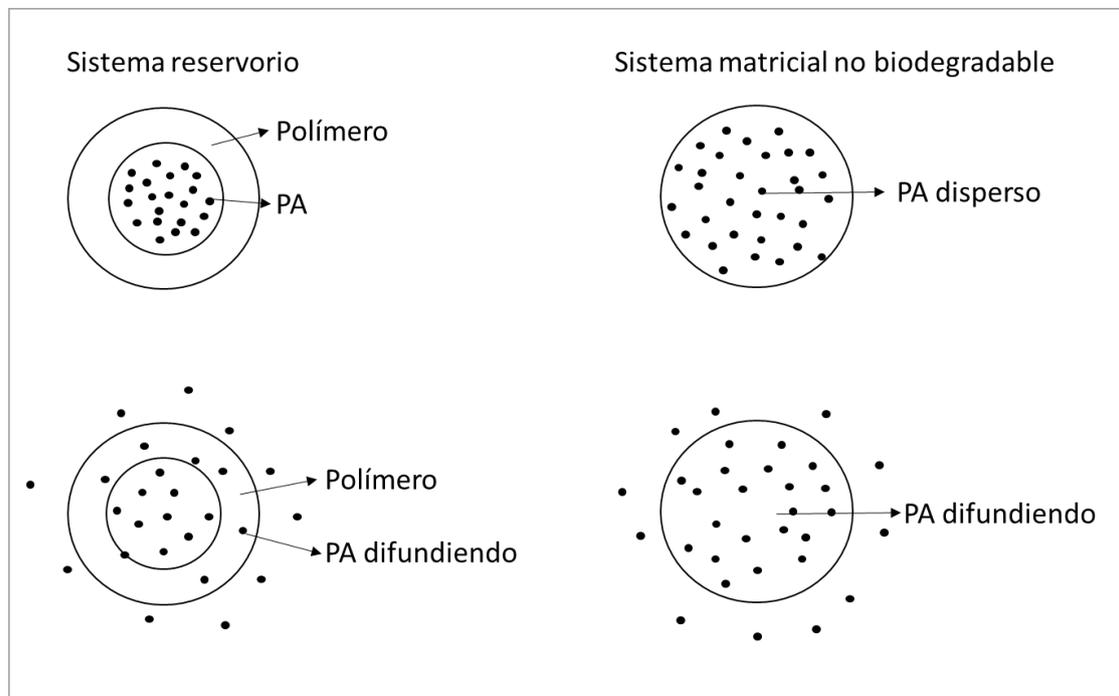


Figura 8. Liberación de PA en sistemas reservorio y matricial basada en "Figure 1" (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

Otros tipos de implantes que se han investigado y utilizado son los de bombeo. Hasta el momento, se han creado varios sistemas de bombeo, entre ellos se encuentran el de infusión, el peristáltico, osmótico, desplazamiento positivo y microbombas de liberación controlada (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011).

Los implantes se han usado para el tratamiento de diversos padecimientos como lo son la diabetes, dolores crónicos, poliartritis, cáncer y el glaucoma. También se

han empleado en el control de la natalidad y en estudios de hipertensión y adicción a narcóticos (Rajgor, Patel, Bhaskar, 2011). Hasta el momento se ha hablado de los implantes que son formados previa administración al paciente, sin embargo, existen sistemas implantables que pueden formarse *in-situ* una vez que son administrados en el área de interés que suele ser el tejido subcutáneo.

### 3.3.1 Implantes de formación *in-situ*

Los implantes de formación *in-situ* tienen como ventaja una administración sencilla, ya que pueden inyectarse al estar en fase líquida, en comparación con los implantes pre-formados y comparten sus otras ventajas y desventajas.

Estos sistemas ingresan al organismo en una formulación líquida, cuando ésta se expone a diversos estímulos el polímero sufre una transición sol-gel con lo que se forma el implante en el área deseada. Los estímulos pueden ser fisiológicos, cambios físicos en el biomaterial o reacciones químicas (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Los estímulos fisiológicos incluyen principalmente a los cambios de temperatura y de pH. A continuación, se describirá brevemente cada uno de ellos.

- Sistemas regulados por la temperatura.

Los implantes de formación *in-situ* termosensibles son probablemente los más estudiados entre los sistemas de liberación modificada que son regulados por un factor ambiental (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

El rango ideal de temperaturas críticas para la transición sol-gel, es entre la ambiental y la fisiológica. Si el sistema tiene esta característica, no es necesario el uso de una fuente externa de calor. Existen tres tipos de sistemas regulados por temperatura: negativamente termosensibles, positivamente termosensibles y termorreversibles (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Los primeros están formados de polímeros con una temperatura inferior crítica de solución, LCST (*low critical solution temperature*), baja, usualmente menor a la corporal de modo que al encontrarse a temperatura ambiente, por debajo de su LCST el polímero se encuentra disuelto, pero cuando éste se sobrepasa, precipita al pasar de tener características hidrofílicas a hidrofóbicas. Este es el caso de la poli-iso-propilacrilamida (PNIPAAm). También se utilizan algunos Pluronics® debido a su capacidad de formar geles termosensibles como consecuencia de un

cambio en su empaquetamiento micelar, pasando de un estado de menor a mayor orden con el incremento de temperatura (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Los geles positivamente termosensibles tienen una temperatura superior crítica de solución, UCST (*upper critical solution temperature*), alta de modo que cuando se enfría por debajo de la misma las redes de polímero tienden a hincharse. Los polímeros utilizados en este sistema incluyen al ácido poliacrílico, poliacrilamida y poli-butil-co-acrilamida metacrilato (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Los geles termorreversibles por su parte sufren transiciones sol-gel no permanentes, mientras se encuentran a temperatura ambiente se encuentran líquidos y al encontrarse a temperatura corporal presentan gelificación. Los polímeros más utilizados para su fabricación son ciertos Pluronic<sup>®</sup>, Tetronics<sup>®</sup> poloxameros (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Sistemas regulados por el pH.

Todos los polímeros empleados para la formulación de estos sistemas contienen grupos ácidos o básicos expuestos que aceptan o liberan protones en respuesta a los cambios de pH ambientales. Los hidrogeles tienden a hincharse cuando el pH incrementa siempre y cuando su polímero tenga varios grupos aniónicos, pero disminuye si prevalecen los grupos catiónicos. La mayoría de los polímeros con una cantidad importante de grupos aniónicos son derivados del ácido poliacrílico (carbómeros, Carbopol<sup>®</sup>). También las soluciones de polivinilacetato dietilaminoacetato de baja viscosidad a pH 4 forman hidrogeles a pH neutro. Se han reportado mezclas del ácido poliacrílico con HPMC para implantes oculares. También se han logrado fabricar estos sistemas al incorporar a la formulación con los polímeros ya mencionados ácido metacrílico y PEG (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Otros estímulos que pueden regular la transición sol-gel son los cambios físicos en el biomaterial como el hinchamiento y el intercambio de disolventes.

- Sistemas regulados por el hinchamiento del polímero

Este cambio físico ocurre cuando el material absorbe agua del medio circundante y se expande para ocupar un espacio mayor. Un polímero que puede utilizarse para formular estos sistemas es el 18-19 glicerol mono-oleato miverol, que es un lípido polar que se hincha en agua para formar estructuras de cristales líquidos liotrópicos. Tiene características bioadhesivas y puede ser degradado por enzimas (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Sistemas regulados por el intercambio de disolventes.

Al administrarse en la zona deseada, el solvente de estas formulaciones difunde en el medio y el polímero, al ser insoluble en medio acuoso, precipita o solidifica dando paso a la formación de una matriz polimérica. Un polímero que puede ser utilizado es la N-metilpirrolidona (NMP) (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

El gel de formación *in-situ* fabricado para este trabajo se rige por este mecanismo para su formación y el polímero utilizado es un copolímero de ácido metacrílico, Kollicoat® MAE 30 DP, soluble en etanol e insoluble en agua.

La formación de geles *in-situ* por estímulos químicos implica el entrecruzamiento iónico, el enzimático y la fotopolimerización.

- Sistemas regulados por el ambiente iónico.

Los polímeros pueden experimentar una transición de fase dependiendo de la presencia de ciertos iones, un ejemplo son algunos polisacáridos. Mientras que la k-carragenina forma geles rígidos y frágiles en respuesta a una pequeña cantidad de  $K^+$ , la i-carragenina forma geles elásticos en presencia de  $Ca^{2+}$ . La goma gellan disponible comercialmente como Gelrite® es un polisacárido aniónico que presenta gelificación en presencia de cationes mono y divalentes, incluyendo  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ . La gelificación de las pectinas de bajo metoxilación puede ser provocada por cationes divalentes, especialmente  $Ca^{2+}$ . Del mismo modo, el ácido algínico se gelifica en presencia de cationes divalentes y polivalentes como

el  $\text{Ca}^{2+}$  debido a la interacción con el ácido gulurónico presente en las cadenas de alginato (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Sistemas regulados por la acción enzimática

A pesar de no haber sido estudiados ampliamente, se cree que estos sistemas son más ventajosos que aquellos regulados por reacciones químicas y fotoquímicas. Una de las principales ventajas es la ausencia de monómeros e iniciadores. Una aplicación de estos sistemas es la liberación pulsátil de insulina dependiente de estímulo. Este implante está formado por un polímero catiónico sensible a pH que contiene insulina y glucosa oxidasa de modo que se hincha cuando hay un aumento en los niveles de glucosa sanguínea (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

- Sistemas cuya transición sol-gel se debe a la fotopolimerización.

La formulación debe incluir monómeros o el macrómero reactivo y el iniciador. Ésta se inyecta en un tejido y se aplica un campo de radiación electromagnético para formar el gel. Los grupos funcionales polimerizables como los acrilatos u otros similares se usan típicamente como los grupos polimerizables en los monómeros y macrómeros individuales porque rápidamente presentan fotopolimerización en presencia del fotoiniciador adecuado. Típicamente se emplean longitudes de onda larga y visibles, las longitudes de onda ultravioleta cortas no se usan a menudo porque tienen penetración limitada al tejido y son biológicamente dañinas. Una cetona, como 2,2 dimetoxi-2-fenilo acetofenona, a menudo es utilizada como el iniciador de la foto-polimerización ultravioleta, mientras que los iniciadores de canforquinona y etil eosina son a menudo utilizados en sistemas de luz visible. Estos sistemas pueden formularse de tal modo que sean degradados por procesos químicos o enzimáticos, también pueden ser diseñados para liberaciones prolongadas *in-vivo*.

Los sistemas fotopolimerizables son fotocurados *in-situ* con la ayuda de cables de fibra óptica, después de ser administrados al sitio deseado mediante su inyección, y libera el medicamento por un tiempo prolongado. Las foto-reacciones proporcionan tasas de polimerización rápidas a temperatura fisiológica. Además, los sistemas se adaptan fácilmente a formas complejas y pueden formar implantes con estas mismas (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Algunos otros ejemplos de polímeros utilizados para la fabricación de implantes de formación *in-situ* se mencionan en la tabla 3 (Nirmal, Bakliwal, Pawar, 2010).

Tabla 3. Polímeros utilizados en implantes de formación *in-situ*.

<b>Polímero</b>	<b>Estímulo</b>
Pectinas	Iones $\text{Ca}^{2+}$ (Dumitriu S, Vidal PF, Chornet E., 1996)
Xiloglucano	Temperatura (Kawasaki N, Ohkura R, Miyazaki S, et al. 1999)
Goma gellan	Temperatura y iones (Crescenzi V, Dentini M, Coviello T. 1990).
Ácido algínico	Iones (Sechoy O, Tissie G, Sebastian C, et al, 2000)
Goma Xantana	pH (Al-Shamklani A, Bhakoo M, Tuboku MA, et al, 1991)
Quitosano	pH y temperatura (Chenite A, Chaput C, Wang D, et al, 2000)
Carbómeros	pH, intercambio de disolventes (Ismail FA, Napaporn J, Hughes JA, et al, 2000)
Poloxámeros	Temperatura (Kabanov A, Batraoka E, Alakhov V, 2002)
Polímeros sintéticos	Varios (Hatefi A, Amsden B, 2002)
Ácido metacrílico	pH, intercambio de disolventes (BASF, 2010)

### 3.4 Caracterización

#### 3.4.1 Inyectabilidad

La inyectabilidad es un parámetro clave de desempeño de cualquier forma farmacéutica destinada a la administración parenteral. Éste se refiere a la facilidad que posee un inyectable terapéutico para pasar a través de una aguja hipodérmica durante la inyección. En el caso de que no sea adecuada, es posible que se presenten problemas en la administración, por ejemplo, dolor en el paciente, e inclusive formulaciones disfuncionales. Por tanto, esta prueba es primordial, principalmente en formulaciones viscosas y de comportamientos no newtonianos (Allahham, Mainwaring, Stewart, et al. 2004).

La inyectabilidad incorpora información acerca de la presión o la fuerza requerida para realizar la inyección, constancia de flujo y taponamiento de la aguja. Este parámetro puede ser afectado por la geometría de la aguja, es decir, el diámetro, longitud y forma de la apertura de la misma, ya que la tasa de corte aumenta conforme disminuye el tamaño de aguja. Cabe mencionar que entre más delgada sea la aguja, será necesario aplicar una mayor fuerza, aunque como ventaja se tiene que la incomodidad del paciente disminuye, tal es el caso de las plumas y otros auto-inyectores (Cilurzo, Selmin, Minghetti, et al. 2011).

En 1979 fue propuesto un método para determinar la inyectabilidad de formulaciones parenterales al medir el tiempo requerido para inyectarla en una muestra de carne bajo condiciones específicas de presión para un sistema de jeringa-aguja predeterminados. Para medir la fuerza necesaria para la inyección, se utilizó un dinamómetro o un reómetro de microcapilaridad unido a un dinamómetro. Eventualmente se desarrolló un instrumento que se basaba en tener una presión constante de nitrógeno que movía una placa de metal que empujaba el émbolo de una jeringa. Estos estudios reportaron que la inyectabilidad estaba relacionada con la velocidad de inyección y la viscosidad del producto (Cilurzo, Selmin, Minghetti, et al. 2011).

Estas pruebas también se han realizado inyectando las formulaciones en aire y posteriormente comparando los resultados con la facilidad de inyección *in-vivo* (Cilurzo, Selmin, Minghetti, et al. 2011).

Recientemente también se han hecho pruebas de inyectabilidad utilizando texturómetros con programas de compresión fijando la velocidad de empuje de la celda. La fuerza aplicada por este equipo en la prueba de inyectabilidad se disipa de tres maneras: sobrepasar la resistencia inicial del émbolo de la jeringa,

impartir energía cinética al líquido y forzar al mismo a pasar a través de la aguja. Además, es importante considerar que existirá una resistencia más cuando la administración sea subcutánea o intramuscular (Rungseevijitprapa, Bodmeier, 2009).

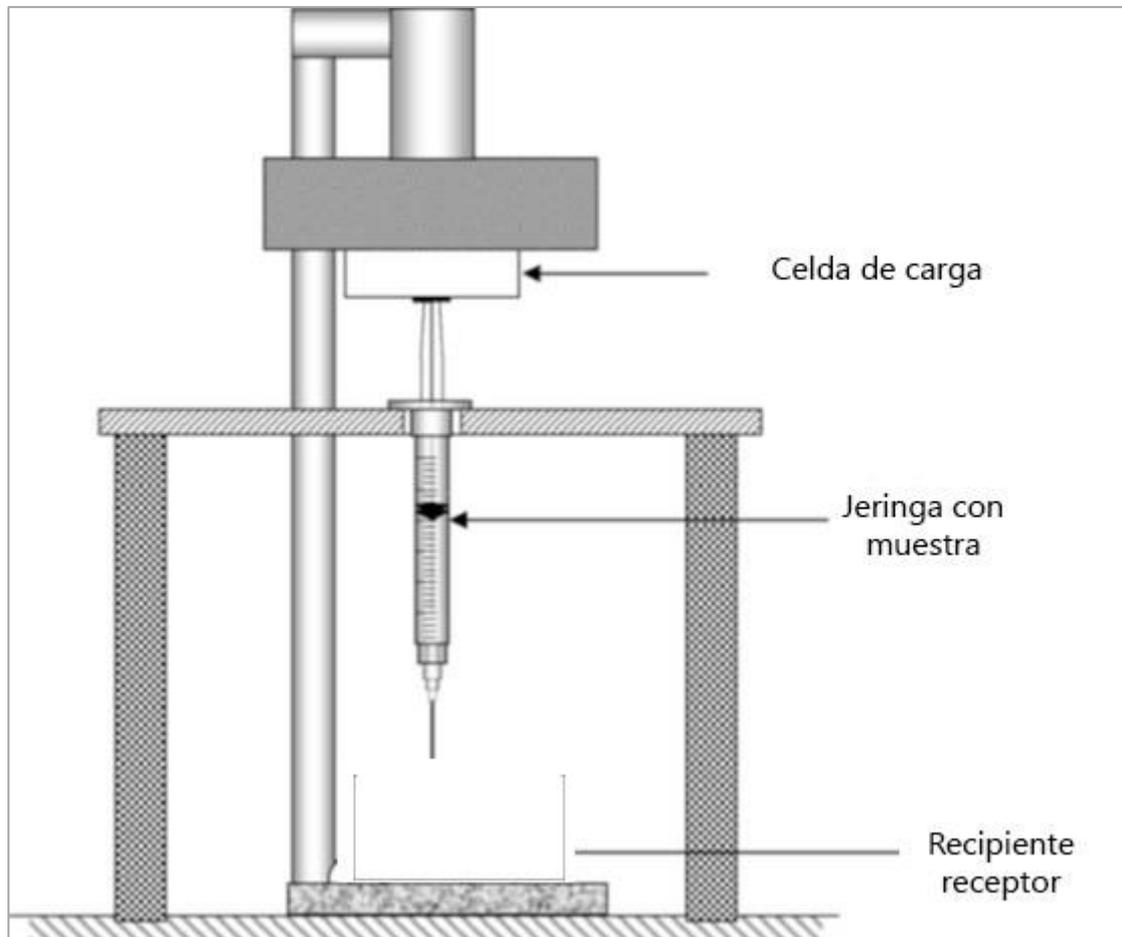


Figura 9. Ilustración de un sistema para medir fuerza modificado de Rungseevijitprapa, Bodmeier, 2009.

### 3.4.2 Reología

Eugene Bingham, un químico que se dedicó al estudio de los coloides, acuñó por primera vez el término "reología". La reología tiene como propósito extender las disciplinas clásicas de elasticidad y mecánica de fluidos newtonianos para comprender el comportamiento mecánico de materiales que no pueden ser descritos con las teorías clásicas (TA Instruments, 1964).

Los fluidos estructurados son algunos de los sistemas que conciernen a la reología. Estos se refieren a aquellos materiales que se componen por más de una fase como el caso de las suspensiones, emulsiones y espumas, y cuyas propiedades de flujo son dominadas, en general, por las interacciones entre los constituyentes dando como resultado comportamientos complejos de fluidez (TA Instruments, 1964).

Existen muchos factores que afectan la estabilidad de los compuestos fluidos, entre ellos se encuentra la viscosidad, tamaño de partícula, su forma y concentración, así como las interacciones de las mismas con el medio dispersante. Cuando la dispersión se encuentra estable, se forma una estructura en el sistema que puede romperse al aplicar movimiento en forma de corte, el cual, al aumentar su velocidad, disminuye la viscosidad. A este fenómeno se le conoce como adelgazamiento de flujo y se ve más pronunciado cuando la proporción de volumen de partículas sólidas aumenta en el sistema. Algunos sistemas pueden presentar un incremento en la viscosidad al aumentar la velocidad de corte debido a que no se rompe la estructura interna, sino que sufre re-arreglos, y a este fenómeno se conoce como engrosamiento de flujo (TA Instruments, 1964).

Existen varios tipos de comportamiento de flujo que pueden presentar los fluidos estructurados, a continuación, se describirán algunos de ellos.

- Flujo de Bingham

Bingham demostró que, para muchos fluidos reales, es necesario alcanzar un nivel crítico de estrés para poder iniciar el flujo. Debajo de este estrés crítico,  $\tau$ , el material se comporta como un sólido, absorbiendo la energía del estrés sin fluir. Una vez que se ha alcanzado el umbral del estrés crítico, el material cede al flujo, a esto se le conoce como límite de fluencia. Los materiales que exhiben flujo newtoniano más allá del límite de fluencia llevan el nombre de fluidos de Bingham (TA Instruments, 1964).

- Flujo plástico

La mayoría de los materiales no presentan un flujo newtoniano después de sobrepasar el límite de fluencia, sino que tienen una viscosidad que disminuye o adelgaza hasta que se alcanza una meseta (TA Instruments, 1964).

- Flujo pseudo-plástico

A los materiales no tienen un límite de fluencia, pero aun así tienen un comportamiento no lineal, se les conoce como pseudo-plásticos. Estos fluyen inmediatamente cuando se les aplica tensión, pero muestran un comportamiento adelgazante al aumentar la velocidad de corte. Entre los materiales que presentan este comportamiento, se encuentran la mayoría de las soluciones de polímeros (TA Instruments, 1964).

- Flujo dilatante

También se le conoce como engrosamiento a la tasa de corte, y es un fenómeno en el cual los materiales aumentan su viscosidad tras ser sometidos a agitación y a incrementos en la velocidad de corte. En algunos casos son suspensiones densas de partículas sólidas en un medio fluido, en el cual se genera un espacio mayor entre las partículas durante la agitación. Este comportamiento suele ser resultado de la inestabilidad del material y de los re-arreglos de estructura o separación de fases (TA Instruments, 1964).

- Flujo tixotrópico

Para muchos materiales fluidos, la viscosidad es independiente del tiempo, y únicamente es una función de la velocidad de corte y la temperatura. Sin embargo, para las dispersiones concentradas, la viscosidad no alcanza un valor constante durante cierto tiempo tras la aplicación de tensión o velocidad de corte. Este estado estacionario depende de la estabilización de las estructuras internas de la red que pueden romperse por corte y requiere tiempo para reconstruirse. Se alcanza una meseta estable en la viscosidad siempre y cuando se haya establecido un equilibrio entre la ruptura de la estructura y la reconstrucción. Al cesar la velocidad de corte que causó el desequilibrio, el material reformula su red interna y la viscosidad se recupera. El término utilizado para describir este fenómeno es tixotropía (TA Instruments, 1964).

- Flujo reopéctico

La viscosidad del fluido tixotrópico disminuye conforme avanza el tiempo cuando se tiene una velocidad de corte constante, mientras que la viscosidad de un fluido reopéctico aumenta bajo una acción de corte impuesto. Un fluido reopéctico tal como una suspensión densa de partículas de látex o plastisoles se gelificará cuando se agite, pero si se le permite reposar, volverá a su baja viscosidad original (TA Instruments, 1964).

Existen varias técnicas que se emplean para la determinación de la reología de los materiales, entre ellas se encuentran las pruebas de reología oscilatoria y de flujo de cizalla simple.

La reología oscilatoria es un término general que incluye diversas técnicas que tienen como propósito caracterizar y cuantificar la presencia, rigidez e integridad de la estructura interna de un material como resultado de la floculación e interacción de partículas o gotas dispersas con el medio, o de la reticulación y enredo de polímeros disueltos. Las pruebas de reología de oscilación suelen llevarse a cabo con fuerzas muy bajas, a menudo significativamente por debajo del punto de fluencia de una muestra.

En el caso de las pruebas que utilizan flujo de cizalla oscilatoria y de cizalla simple, al inicio se utiliza una fuerza paralela que es lo suficientemente baja para preservar la estructura de la muestra, pero a medida que avanza la prueba, el esfuerzo aplicado aumenta, provocando la interrupción final de la estructura, que se manifiesta como una disminución de la elasticidad y de la rigidez (Rheology School, 2013).

### 3.4.3 Morfología microscópica del implante de formación *in-situ* de progesterona.

Existen diversas técnicas para realizar la caracterización morfológica de un implante, por ejemplo, para observar las microestructuras es posible utilizar microscopía de campo claro y para determinar la cristalinidad puede usarse la difracción de rayos X, sin embargo, para observar la morfología de la superficie del implante puede utilizarse microscopía electrónica de barrido (SEM) (Wakhet, 2014).

- Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los instrumentos para SEM se componen de dos partes principales: la consola electrónica y la columna de electrones. La consola electrónica contiene interruptores que permiten hacer ajustes en el instrumento como el filamento de corriente, la aceleración de voltaje, enfoque, magnificación, brillo y contraste (Cheney, 2005).

La columna de electrones (Figura 10) es donde el haz de electrones se genera al vacío, se enfoca a un diámetro pequeño y se escanea a través de la superficie de una muestra mediante bobinas de deflexión electromagnética. La parte inferior de la columna se llama cámara de muestras. El detector de electrones secundario se encuentra por encima de la plataforma de la muestra dentro de la cámara. Las muestras se montan y fijan a la plataforma que se controla con un goniómetro. Los controles de la etapa manual se encuentran en el lado frontal de la cámara de la muestra y permiten el movimiento x-y-z, rotación de 360° e inclinación de 90° sin embargo no es necesario utilizar todos los controles manuales, porque únicamente la inclinación no puede ser controlada a través del sistema informático (Cheney, 2005).

Es importante contar con un sistema de vacío en la columna de electrones con una presión de al menos  $5 \times 10^{-5}$  Torr por diversos motivos. Uno de ellos es que el filamento emisor de electrones alcanza temperaturas alrededor de los 2700 K cuando se le incide corriente y se puede oxidar y quemar en presencia de aire a presión atmosférica. Otro motivo es que el sistema óptico de la columna requiere un ambiente libre de polvo para trabajar correctamente. Además, si existen partículas de polvo en la columna, éstas pueden interceptar a los electrones evitando que lleguen a la muestra. Por lo general, para asegurar las condiciones de vacío, las columnas cuentan con dos o más bombas de vacío. Existen diferentes sistemas de vacío y algunos generan presiones mayores que otros por lo que dependiendo de la naturaleza de la muestra, puede seleccionarse una u otra

columna. Las de vacío variable, menor, suelen utilizarse para muestras con mala conductividad, baja densidad o inclusive húmedas.

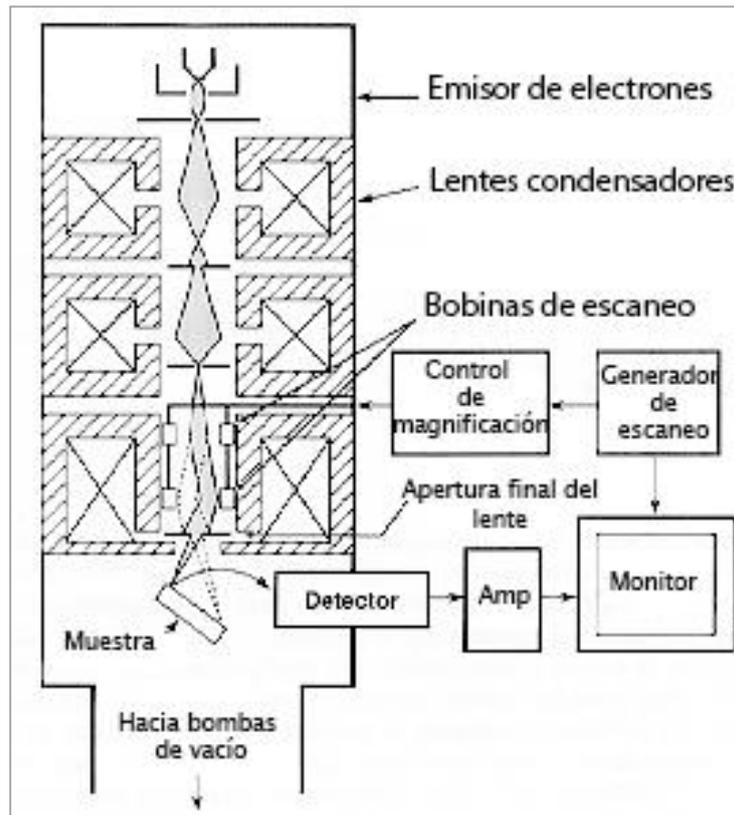


Figura 10. Columna de electrones de SEM modificada de Cheney, 2005.

La resolución que alcanzan estos microscopios se encuentra alrededor de los 25 angstroms. El uso de electrones permite, no solo una excelente resolución, sino que las interacciones entre ellos con la muestra proveen de una variedad de señales que proporcionan información acerca de las características y superficie de la muestra (Cheney, 2005).

En la microscopía electrónica se utilizan dos tipos de señales para visualizar la estructura: electrones secundarios (SEI) y electrones retrodispersados (LBE). Los electrones secundarios son resultado de la colisión inelástica y la dispersión de los electrones con los electrones de la muestra. Se caracterizan por tener energías menores a 50 eV y se utilizan para revelar la estructura superficial de los materiales con una resolución de aproximadamente 10 nm o inclusive mejor (Cheney, 2005).

Los electrones retrodispersados son el resultado de una colisión elástica y un evento de dispersión entre los electrones incidentes y los núcleos o electrones de

la muestra. Los electrones retrodispersados pueden generarse más lejos de la superficie del material y permiten resolver el contraste topográfico y el contraste numérico atómico con una resolución de más de 1 micra. Si bien hay varios tipos de señales que se generan a partir de una muestra bajo un haz de electrones, la señal de rayos X es la que se utiliza usualmente para el microscopio electrónico de barrido. La señal de rayos X es el resultado de interacciones de recombinación entre los electrones libres y los espacios positivos de electrones que se generan dentro del material. La señal de rayos X puede originarse desde más abajo en la superficie de la muestra y permite la determinación de la composición elemental a través del análisis EDS (espectroscopia de rayos X de energía dispersiva) de señales de rayos X características (Cheney, 2005). Para obtener mejores imágenes a veces se recurre a usar tanto la información de los electrones secundarios como la de los retrodispersados y a esto se le conoce como LEI.

Existen tres parámetros principales que controlar para obtener imágenes satisfactorias en una microscopía de barrido. La primera es la aceleración del voltaje, entre mayor sea este se obtendrá una mejor resolución, pero se perderá claridad de estructuras, los bordes se verán demasiado marcados y la muestra sufrirá más daño, entre menor sea se tendrá peor resolución, pero será posible tener mejor claridad en la superficie de las estructuras sin ocasionar tanto daño a la muestra, por lo que debe elegirse la adecuada para cada material. La aceleración de voltaje puede ir de 200 V a 30 kV y a partir de 15 kV se considera un voltaje alto (Cheney, 2005).

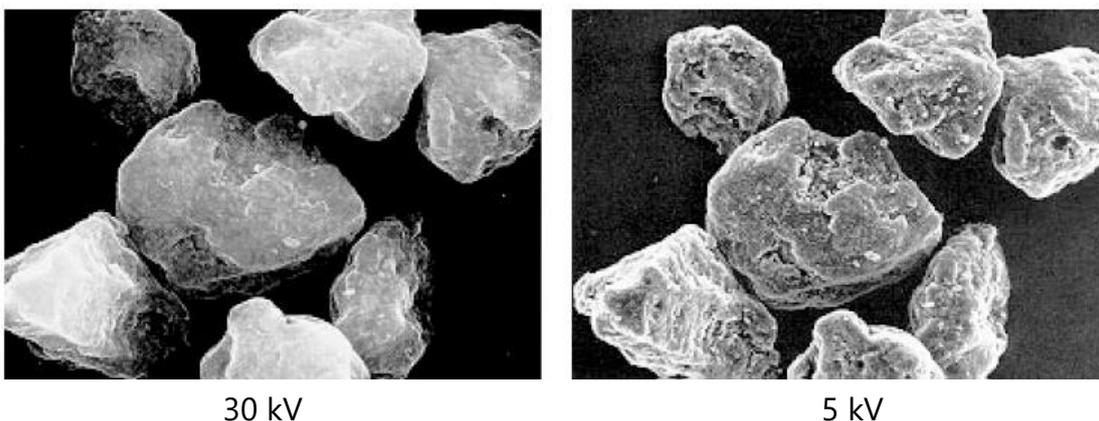
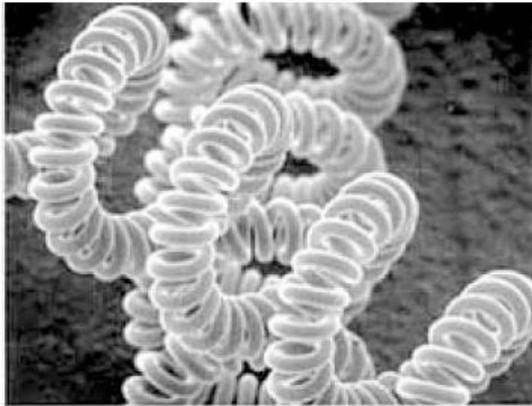


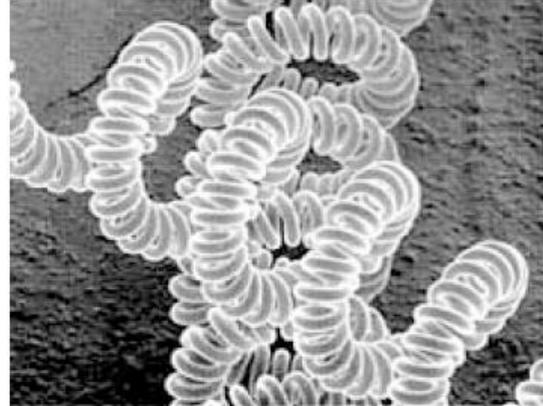
Figura 11. Mismo material a diferentes aceleraciones de voltaje modificada de Cheney, 2005.

Otro parámetro es la distancia de trabajo que se refiere a la posición del detector con respecto a la muestra. Al aumentar la resolución se mejora la resolución, pero se pierde profundidad de campo. Por lo tanto, una distancia de trabajo adecuada

suele estar alrededor de 10 mm para mantener buena profundidad de campo y buena resolución (Cheney, 2005).



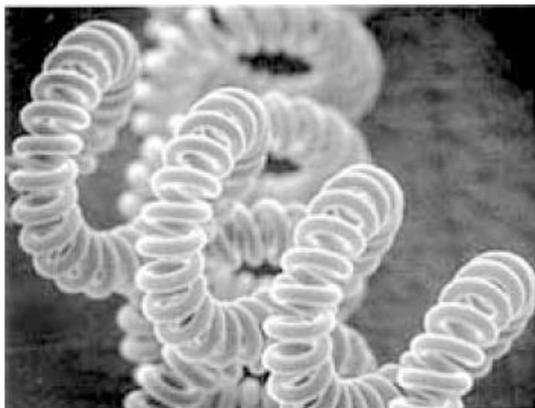
10 mm



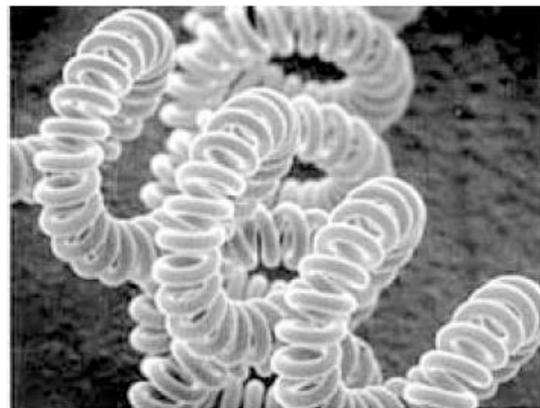
38 mm

Figura 12. Mismo material a diferentes distancias de trabajo (Cheney, 2005).

El último parámetro es el tamaño del punto que restringe básicamente la corriente del haz y por lo tanto causará compensaciones de brillo y contraste, mientras más aumenta se pierde resolución y profundidad de campo, pero es importante que se permita el paso de corriente necesario para que se vean claramente las imágenes (Cheney, 2005).



600 micrones



200 micrones

Figura 13. Mismo material a diferentes tamaños de punto (Cheney, 2005).

#### 3.4.4 Liberación

Las pruebas de disolución *in-vitro* juegan un papel importante en el desarrollo de la formulación del fármaco y el control de calidad. Se puede utilizar no solo como una herramienta para controlar la consistencia y la estabilidad de los productos farmacológicos, sino también como una forma relativamente rápida y económica para predecir la liberación y absorción *in-vivo* de un fármaco en alguna forma farmacéutica en específico (Karuppiyah, 2012).

Los aparatos 1 y 2 de la FEUM han sido utilizados ampliamente para realizar las pruebas de liberación de diversas formas farmacéuticas de liberación modificada. Es importante que las condiciones de la prueba sean parecidas a las de la zona de liberación *in-vivo* por lo que se ha recurrido al empleo de soluciones amortiguadoras de cierto pH, concentración osmótica, etc. La temperatura y velocidad de agitación también influyen enormemente la disolución de los fármacos por lo que debe controlarse (Karuppiyah, 2012).

Es necesario que el sistema se encuentre en condiciones "*sink*", es decir, que el volumen del medio sea de 5 a 10 veces mayor al volumen mínimo requerido para disolver toda la dosis del fármaco con el propósito de evitar que exista saturación y que ésta altere su disolución y, por lo tanto, la liberación.

La mayor parte de los perfiles de disolución no muestran comportamientos que se acoplen ecuaciones lineales por lo que se han desarrollado varios modelos matemáticos, algunos empíricos, que permiten la interpretación de los mismos. También es importante poder evaluar la similitud entre perfiles de disolución para asegurar que se tiene una liberación controlada en la forma farmacéutica, para esto, se pueden llevar a cabo diversos tratamientos matemáticos como los análisis de varianza y las pruebas de factores de similitud "*f*" (Zhang, Huo, Zhou, et al. 2010).

El complemento de Excel DDSolver tiene como propósito facilitar el modelado de datos de disolución utilizando métodos de optimización no lineal basados en una biblioteca de modelos incorporada que contiene cuarenta modelos de disolución, simplificar la tarea de evaluar la similitud entre perfiles de disolución utilizando varios enfoques populares, y acelerar el cálculo, reducir los errores del usuario y proporcionar una forma conveniente de informar los datos de disolución de forma rápida y fácil (Zhang, Huo, Zhou, et al. 2010).

## 4.0 Metodología

Los diagramas se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Dianne Galloway en el libro *Mapping Work Processes* de ASQ (*American Society for Quality*)

### 4.1 Fabricación del gel

Se pesa la progesterona y los demás excipientes dependiendo de la cantidad de gel que se desea preparar siguiendo las proporciones indicadas en la Tabla 4. Se prepara la dispersión sólida fundiendo el PEG 6000 a 70°C en una caja Petri usando una parrilla de calentamiento. Posteriormente, se adicionan los componentes de la formulación indicados en la Tabla 5. dependiendo del gel que se desee preparar, se agita con una varilla de vidrio para dispersar y se retira de la fuente de calentamiento. Se deja enfriar a temperatura ambiente y después se resguarda a una temperatura de 4°C por 1 hora. Transcurrido este tiempo se muele finamente utilizando un mortero, se coloca en un matraz volumétrico del volumen adecuado y se afora con la mezcla de etanol:agua. Inmediatamente se almacena en un contenedor de vidrio ámbar. En el caso del gel PPG, el Kollicoat® MAE 30 DP se dispersará etanol:agua y se colocará en el matraz volumétrico antes de adicionar la dispersión sólida molida. Es importante resaltar que siempre que se trabaje con progesterona es necesario evitar su exposición a la luz para evitar su degradación.

Tabla 4. Formulación de los geles de formación *in-situ* de progesterona.

Componente	Información	Composición
<b>Progesterona</b>	NA	10%
<b>PEG 6000</b>	Fluka Chemika, Suiza	20%
<b>Kollicoat® MAE 30 DP</b>	Basf, Alemania	3%
<b>EtOH:H<sub>2</sub>O 75:25</b>	Etanol: Analitika, México	Cbp

Tabla 5. Composición de los diferentes geles de formación *in-situ*.

Gel	Componentes en la DS	Componentes en EtOH:H <sub>2</sub> O
<b>Patente</b>	Ninguno	PEG 6000, Kollicoat® MAE 30 DP y progesterona
<b>PK</b>	PEG 6000 y Kollicoat® MAE 30 DP	Ninguno
<b>PPG</b>	PEG 6000 y progesterona	Kollicoat® MAE 30 DP
<b>PPGK</b>	PEG 6000, Kollicoat® MAE 30 DP y progesterona	Ninguno

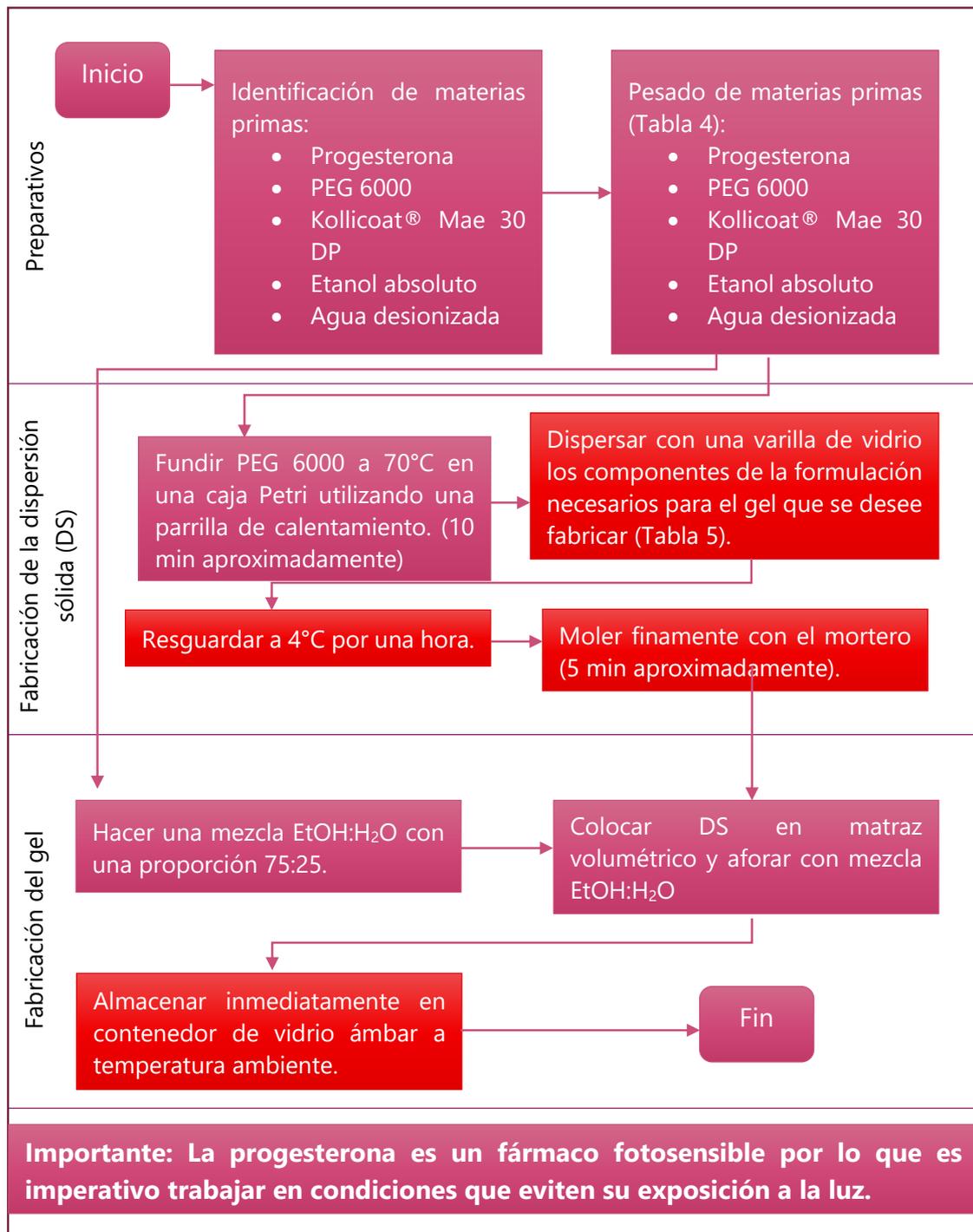


Figura 14. Esquema del proceso de fabricación de los geles de formación *in-situ*. Se resaltan en rojo los puntos críticos del proceso.

#### 4.2 Reología

Se midieron las propiedades reológicas de los diferentes geles (Tabla 5) y de cada uno de los excipientes de la formulación a la concentración indicada en la Tabla 4 utilizando la mezcla de etanol:agua como vehículo. Las mediciones se realizaron en un reómetro de esfuerzos controlados Hybrid Discovery HR-3 usando una 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 tanto de cizalla oscilatoria como de cizalla simple. Estos flujos están en el intervalo de observación de las pruebas mecánicas realizadas para una administración con jeringa de acuerdo con las condiciones previamente determinadas por nuestro grupo de trabajo.

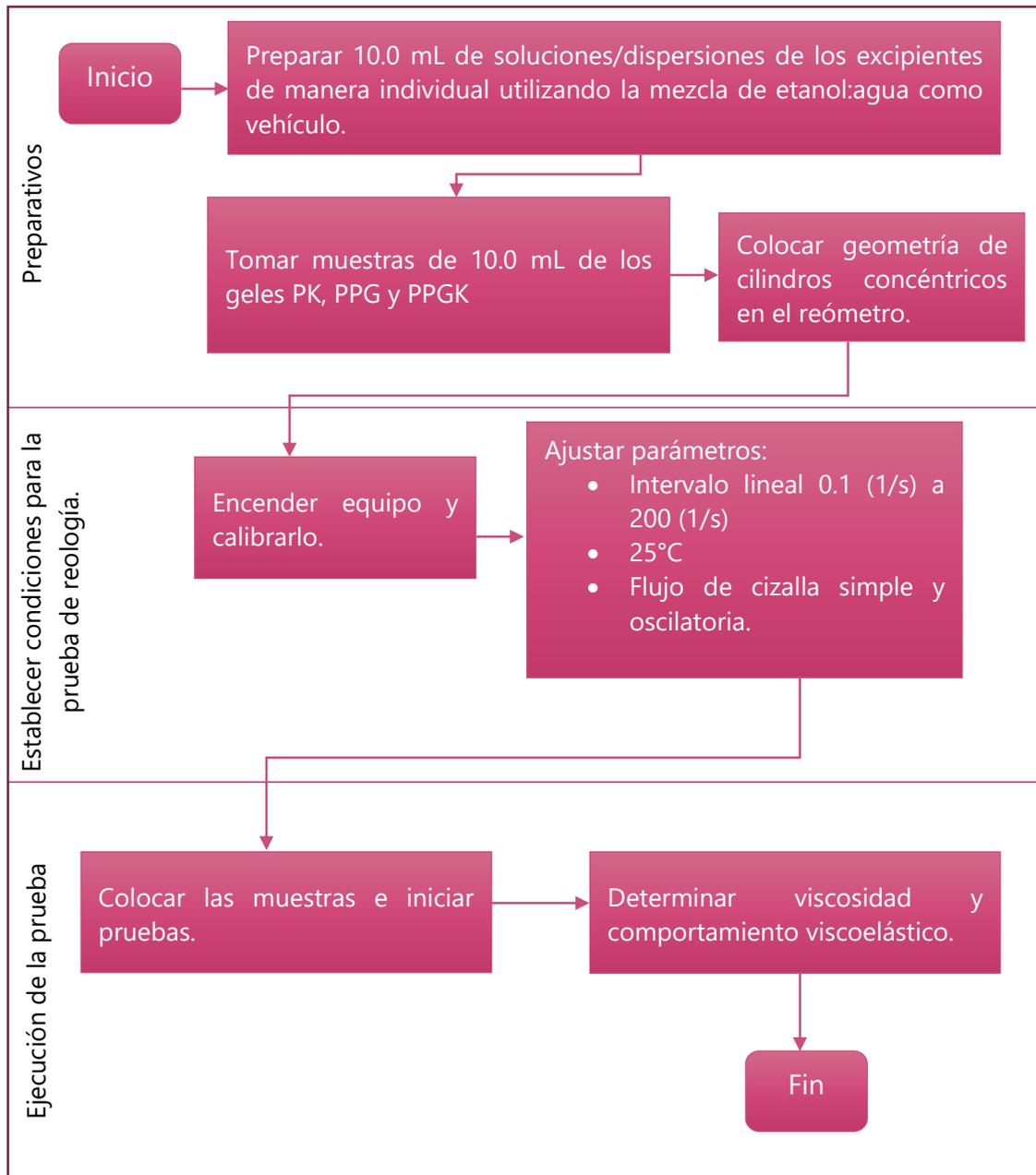


Figura 15. Esquema del proceso de evaluación de la reología de los geles de formación *in-situ* y de sus excipientes.

### 4.3 Valoración

Se realizó la validación para la cuantificación de progesterona en el gel fabricado con DS de PPGK utilizando un espectrofotómetro AIS DT000CE-130 acorde a la Guía de Validación para Métodos Analíticos del Colegio Nacional de QFB's (Anexos 1 y 2). Las pruebas realizadas fueron precisión, especificidad y linealidad del sistema, y exactitud, repetibilidad, linealidad y precisión del método.

Para la valoración se fabricaron 5 lotes diferentes del gel PPGK de 5.0 mL cada uno. Posteriormente, se colocaron en matraces volumétricos de 50.0 mL y se aforaron con metanol QP Química Alvi México, después se hizo otra dilución para llegar a una concentración final de 50 µg/mL. Las muestras se midieron a una longitud de onda de 263.05 nm utilizando un espectrofotómetro AIS DT000CE-130 y los datos obtenidos se interpolaron en su respectiva curva de calibración (Anexo 2, Figura 55).

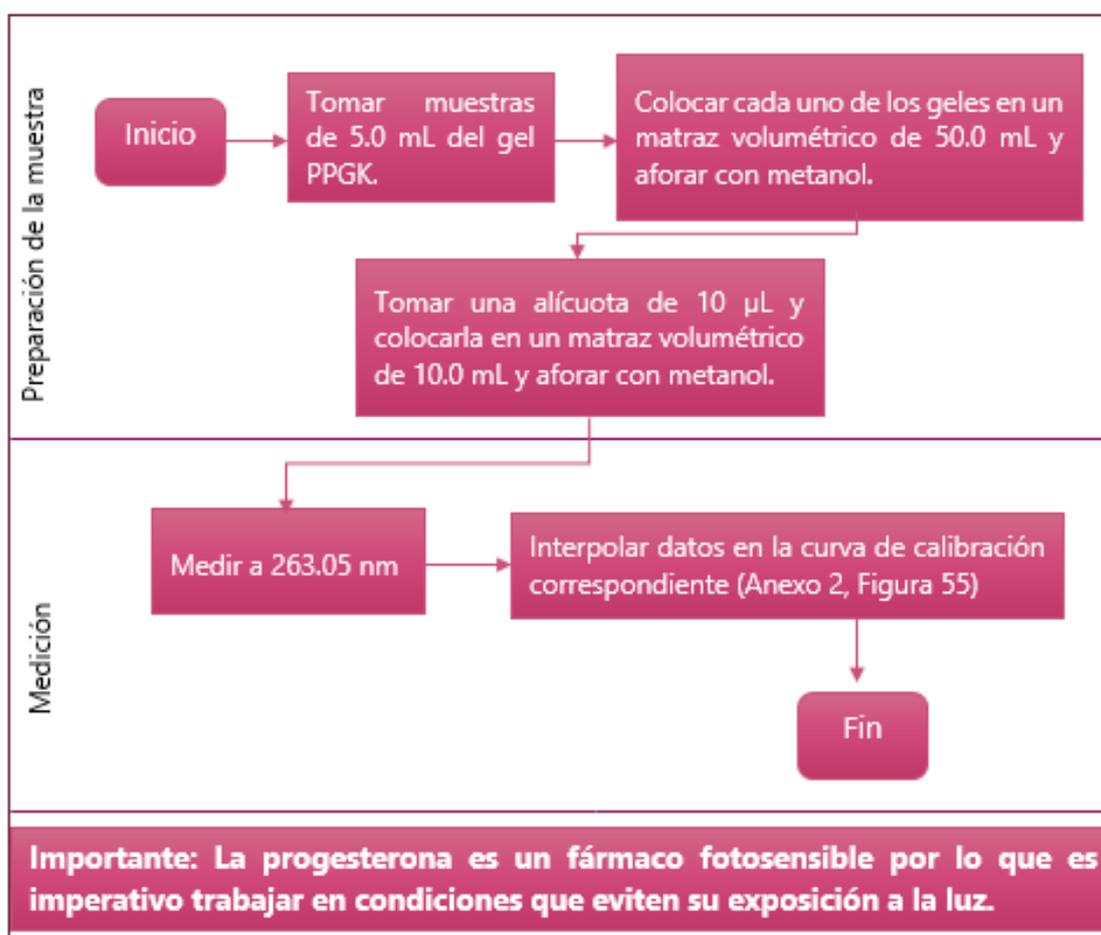


Figura 16. Esquema del proceso de valoración de los geles de formación *in-situ* DS de PPGK.

#### 4.4 Determinación del pH

Se prepararon 5 geles de formación *in-situ* con DS de PPGK y se diluyeron en una relación de 1:2 con la mezcla etanol:agua (Tabla 4). Se midió el pH a temperatura ambiente con un potenciómetro Thermo ELECTRON CORPORATION ORION 3 STAR pH Benchtop.

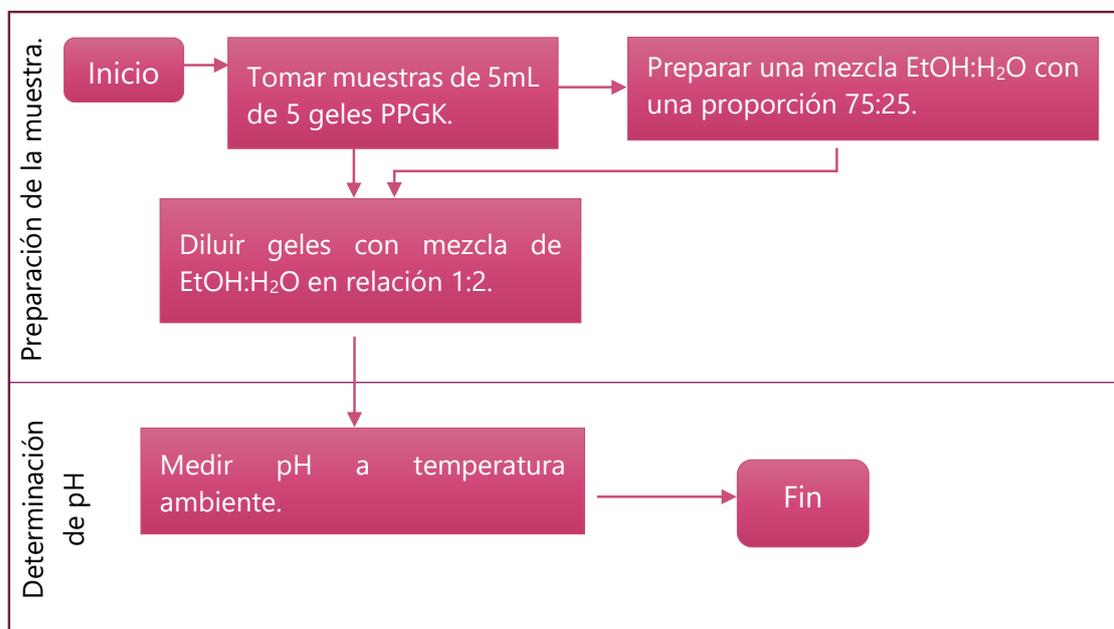


Figura 17. Esquema del proceso de determinación del pH de los geles de formación *in-situ* DS de PPGK.

#### 4.5 Inyectabilidad

Se armó una estructura para mantener fija una jeringa de plástico BD de 25.0 mL con aguja 32G x 1/2" utilizando pinzas de tres dedos y dos soportes universales. El esquema general se ilustra en la Figura 18. Se utilizó un texturómetro MultiTest™ 1-í con una celda de carga de 50 N y se utilizó un programa de compresión del sistema Emperor™ Force Testing System de MECMESIN FORCE & TORQUE TEST SOLUTIONS. La velocidad se ajustó a 50 mm/min, la rotura al 100%, la carga máxima a 40 N y el desplazamiento a 60 mm. La prueba se realizó a temperatura ambiente. Se determinó la fuerza necesaria para inyectar 8 muestras del gel de formación *in-situ* con dispersión sólida de PPGK en aire. Como blanco se determinó la fuerza necesaria para desplazar el émbolo de la jeringa vacía después de hacer la calibración del instrumento.

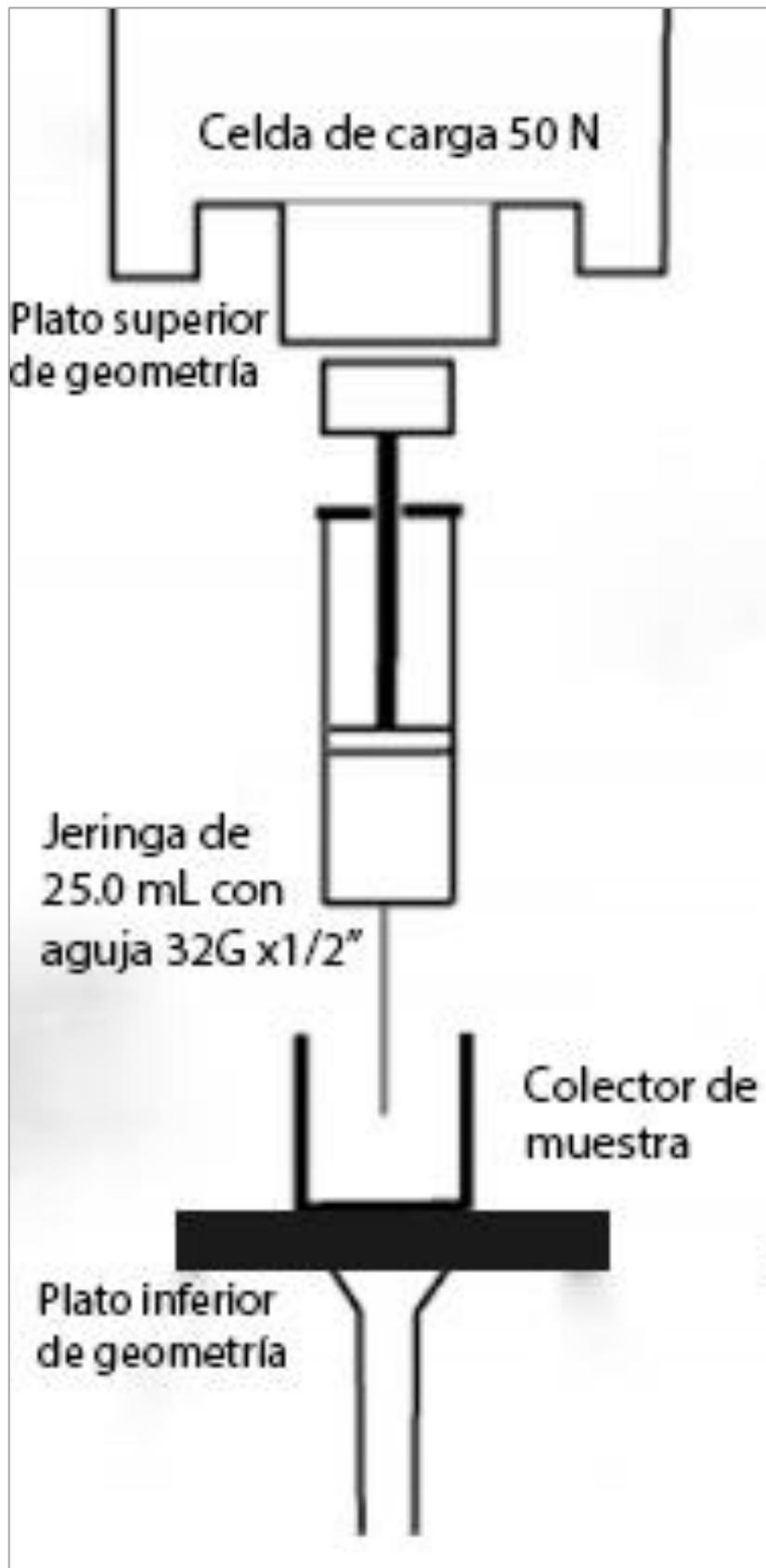


Figura 18. Esquema del arreglo de la jeringa en el texturómetro basada en "Figure 1" (Allaham, Mainwaring, Stewart, et al. 2004)

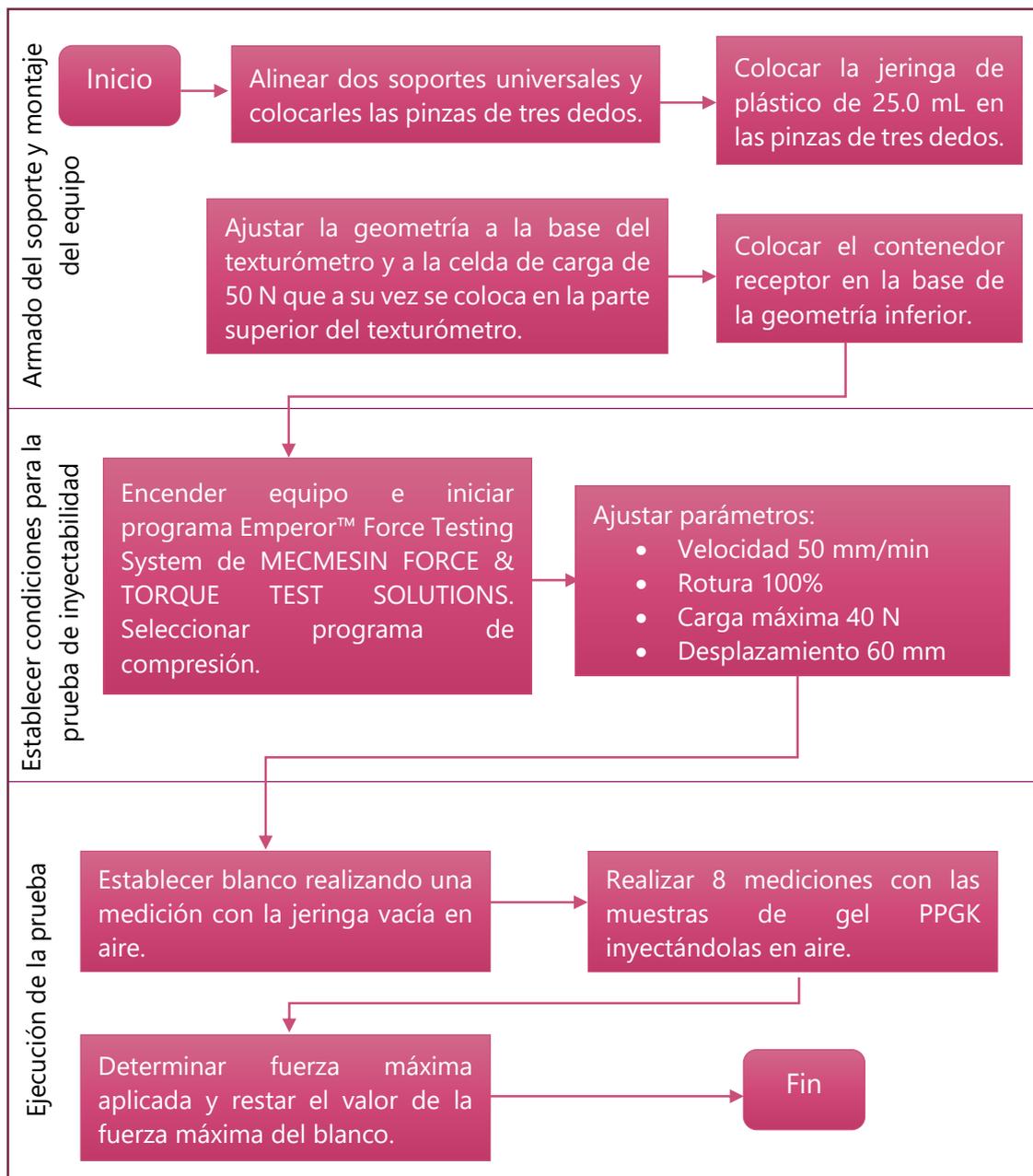


Figura 19. Esquema del proceso de medición de la inyectabilidad de los geles de formación *in-situ* DS de PPGK.

#### 4.6 Formación del implante

Se inyectó 1 mL de gel con dispersión sólida de PPGK en una gelatina de grenetina al 2.5% contenida en un tubo de ensayo y se observó la formación del gel. Al día siguiente, se retiró el implante ya formado, se colocó en un fondo claro y se describió físicamente.

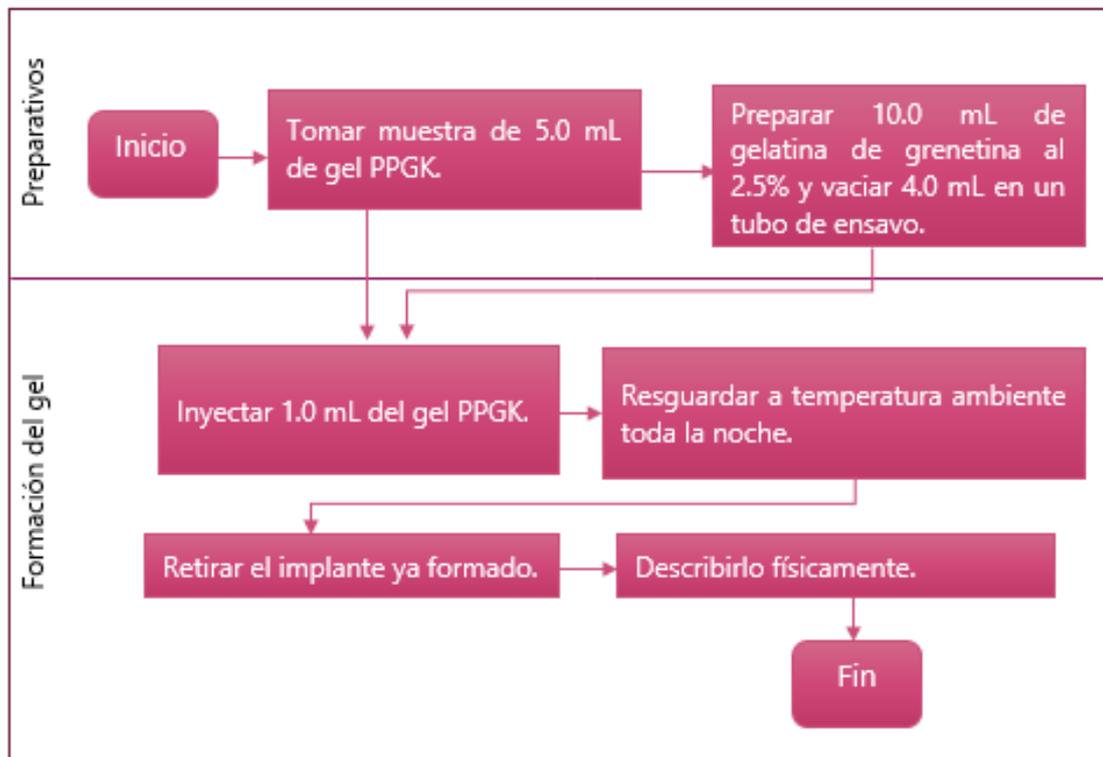


Figura 20. Esquema del proceso de evaluación de la formación de los geles de formación *in-situ* DS de PPGK.

#### 4.7 Velocidad de intercambio de disolventes

Se colocó 1 mL del gel DS de PK en un tubo de ensayo de diámetro 0.5 cm y se colocó invertido en un vaso de precipitados con agua y colorante rojo fresa (Droguería Cosmopolitan, México), se observó 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 durante 70 min, al finalizar el tiempo, se midió la zona roja en el gel con la ayuda de una regla.

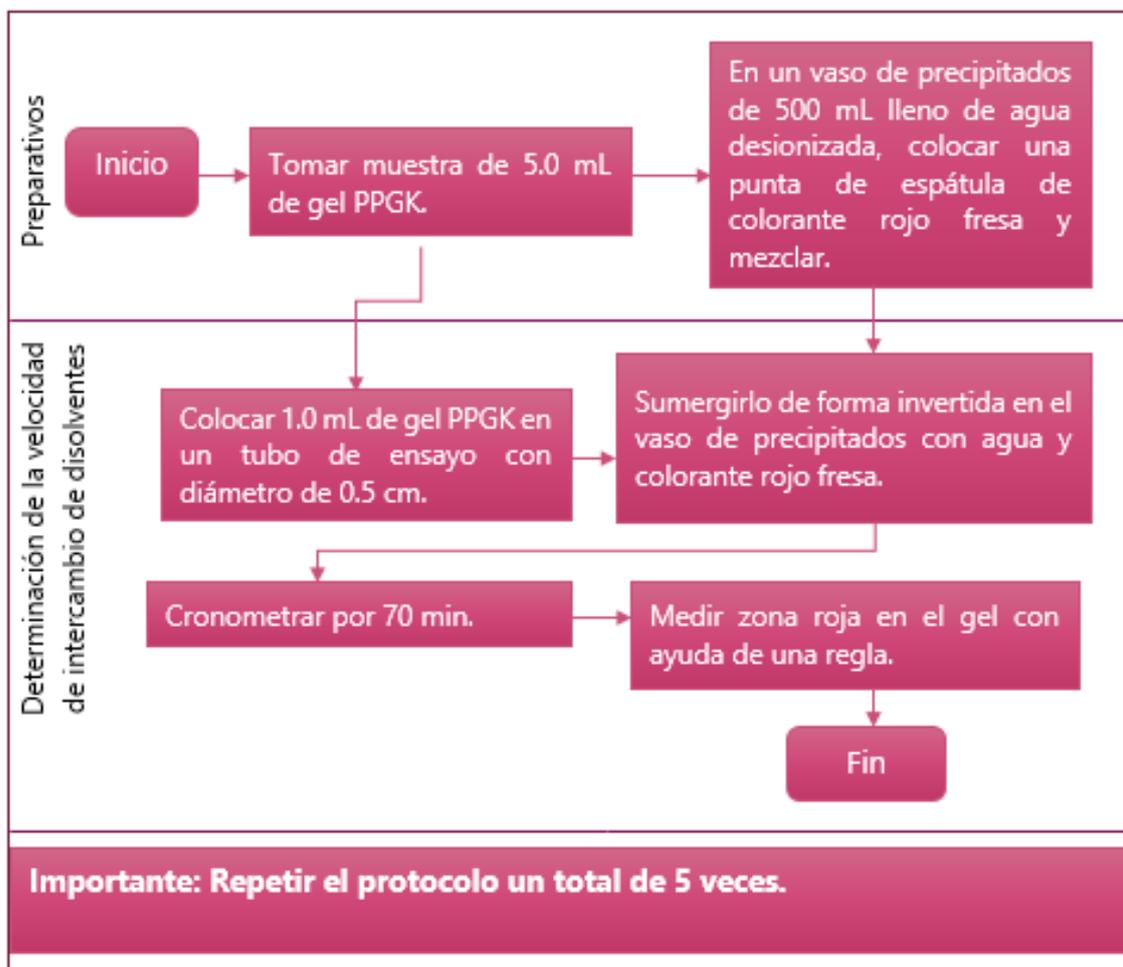


Figura 21. Esquema del proceso de evaluación de la velocidad de intercambio de disolventes en los gels de formación *in-situ* DS de PPGK.

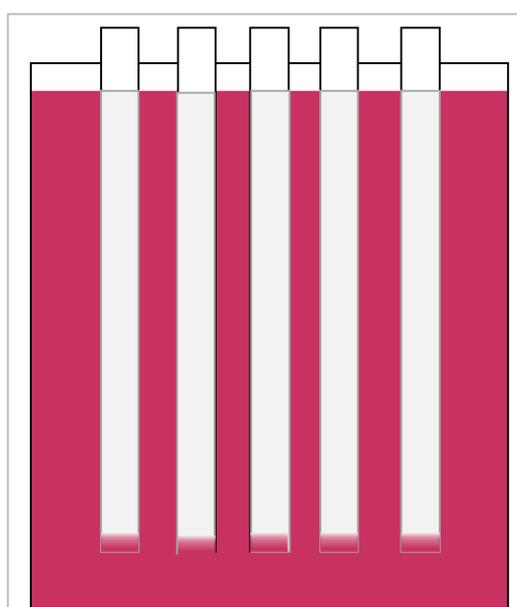


Figura 22. Esquema del experimento de intercambio de solventes.

#### 4.8 Morfología microscópica del implante de formación *in-situ* de progesterona.

Se inyectaron los geles de DS de PK y DS de PPGK en gelatina de grenetina al 2.5% y 3 días después se retiraron los implantes ya formados, se les hicieron cortes y las muestras se sometieron a liofilización, previa congelación con nitrógeno líquido, a  $-45^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas, posteriormente, las muestras fueron recubiertas con oro con el equipo JEOL FINE COAT ION SPUTTER JFC-1100. Se obtuvieron las imágenes con la técnica de microscopía de barrido electrónico, SEM, por sus siglas en inglés y se utilizó el microscopio JEOL JSM-7600F a 10.0 KV.

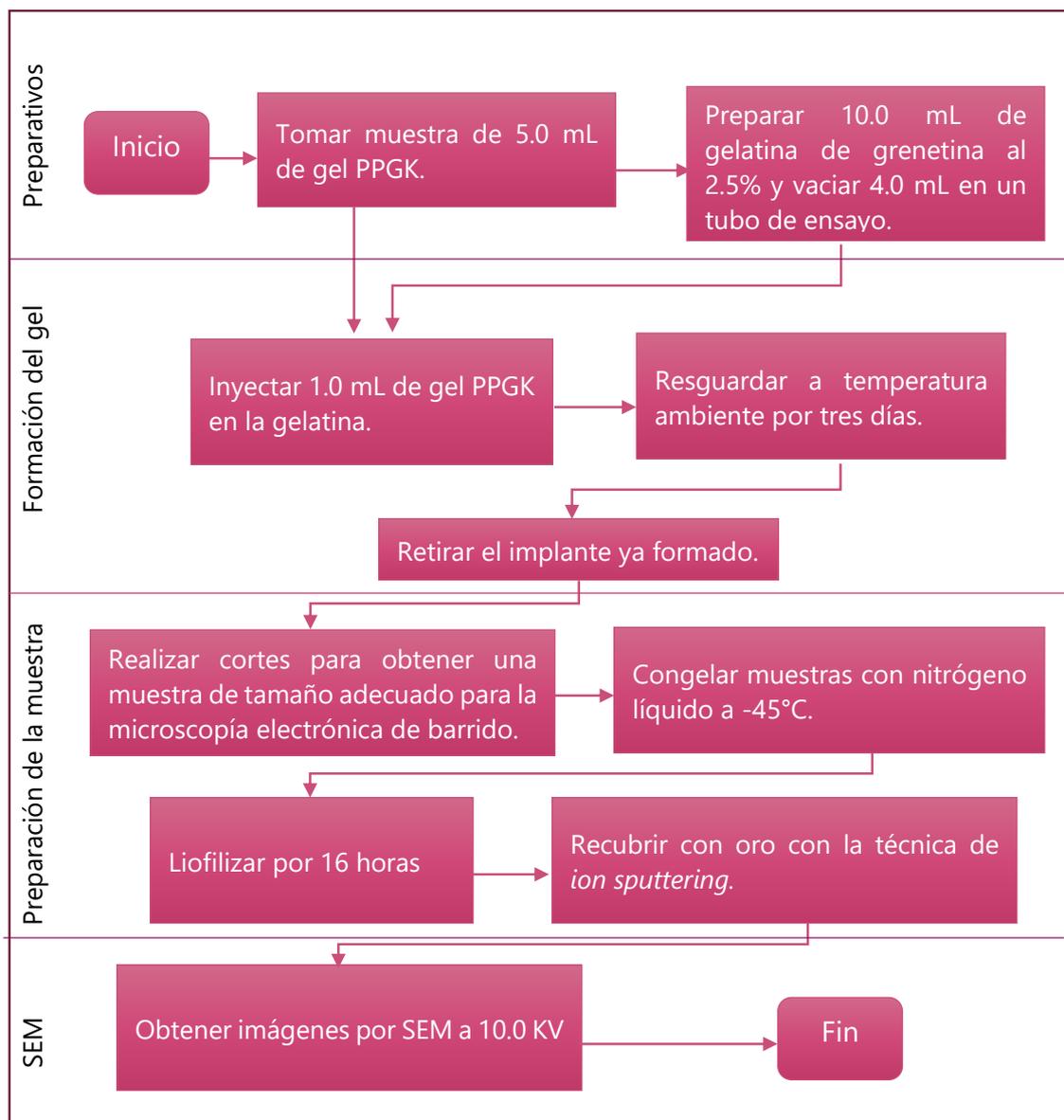


Figura 23. Esquema del proceso de la evaluación de la morfología microscópica de los implantes de formación *in-situ* DS de PPGK y DS de PK.

#### 4.9 Liberación *in-vitro*

Se utilizó el Aparato 1 de la FEUM, el disolutor era el SR8PLUS de la marca Hanson Research, EUA. Como medio se utilizaron 900 mL de una solución de agar al 0.5% y SDS al 0.25% como indica la FDA para mantener condiciones "sink". El medio se mantuvo a  $39.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , con agitación de 75 rpm por dos días. Se evaluó la liberación de 1.0 mL de gel con DS de PPGK. Los tiempos de muestreo se indican en el anexo 4. La toma de muestra se realizó con una jeringa de 5.0 mL con aguja de 33G x 1/2" en el borde del vaso a 5 cm de profundidad aproximadamente, el tamaño de la muestra fue de 5.0 mL. El baño de agua se cubrió con tela negra para evitar el contacto, y por lo tanto la degradación, de la progesterona con la luz. Las muestras tomadas se colocaron inmediatamente en viales color ámbar. Para la extracción de progesterona del medio de disolución se adicionan al vial 5.0 mL de metanol, se agita y se deja reposando por 2 horas, posteriormente se filtran usando embudos de filtración rápida y papel filtro. Finalmente se leen a 250.22 nm y los datos obtenidos se interpolan en la curva patrón obtenida en la validación del método de cuantificación de la prueba de liberación (Anexo 3, Figura 61).

Previamente se realizaron pruebas para ver la estabilidad del principio activo en el medio de disolución y también para determinar la eficacia del método de extracción, los resultados se encuentran en el Anexo 4.

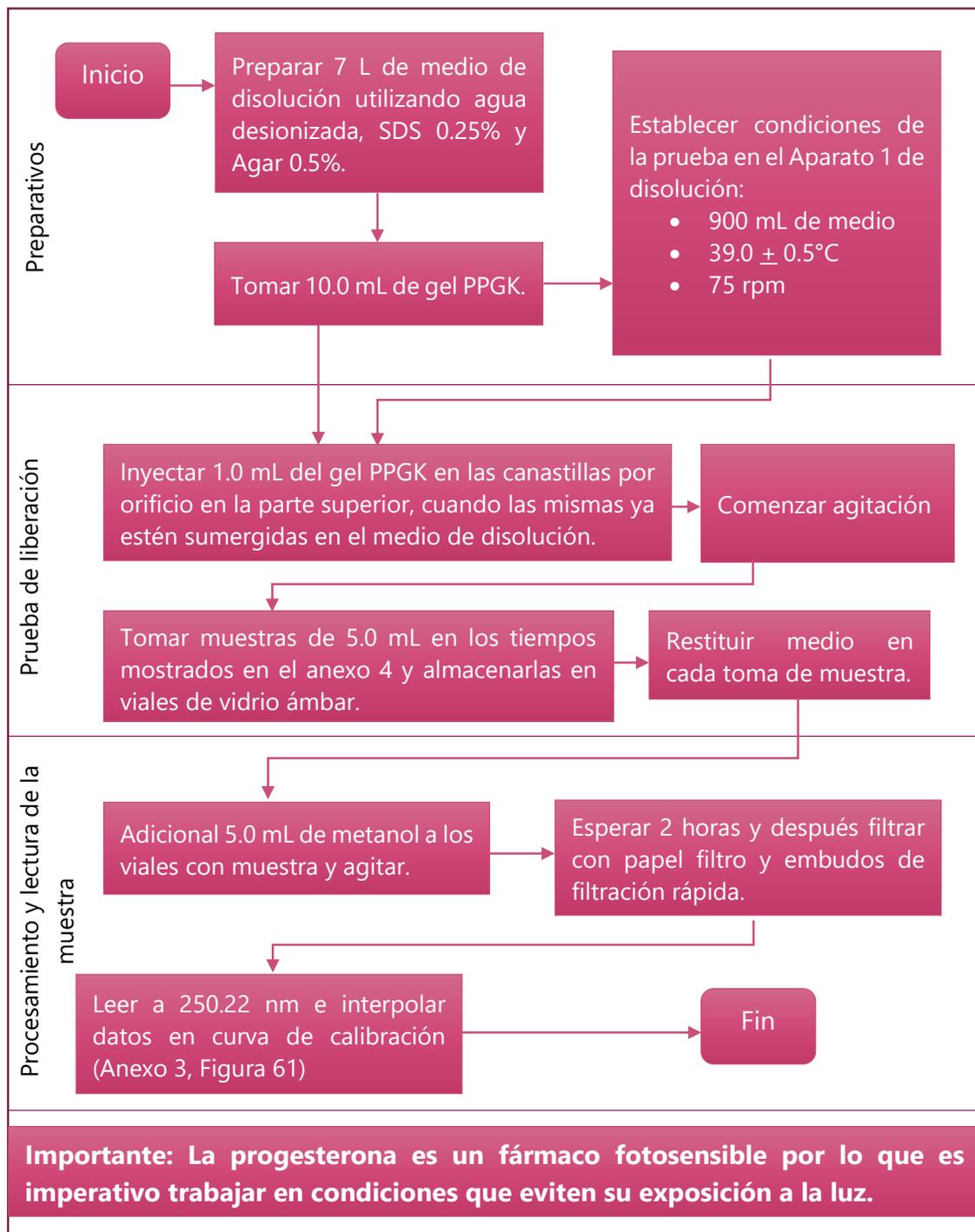


Figura 24. Esquema del proceso de la prueba de liberación de los gels de formación *in-situ* DS de PPGK

## 5.0 Resultados y discusión

### 5.1 Fabricación del gel

Se obtuvieron 3 geles a partir de dos dispersiones sólidas diferentes (Tabla 5). A continuación, se presenta una tabla donde se hará la comparación visual de las suspensiones obtenidas.

Tabla 6. Descripción visual del gel de la patente MX/a/2015/007665 y de los geles de formación *in-situ* fabricados con diferentes dispersiones sólidas.

<b>Dispersión sólida</b>	<b>Apariencia</b>
Ninguna (Patente)	Suspensión con sedimento muy difícil de re-suspender (cake), adherencia alta del fármaco a las paredes del vial.
PPG	Suspensión con sedimento difícil de re-suspender, adherencia media del fármaco a las paredes del vial contenedor.
PPK	Suspensión con sedimento fácil de re-suspender y baja adherencia del fármaco a las paredes del vial contenedor.

Los resultados indican que, al utilizar la técnica de dispersión sólida, el polímero, PEG 6000 y la progesterona presentaron un cambio en su interacción con los disolventes, lo cual mejoró la estabilidad de la suspensión evitando la formación del "cake", sedimento casi imposible de re-suspender, presente en la formulación original sin ninguna dispersión sólida.

La técnica de dispersión sólida permite mejorar la interacción de un fármaco hidrofóbico con su medio acuoso gracias a que puede mejorar la solubilidad de los mismos. Esto se debe a que la progesterona cambia de estado cristalino a amorfo, además, se disminuye el tamaño de partícula, dando como consecuencia un incremento en el área superficial, y a que aumenta la humectabilidad del fármaco debido a la naturaleza hidrofílica del PEG 6000 (Nikghalb, Singh, Singh, 2012).

La transición de estado cristalino a amorfo se debe a que el fármaco, el PEG 6000 y el copolímero de acrilatos recristalizan en conjunto, evitando la formación de estructuras cristalinas. Las moléculas en su forma amorfa son más solubles ya que la energía necesaria para romper los enlaces es menor que la necesaria en las cristalinas (Taylor, Zografi, 1997). Las estructuras amorfas tienen una cantidad mayor de energía interna que las cristalinas por lo que no se requiere energía adicional para que formen interacciones con las moléculas de disolventes, favoreciendo su disolución (Singh, Van den Mooter, 2016).

## 5.2 Reología

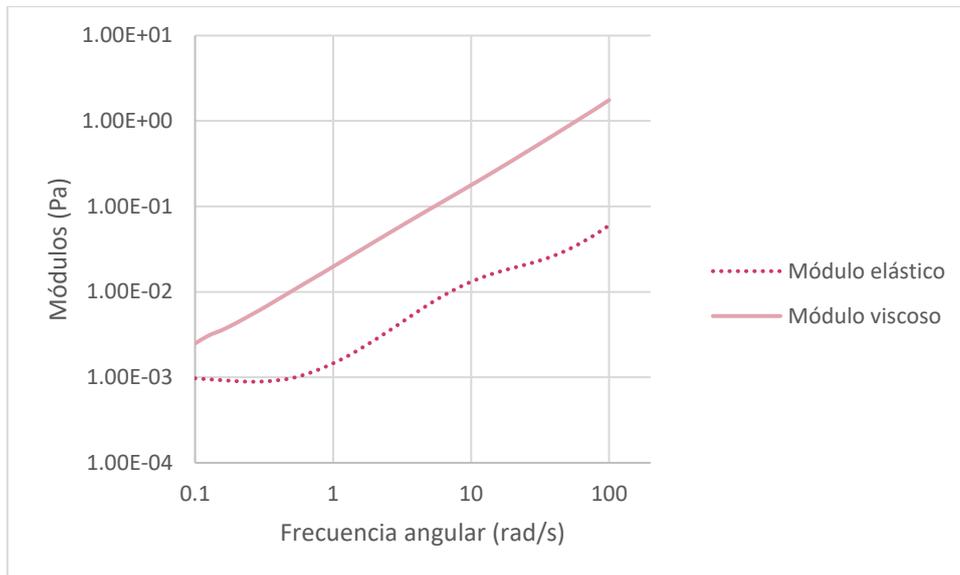


Figura 25. Estudio reológico de PEG 6000 disuelto en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando flujo de cizalla oscilatoria.

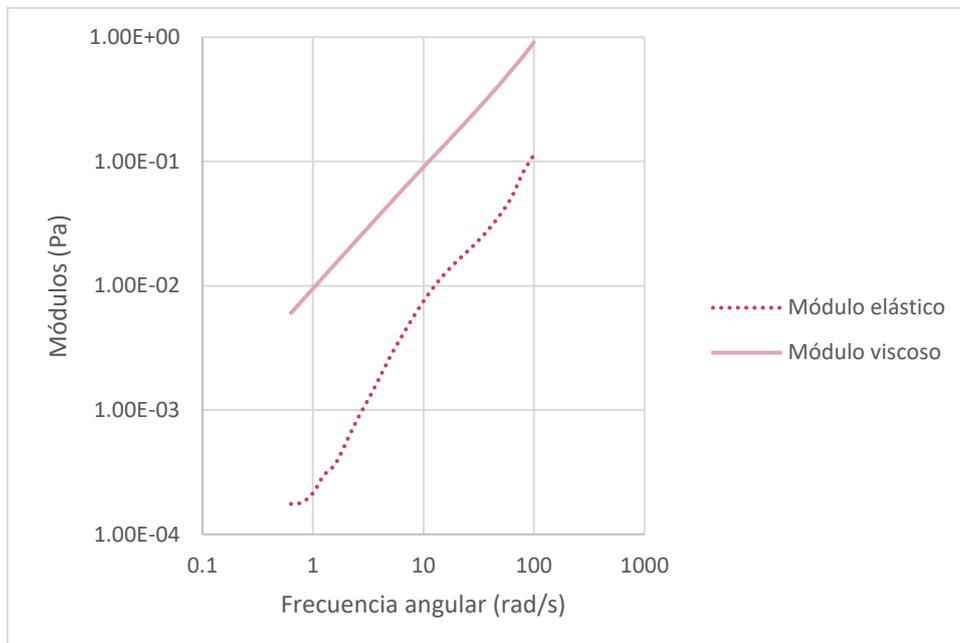


Figura 26. Estudio reológico de Kollicoat<sup>®</sup> MAE 30 DP dispersado en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando flujo de cizalla oscilatoria.

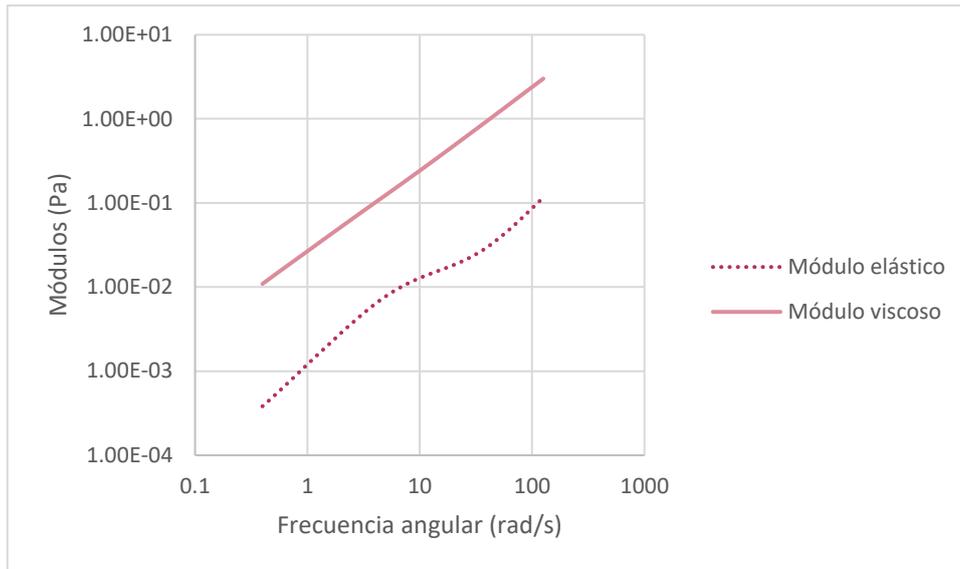


Figura 27. Estudio reológico de una dispersión sólida de PEG 6000 con Kollicoat® MAE 30 DP dispersada en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando flujo de cizalla oscilatoria.

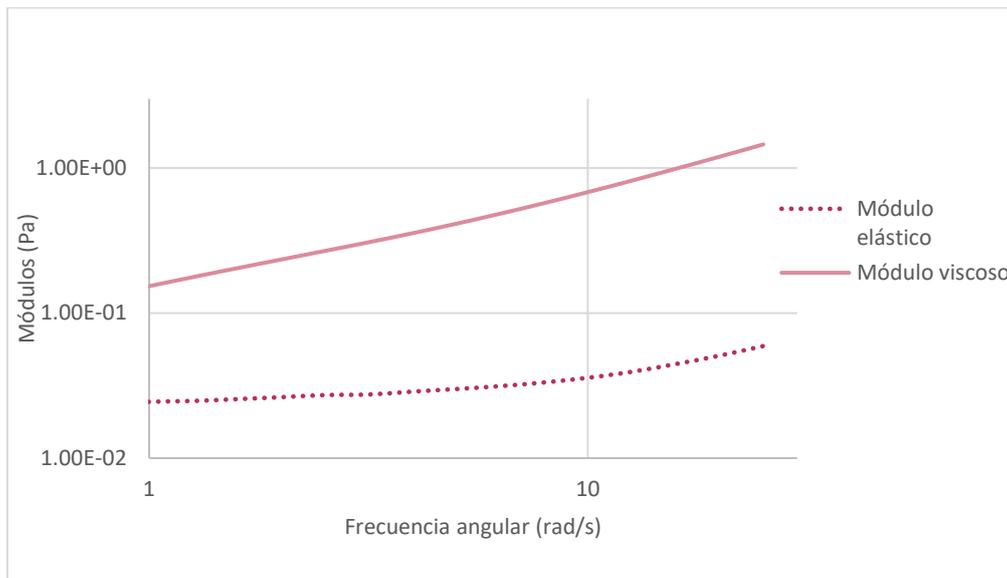


Figura 28. Estudio reológico de una dispersión sólida de PEG 6000 con Progesterona dispersada en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O con Kollicoat® MAE 30 DP usando flujo de cizalla oscilatoria.

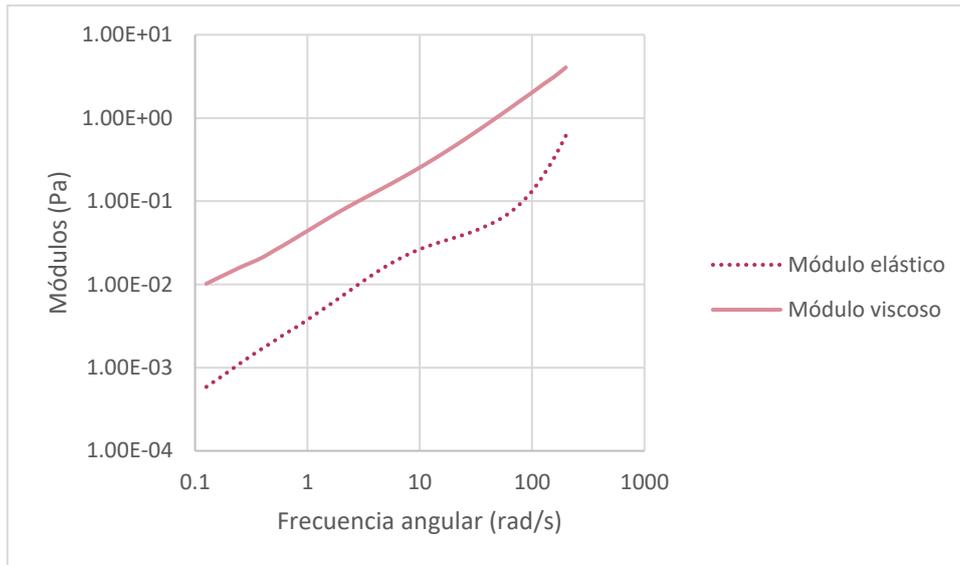


Figura 29. Estudio reológico de una dispersión sólida de PEG 6000 con Progesterona y Kollicoat® dispersada en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando flujo de cizalla oscilatoria.

En las pruebas en las que se utilizó un flujo de cizalla oscilatoria se obtuvieron comportamientos viscoelásticos muy similares (Figuras 25-29) donde se tiene un predominio del módulo viscoso sobre el elástico sin importar la frecuencia angular empleada. El módulo viscoso representa la energía que se pierde en el sistema al aplicar una fuerza paralela a la muestra mientras que el módulo elástico se refiere a la cantidad de energía que se almacena en el sistema. Al ser mayor la pérdida de energía que su almacenamiento, los sistemas fluyen. Por lo tanto, todas las muestras analizadas se consideran como fluidos con propiedades viscoelásticas. Esto sugiere que se trata de fluidos estructurados que pueden o no tener comportamiento newtoniano.

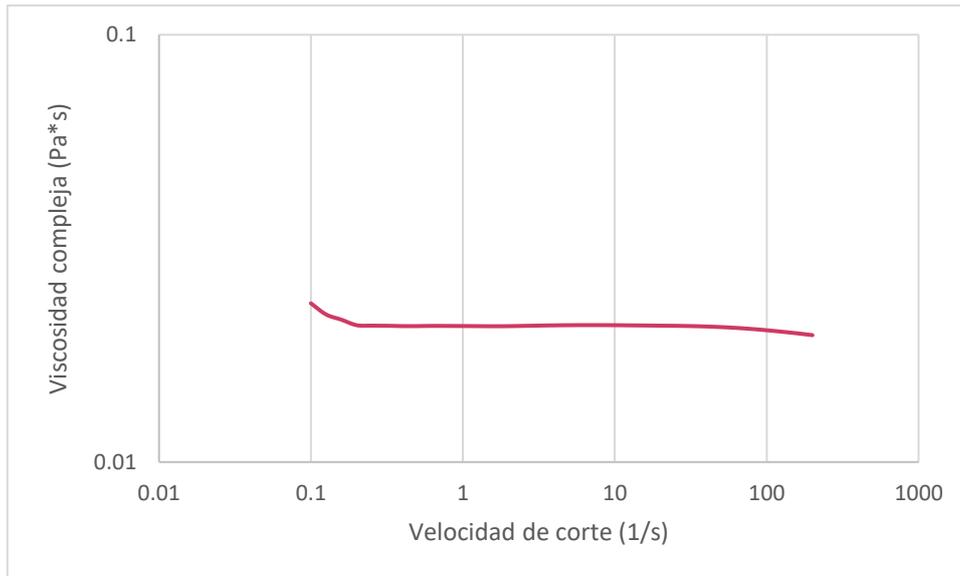


Figura 30. Estudio reológico de PEG 6000 disuelto en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando flujo de cizalla simple.

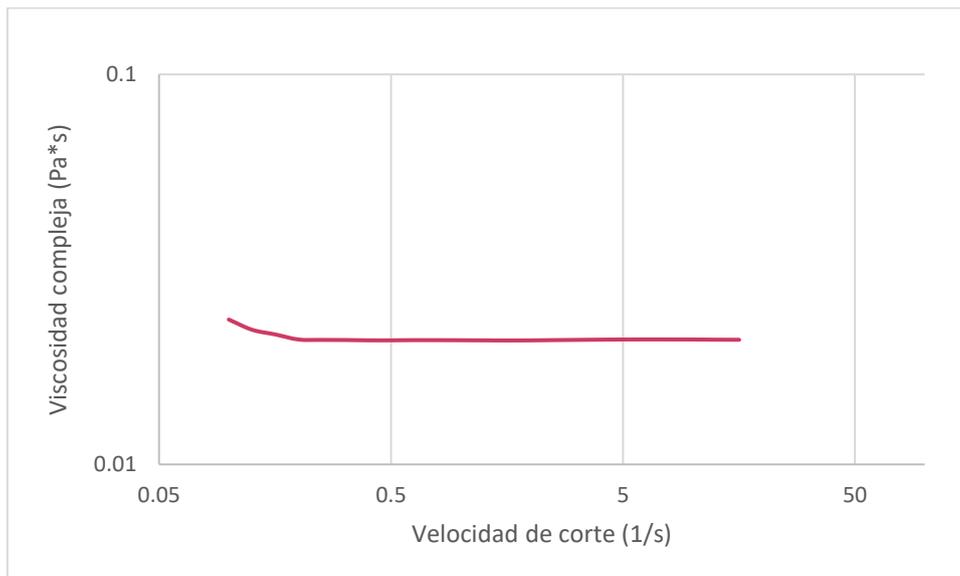


Figura 31. Estudio reológico de Kollicoat® MAE 30 DP disuelto en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando flujo de cizalla simple.

En las figuras 30 y 31 se observa que la viscosidad de los excipientes en disoluciones independientes es constante sin importar la velocidad de corte aplicada cuando se utiliza un flujo de cizalla simple, es decir, se comportan como fluidos newtonianos.

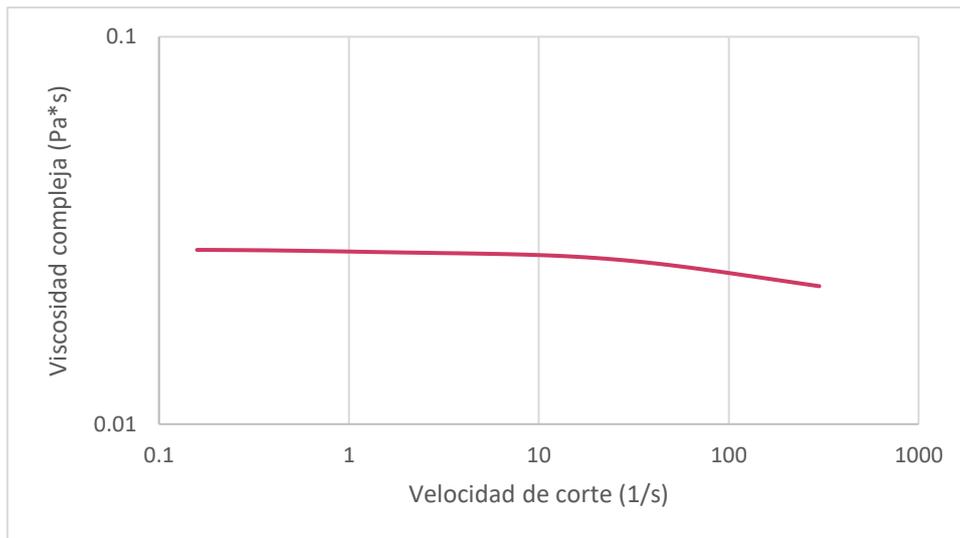


Figura 32. Estudio reológico de una dispersión sólida de PEG 6000 con Kollicoat® MAE 30 DP dispersada en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando flujo de cizalla simple.

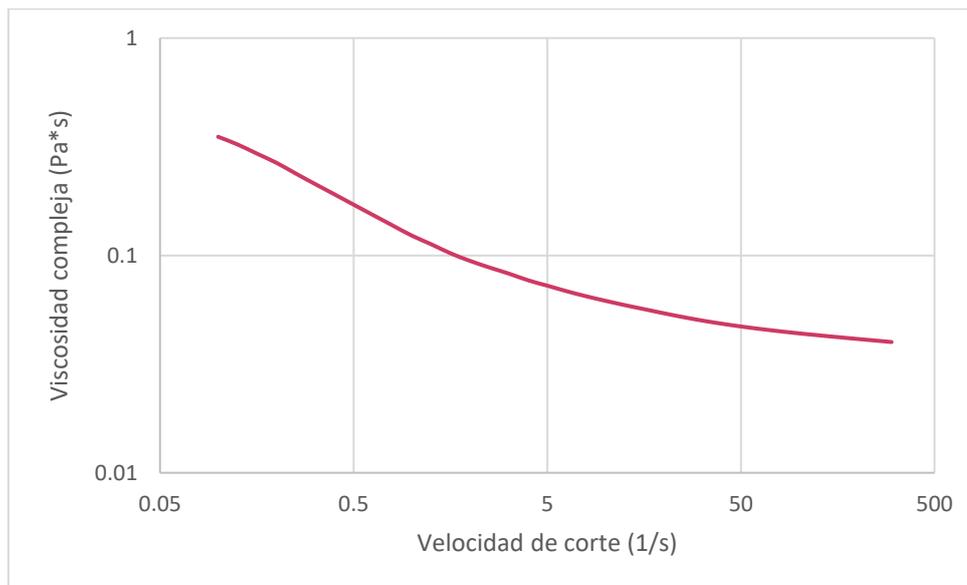


Figura 33. Estudio reológico de una dispersión sólida de PEG 6000 con Progesterona dispersada en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O con Kollicoat® MAE 30 DP usando la técnica de corte con cizalla simple.

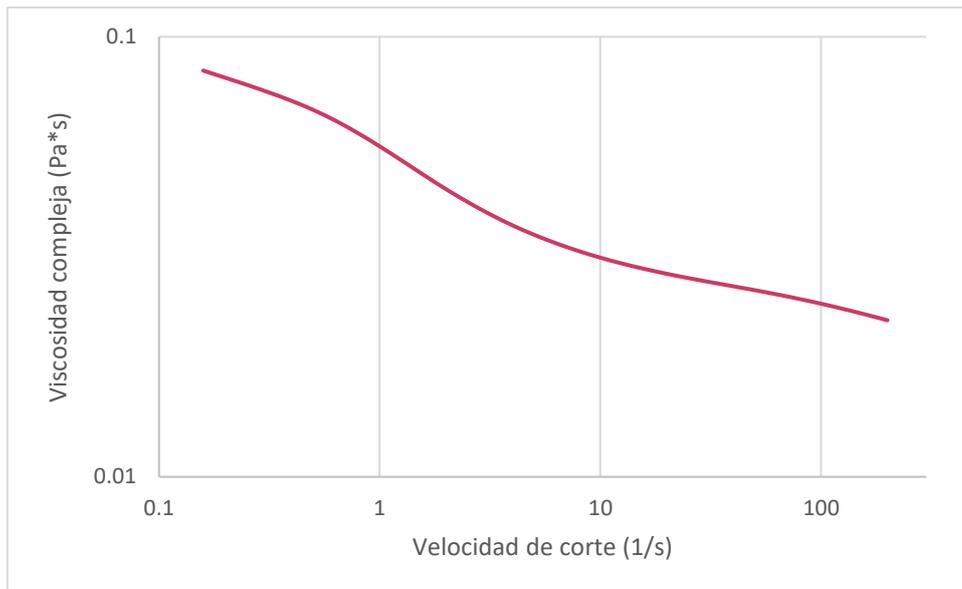


Figura 34. Estudio reológico de una dispersión sólida de PEG 6000 con Progesterona y Kollicoat® dispersada en una mezcla 75:25 de EtOH:H<sub>2</sub>O usando la técnica de corte con cizalla simple.

Cuando se aplicó un flujo de cizalla simple a los sistemas fabricados con dispersiones sólidas se observó que en la muestra libre de progesterona (Figura 33), la viscosidad es constante sin importar el aumento de la velocidad de corte por lo que su comportamiento es newtoniano. Sin embargo, al adicionar la progesterona a los sistemas (Figuras 33 y 34), la viscosidad es adelgazante al flujo, es decir, disminuye conforme aumenta la velocidad de corte. Este comportamiento no newtoniano es característico de los fluidos estructurados y se debe a la existencia de interacciones fisicoquímicas entre la progesterona y el disolvente. El sistema fluyó inmediatamente en cuanto se aplicó tensión resultante del aumento de la velocidad de corte, por lo que se trata de una suspensión pseudo-plástica (TA instruments, 1982). Por lo tanto, las formulaciones sólo deben agitarse para re-suspender la progesterona, pero este movimiento no afectará el llenado de la jeringa ni su inyectabilidad. Estas dos únicamente dependerán de las propiedades de la aguja, de la jeringa y de la viscosidad de las suspensiones (Runsevijitrprapa, Bodmeier, 2008).

Tabla 7. Viscosidad de los geles de formación *in-situ* empleando en su fabricación diferentes dispersiones sólidas.

<b>Formulación</b>	<b>Viscosidad (cP)</b>
Original sin DS	384.9-104.9
DS de PPG	351.45-39.95
DS de PPGK	83.80-22.68

El gel que presentó menor viscosidad fue el fabricado con la dispersión sólida hecha con PEG 6000, progesterona y Kollicoat® MAE 30 DP. Una baja viscosidad permite mejores propiedades de inyectabilidad con menor dolor de aplicación (Runseevijitrprapa, Bodmeier, 2008). Además, es gracias a la menor viscosidad que fue posible obtener una mejor re-suspensión y menor cantidad de fármaco adherido a las paredes del contenedor (Tabla 6) por lo tanto, se seleccionó esta formulación para llevar a cabo el resto de los estudios.

### 5.3 Valoración

Tabla 8. Resultados de la prueba de valoración a 5 muestras del gel de DS de PPGK.

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Porcentaje de PG presente (%)</b>	<b>Especificación 90% &lt; %PG &lt; 110%</b>
1	0.88	108	Cumple
2	0.832	102	Cumple
3	0.782	96	Cumple
4	0.827	101	Cumple
5	0.761	93	Cumple
X	NA	100	Cumple

La farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en su décima edición indica que las suspensiones que deban administrarse por vía parenteral a forma de inyección deben tener un porcentaje del fármaco que se encuentre en el intervalo de (90-110)% con respecto a la indicada en el marbete, y en este caso, a la indicada en la patente MX/a/2015/007665. Al administrarse el gel de formación *in-situ* se encuentra en forma de suspensión por lo que este criterio se ajusta perfectamente. Todas las muestras analizadas del gel con DS de PPGK cumplen con las especificaciones e indica que tienen la cantidad adecuada de principio activo en la formulación. En el caso de que el contenido de fármaco no hubiera sido el de la dosis adecuada, pudieron haberse presentado 3 situaciones críticas. La primera, en el caso de una dosis menor a la indicada, sería que no se alcance la dosis terapéutica y que, por lo tanto, no se libere la progesterona necesaria para alterar el ciclo estral de la vaca, la segunda, en el mismo escenario, sería que la liberación de progesterona no se presentara el tiempo suficiente con la consecuencia ya descrita. El tercer caso sería que la dosis de progesterona fuera mayor a la adecuada conllevando a la aparición de efectos tóxicos de la progesterona en el animal. En esta prueba se observó en todas las muestras un contenido adecuado de fármaco por lo que las pérdidas ocasionadas por la adherencia del mismo en el envase primario son insignificantes.

#### 5.4 Determinación del pH

Tabla 9. Pruebas de la medición de pH de 5 muestras del gel de DS de PPGK.

<b>Muestra</b>	<b>pH</b>
1	5.3
2	5.7
3	5.1
4	5.5
5	5.4
X	5.4 $\pm$ 0.2

El pH de las muestras del gel es ligeramente ácido. El pH de la subdermis se encuentra alrededor de 7.4 (Dickson, Sharp, 1985) sin embargo, como la mayoría de los fluidos corporales poseen capacidad amortiguadora, es posible utilizar formulaciones parenterales con pH's incluso menores al obtenido mientras sean uni-dosis, es decir, que no haya una infusión constante de la forma farmacéutica (Remington, 2000).

El tener un pH constante indica que ninguno de los componentes de la formulación sufrió un proceso de degradación y que no tiene sustancias contaminantes (Patel, 2010). La degradación de los componentes puede, adicionalmente, resultar en alteraciones de la distribución de tamaño de partícula, entre más amplia sea la misma, la suspensión tenderá a formar dos fases.

El mantener un pH adecuado, permite una mayor estabilidad para la suspensión evitando la formación de sedimentos de difícil re-suspensión y el crecimiento de cristales (Patel, 2010).

El copolímero de acrilatos empleado en la formulación, Kollicoat® MAE 30 DP, es soluble en medio acuoso a pH ácido, por lo que se encuentra disuelto antes de la administración, posteriormente, al entrar en contacto con un medio de pH mayor, 7.4 (Dickson, Sharp, 1985), el polímero puede precipitar y formar el implante. La progesterona no es una molécula que sea afectada por el pH del medio, es decir, no se ioniza, y no se reporta inestabilidad o descomposición a algún pH por lo que se mantiene activa al pH de la formulación (Spectrum Laboratory Products INC. 2013).

## 5.5 Inyectabilidad

Tabla 10. Resultados de la prueba de inyectabilidad del gel con DS de PPGK.

Muestra	Fuerza (N)
Blanco	4.8
1	30.4
2	28.1
3	29.8
4	30.3
5	28.5
6	29.7
7	28.6
8	29.8
Promedio	29.4
Desviación estándar	0.9
CV	2.9 %

Los datos obtenidos con esta prueba fueron reportados sustrayendo los 4.8 N correspondientes al blanco. Se reportó la fuerza máxima registrada por el texturómetro para cada una de las muestras (Anexo 5) y en todos los casos, ésta se localizó en el intervalo de 26 a 50 N por lo que se considera que es posible inyectarlo a un ser vivo (Runseevijitrprapa, Bodmeier, 2008). Cabe mencionar que no se mostró taponamiento de la aguja en ningún momento.

Se ha demostrado que el flujo de un fluido a través de un tubo estrecho, como puede ser una jeringa, puede ser descrito a partir de la ecuación de Poiseuille, sin embargo, esto sólo es válido para fluidos newtonianos, esto se debe a que en la ecuación se considera que la viscosidad del fluido ( $\eta$ ) es constante y, por lo tanto, la presión que se aplicará para su inyección será directamente proporcional (Runseevijitrprapa, Bodmeier, 2008).

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

Figura 35. Ecuación de Poiseuille.

En los fluidos no newtonianos la viscosidad no es constante y puesto que el gel evaluado presenta un flujo pseudo-plástico (Figura 34), este sistema no se adhiere a la ecuación de Poiseuille. Por lo tanto, es imposible determinar la fuerza de inyectabilidad necesaria a partir de la viscosidad por lo que es importante realizar esta prueba para evitar tener una suspensión imposible de inyectar o que lastime al animal durante la administración (Runseevijitrprapa, Bodmeier, 2008).

## 5.6 Formación del gel



Figura 36. Gel DS de PPGK formado en grenetina al 2.5% en el medio "A" y después de haberse formado "B".

El gel formado fue sólido, opaco, de color blanquecino-amarillo sin sedimento del fármaco. Su textura fue lisa y mostró un comportamiento elástico al ejercer presión manual, es decir, recuperaba su forma original después de dejar de ejercerla. Estas características indican que es posible la formación del implante en el sitio de aplicación. Esta estructura alojará al fármaco y permitirá su liberación sostenida. El implante está formado por un copolímero de ácido metacrílico insoluble en agua y soluble en etanol por lo que el vehículo de la formulación es una mezcla de etanol-agua. Cuando la formulación entra en contacto con el medio inicia un intercambio de disolventes. Es decir, el etanol difunde y el polímero entra en contacto con el agua y precipita formando un implante sólido de densidad menor a la del agua por lo que flota. Debido a esta última característica, en este experimento fue necesario el uso de un medio semisólido que retrasara la ascensión de la suspensión a la superficie del medio lo que, a su vez, permitió que un área de contacto mayor de la suspensión estuviera disponible por más tiempo para permitir la difusión del etanol y favorecer la formación del gel (Phaechamud, Jantadee, Mahadlek, et al. 2017) dando como resultado un implante de morfología adaptable a su contenedor, en este caso, cilíndrica.

### 5.7 Velocidad de intercambio de disolventes.

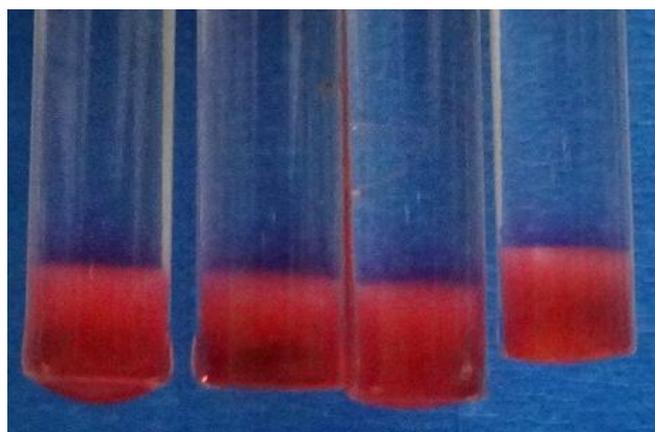


Figura 37. Difusión del etanol de la suspensión del gel de formación *in-situ* en un medio acuoso con colorante rojo fresa.

Tabla 11. Velocidad de intercambio de disolventes en el gel de formación *in-situ*.

Muestra	1	2	3	4	5	Promedio
Distancia (mm)	70	80	80	80	70	76.00 $\pm$ 5.58
Velocidad (mm/min)	1	1.14	1.14	1.14	1	1.09 $\pm$ 0.08

Tabla 12. Tiempo de formación del gel.

Velocidad (mm/min)	Velocidad (mL/min)	Tiempo para formar un gel de 5 mL (min).
1.09	0.09	58.40

En este experimento es posible observar la velocidad a la cual ocurre el intercambio de disolventes, mientras el etanol contenido en la formulación, que permite que el copolímero se encuentre disuelto, se difunde al medio, el agua difunde en la suspensión entrando en contacto con el polímero permitiendo la precipitación del mismo y la formación de un gel sólido tipo matriz (Phaechamud, Jantadee, Mahadlek, et al. 2017). Durante el experimento, se observó que la velocidad de difusión no era constante, al inicio del mismo fue mayor y paulatinamente disminuyó. Esto se debió a que, conforme se formó el gel, éste creó una barrera que retardó la penetración del agua en el sistema y la salida de etanol del mismo como se ha observado anteriormente (Phaechamud, Jantadee, Mahadlek, et al. 2017). El dato de velocidad de difusión es relevante porque permite pronosticar el tiempo que le puede tomar a una dosis terapéutica de la

suspensión formar el gel y también los primeros momentos de la liberación del fármaco.

Es importante mencionar que, aunque se proporcione una aproximación, el tiempo que tardaría el gel en formarse al inyectarse *in-vivo* no sería el mismo al reportado (Tabla 12) debido a que la disponibilidad de agua en el tejido subcutáneo es menor a la usada en el experimento (Jensen, Jensen, Møller, et al. 2015), además, el área de contacto de la suspensión al ser administrada es mayor, por lo que estos dos factores podrían interferir en la velocidad real de formación del gel y, por lo tanto, también en el tiempo de solidificación del implante.

Con lo que respecta a los primeros momentos de la liberación, una velocidad de intercambio de disolventes alta puede provocar que se libere al medio una cantidad significativa de la dosis resultando en un efecto "*burst*". Esto ocurre sólo en los primeros minutos de la gelificación debido a que con el tiempo se forma la capa densa de gel que ya se mencionó previamente y la velocidad de intercambio de disolventes disminuye, además es importante tener en cuenta que la progesterona es un fármaco muy poco soluble en agua y afín al vehículo de la formulación por lo que no es probable que la dosis completa sea liberada inmediatamente (Phaechamud, Jantadee, Mahadlek, et al. 2017), posteriormente, se ahondará en la liberación que presenta el gel de formación *in-situ*.

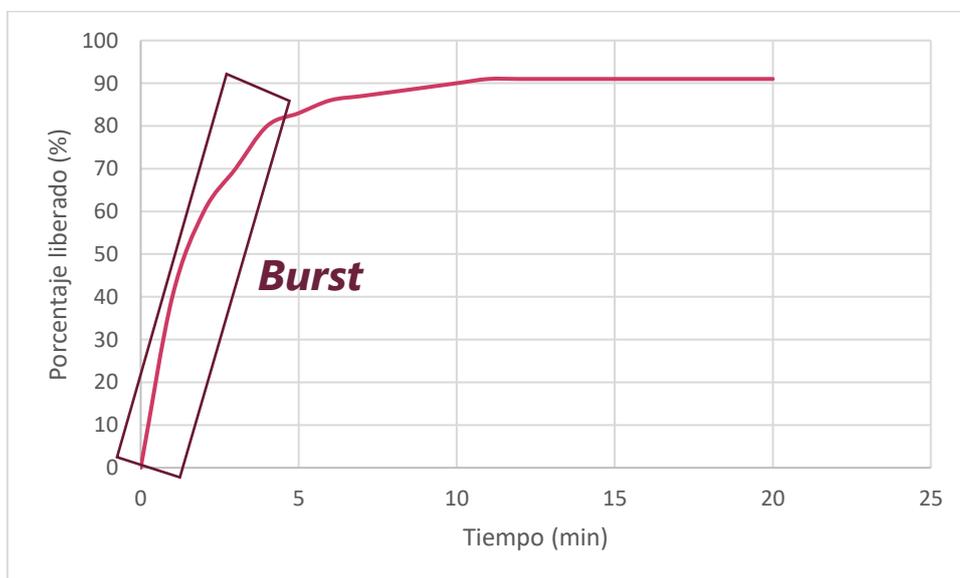
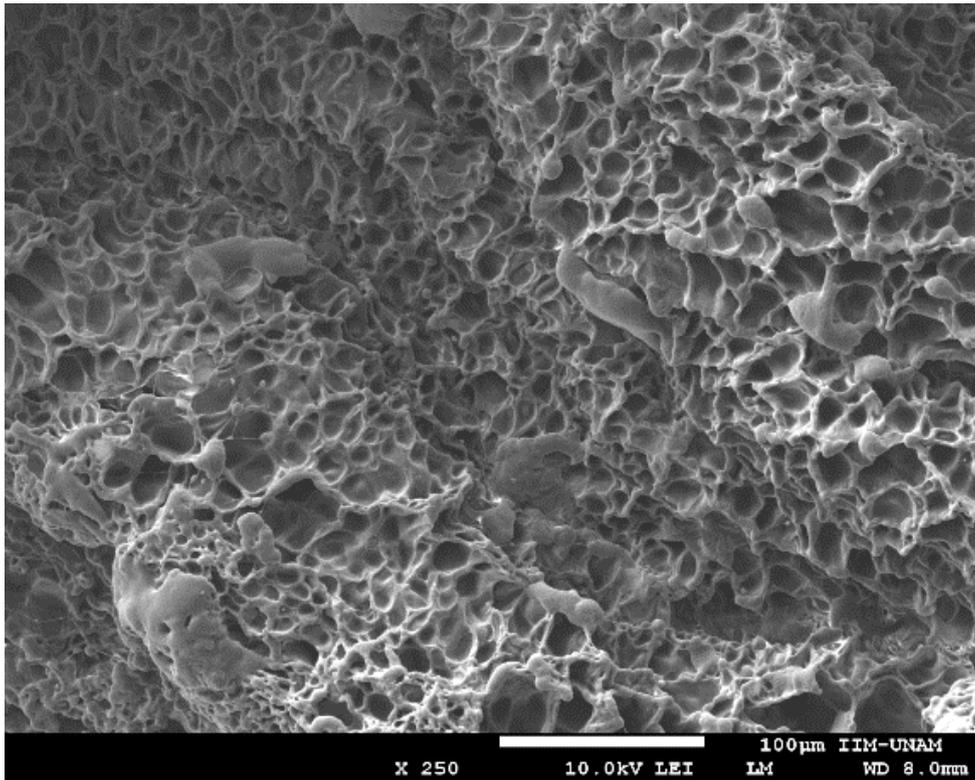
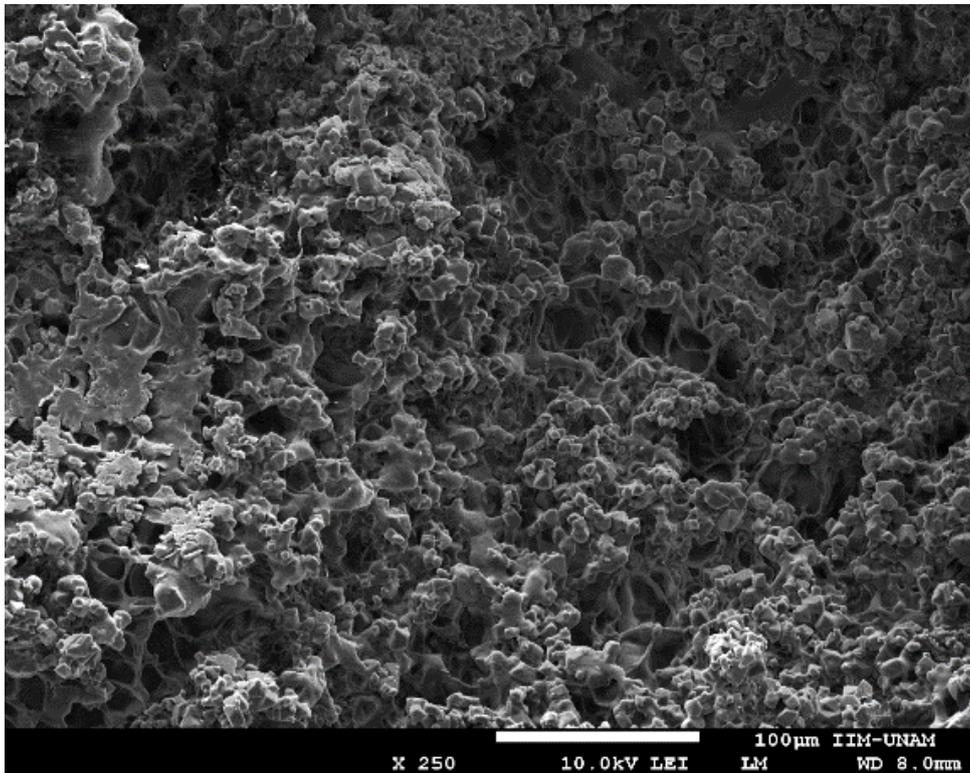


Figura 38. Efecto "*Burst*".

5.8 Morfología microscópica del implante de formación *in-situ* de progesterona.

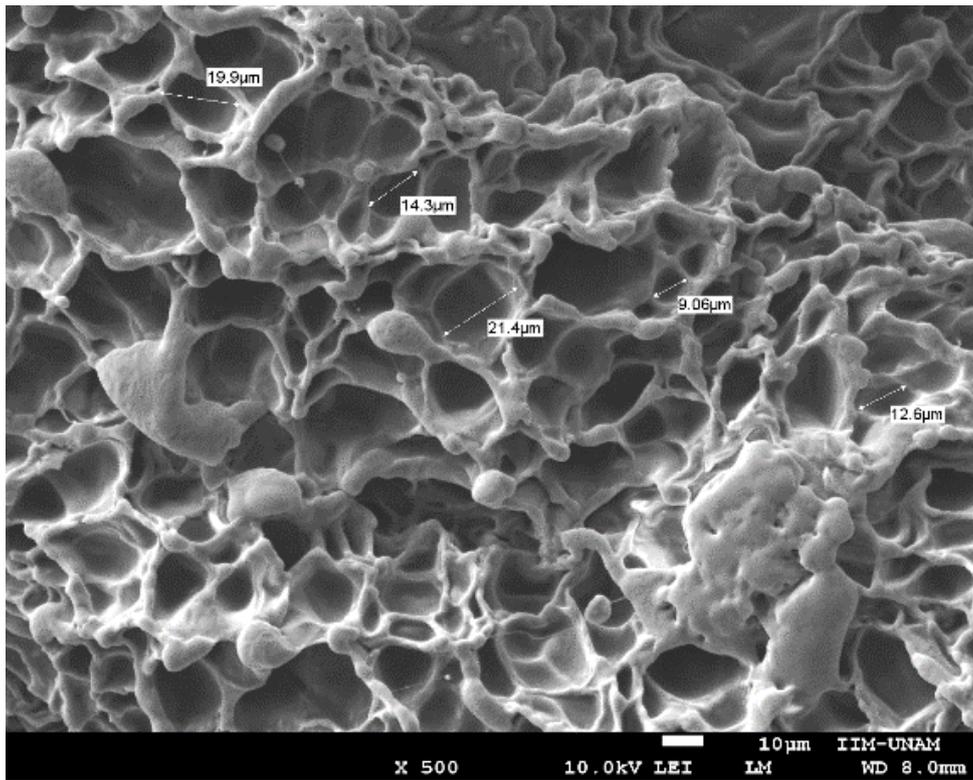


A

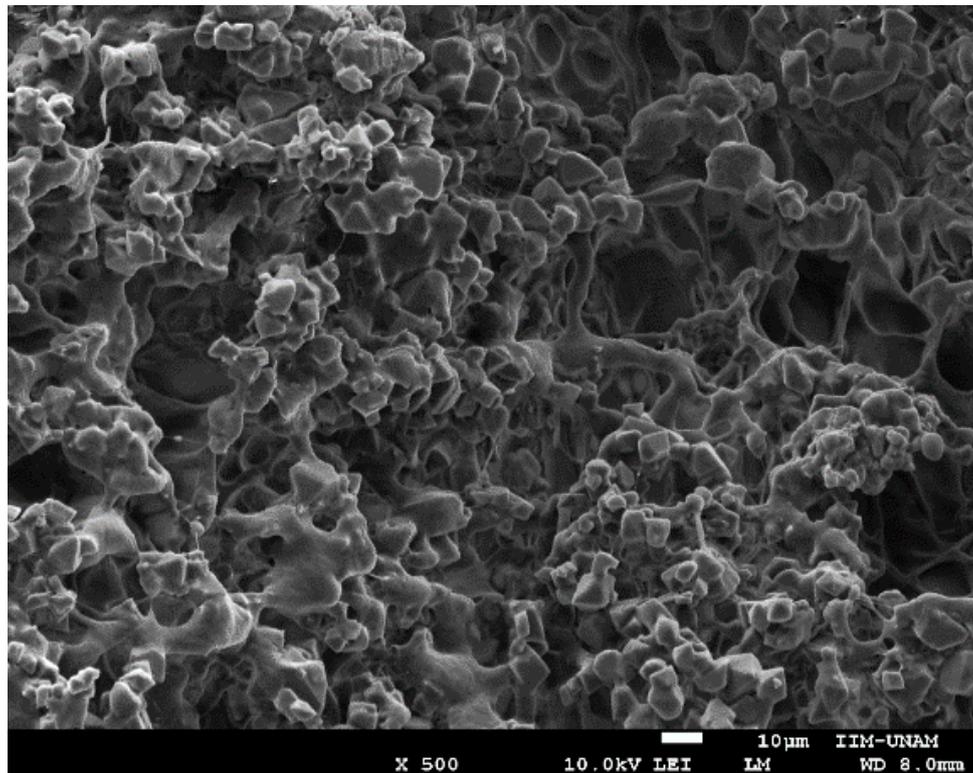


B

Figura 39. Microscopías SEM obtenidas con microscopio JEOL JSM-7600F a 10.0 kV. "A" corresponde a el gel DS de PK mientras que "B" corresponde al gel DS de PPGK.

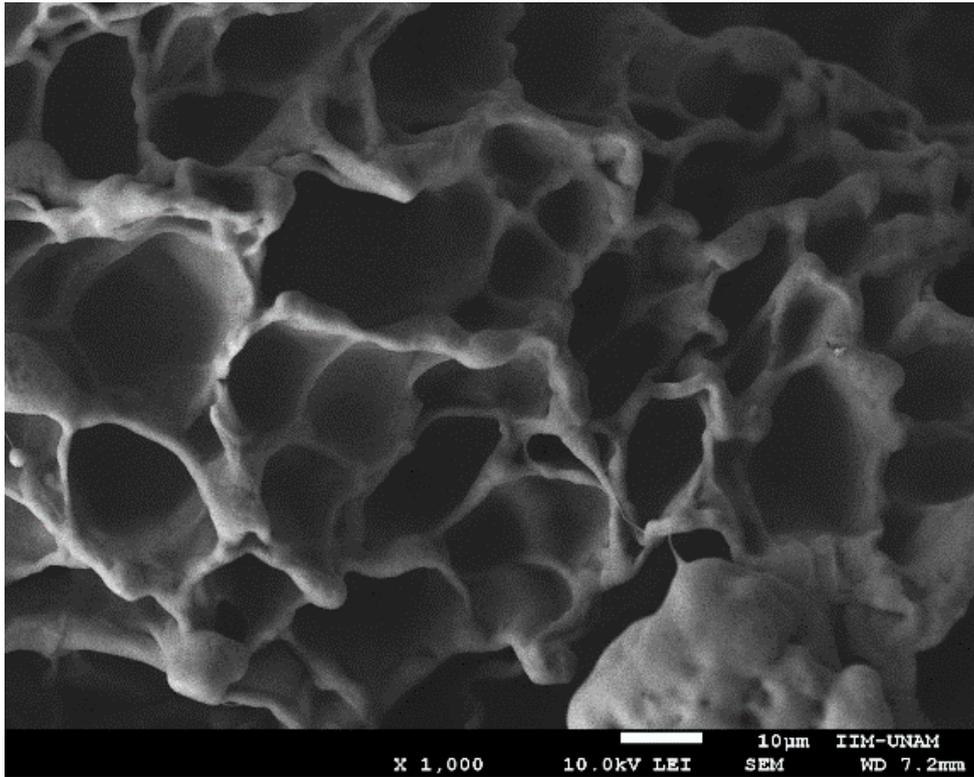


A

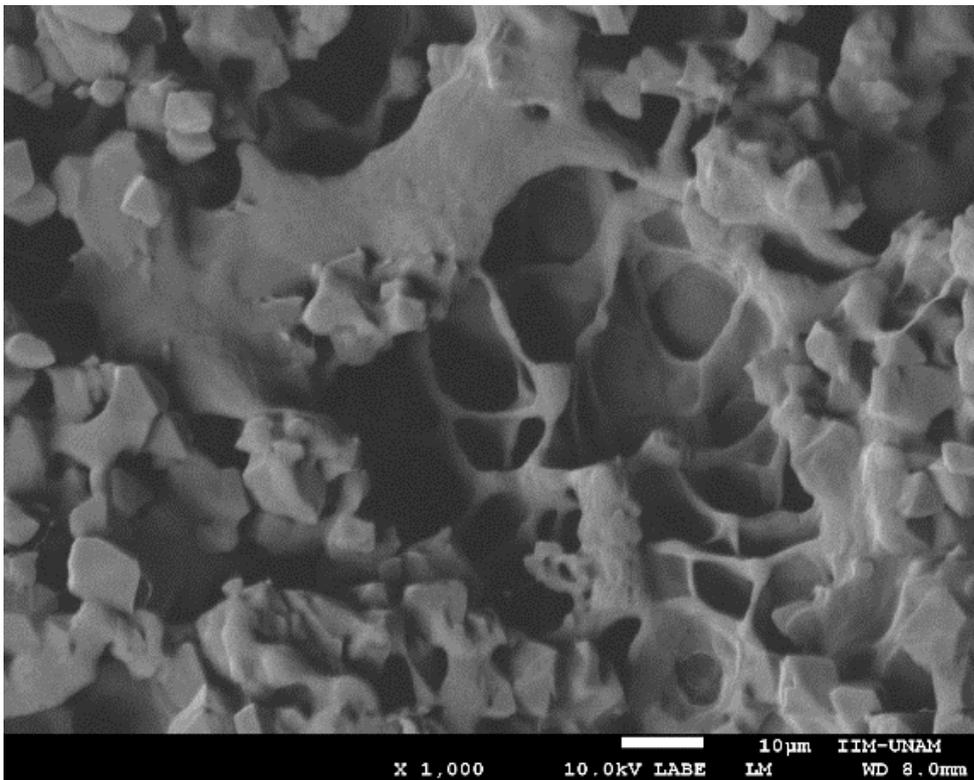


B

Figura 40. Microscopías SEM obtenidas con microscopio JEOL JSM-7600F a 10.0 kV. "A" corresponde a el gel DS de PK mientras que "B" corresponde al gel DS de PPGK.



A



B

Figura 41. Microscopías SEM obtenidas con microscopio JEOL JSM-7600F a 10.0 kV. "A" corresponde a el gel DS de PK mientras que "B" corresponde al gel DS de PPGK.

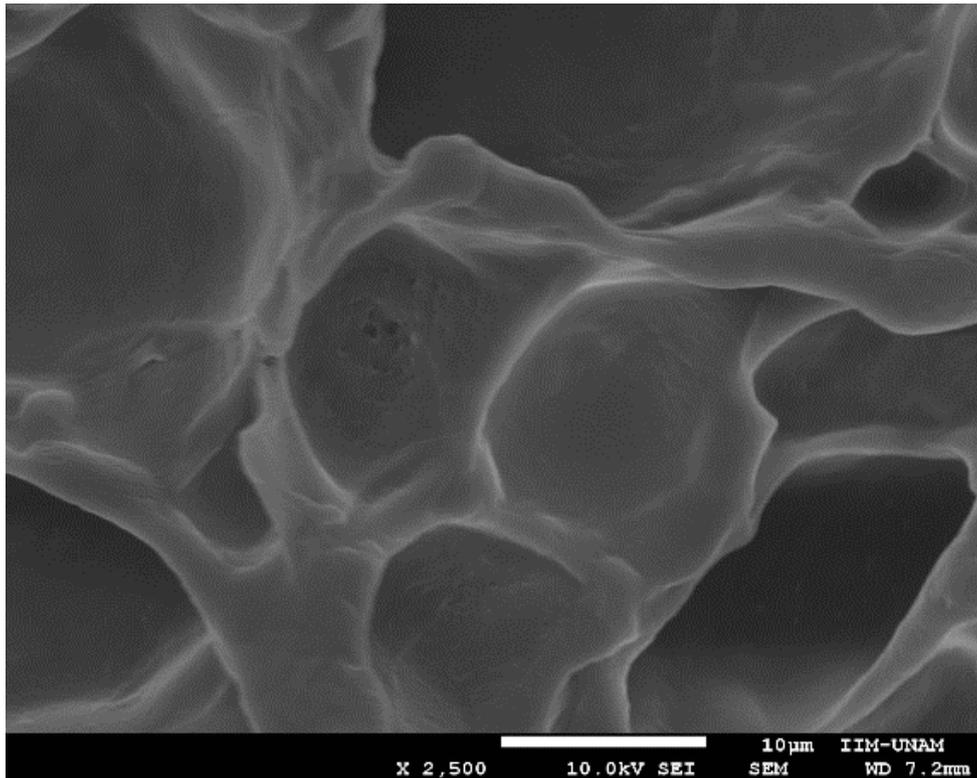


Figura 42. Microscopías SEM obtenidas con microscopio JEOL JSM-7600F a 10.0 kV del gel DS de PK.

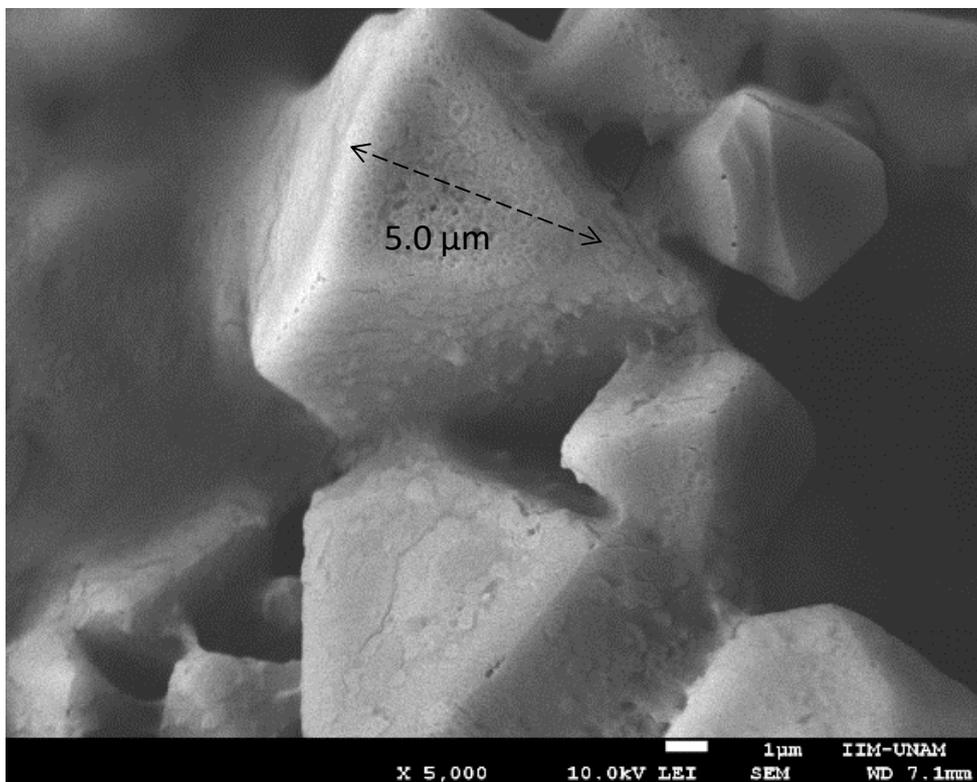


Figura 43. Microscopía SEM de cristales de progesterona obtenida con microscopio JEOL JSM-7600F a 10.0 kV

En las imágenes obtenidas a través de la técnica SEM fue posible comparar las estructuras que se obtienen al formarse los geles uno con progesterona y el otro sin progesterona, ambos preparados con la técnica de dispersión sólida con el PEG 6000 y el copolímero de ácido metacrílico. Se observa que el material es poroso (Figura 42) y que a su vez forma una estructura con tamaño de poro variable (Figura 40. A). En las imágenes con progesterona fue posible observar que el fármaco presenta una estructura cristalina (Figuras 39.A, 40.A, 41.A. y 43) a pesar de la dispersión sólida a la cual fue sometido. Esto puede deberse a que los cristales amorfos tienen una cantidad muy alta de energía interna y tienden a formar estructuras más ordenadas conforme pasa el tiempo para poder disminuir la misma y obtener mayor estabilidad (Singh, Van den Mooter, 2016). El gel analizado fue formado a partir de una suspensión con 1 mes de antigüedad, por lo que es posible que la transición a la estructura cristalina se presentara en ese periodo. Los cristales ocuparon el espacio de los poros del gel y también se incrustaron en las paredes formadas por el polímero.

Estas micrografías muestran claramente que el sistema obtenido se trata de una matriz en la cual el fármaco se encuentra uniformemente distribuido y cuya estructura tiene macro poros, es decir, los tamaños de poro se encuentran en escala de micras (Figura 40 A) y son mayores al tamaño de las partículas de fármaco que se liberarán (Figura 43) (Manish, Abhay, 2012), lo cual puede permitir la difusión de la progesterona durante su liberación.

La estructura porosa del gel influye también en la formación del implante debido a que el área más superficial de la suspensión que está en contacto con el medio acuoso forma estas estructuras, entre más poroso es el material, permite más fácilmente el intercambio de disolventes y, por lo tanto, que toda la formulación administrada gelifique (Phaechamud, Jantadee, Mahadlek, et al. 2017).

## 5.9 Liberación *in-vitro*

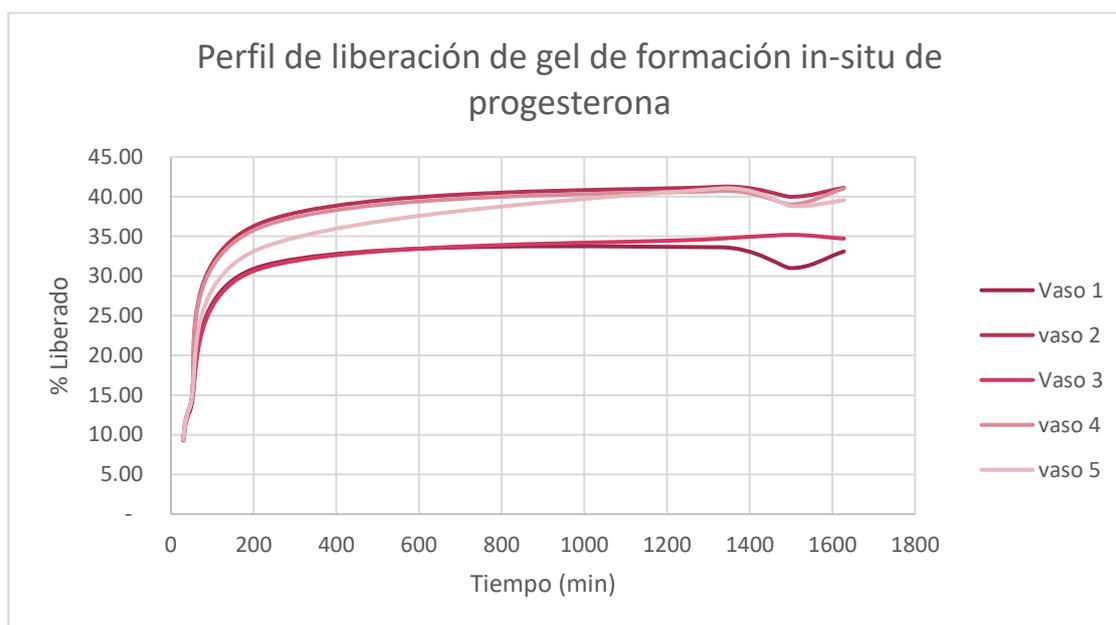


Figura 44. Perfiles de liberación del gel de formación *in-situ* de progesterona en 5 vasos utilizando el aparato 1 de la FEUM 10ª edición.

En los perfiles de liberación del gel de formación *in-situ* puede observarse que existe un efecto "*burst*" en los primeros minutos y que posteriormente se alcanza una velocidad de liberación mucho menor que le otorga al sistema la característica de ser una forma farmacéutica de liberación sostenida. Este efecto se debe a la velocidad de intercambio de disolventes que ocurre durante la formación del gel como se explicó en el apartado "6.7 Velocidad de intercambio de disolventes".

El efecto "*burst*" puede ser positivo debido a que se alcanza más rápido la concentración terapéutica de la progesterona en sangre y posteriormente, con la liberación sostenida, la fluctuación es mínima.

Tabla 13. Comparación de los perfiles de disolución utilizando el criterio de  $f_2$

Perfiles a comparar	Valor de $f_2$	Igualdad ( $f_2 \geq 50$ )
V1-V2	59.99	Sí
V1-V3	83.42	Sí
V1-V4	61.49	Sí
V1-V5	63.73	Sí
V2-V3	65.39	Sí
V2-V4	97.62	Sí
V2-V5	86.97	Sí
V3-V4	67.14	Sí
V3-V5	70.70	Sí
V4-V5	89.78	Sí

La prueba de  $f_2$  entre cada uno de los vasos demuestra que no hay diferencia mayor al 10% entre los perfiles de liberación de los 5 vasos evaluados ya que todos superan el valor de  $f_2=50$  en todos los puntos del perfil (Tabla 13) y se ha demostrado empíricamente que esta similitud es aceptable (Shah, Tsong, Sathe, et al. 1998). Por lo tanto, la toma de muestra y tratamiento de muestra fueron consistentes. Se evaluaron 5 muestras del mismo lote y al ser todas similares, se muestra homogeneidad en toda la formulación.

Tabla 14. Comparación entre ajuste de modelos de los datos experimentales de 5 perfiles de liberación.

Modelo	No. Parámetros	Fmax	R <sup>2</sup> ajustada	Mejor R <sup>2</sup> ajustada (1-5)	AIC	Mejor AIC (1-5)	MSC	MSC Aceptable
Makoid Banakar	3	NA	0.9711	4	21.9092	4	3.1136	Sí
Peppas-Sahlin	3	NA	0.9418	5	26.2056	5	2.3976	Sí
Weibull Fmax	3	37.673	0.9958	1	7.9364	1	5.4425	Sí
Primer orden Fmax	2	37.776	0.9952	2	8.9207	2	5.2784	Sí
Logistic Fmax	3	37.995	0.9936	3	12.5889	3	4.8112	Sí

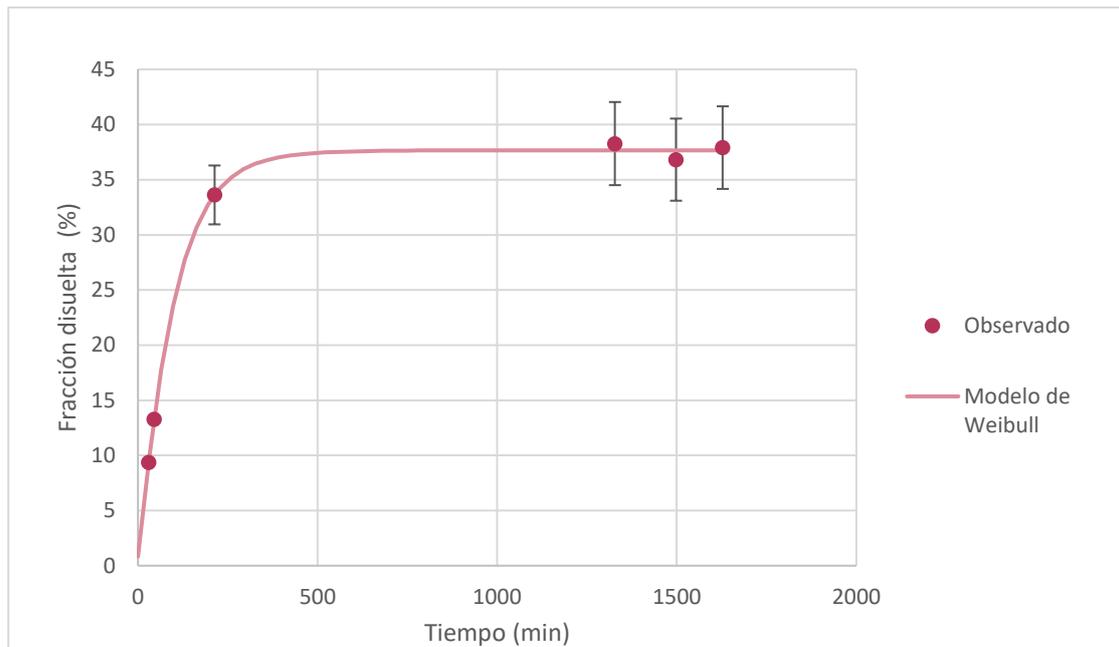


Figura 45. Ajuste de los perfiles de liberación del promedio de los 5 vasos al modelo de Weibull

Se probó el ajuste a varios modelos de disolución con el software DDSolver y aquellos que mostraron describir mejor el modelo se reportan en la tabla 14. Se observa que los datos obtenidos en las pruebas de liberación se ajustan más a los modelos que incluyen el parámetro  $F_{max}$  (Tabla 14). En todos estos casos, la  $R^2$  y la  $R^2$  ajustada fueron mayores a 0.99, así mismo, los valores del AIC (criterio de información de Akaike) fueron bajos y, por lo tanto, el MSC (criterio de selección de modelo) fue alto. Se considera aceptable cuando el valor de este parámetro se encuentra por encima de 2 (Yong, Huo, Zhou, et al. 2010). Debido a que la diferencia entre los factores de selección de los modelos es muy baja, se eligió el modelo de Weibull ya que éste ha sido bien estudiado en el modelado de datos de disoluciones farmacológicas (Tsong, Hammerstrom, Chen, 1997). Los parámetros descritos en el modelo indican lo siguiente:

- $\beta$ = Este parámetro tiene un valor de 1.060 que puede redondearse a 1, esto indica que el comportamiento no es sigmoide y que se presenta una disolución de primer orden que obedece a la primera ley de difusión de Fick.
- $\alpha$ = El valor de este parámetro de escala que determina la escala de tiempo del proceso y en este caso es de  $133.686 \text{ min}^{-1}$ .

- $F_{max}$ = Este parámetro indica, teóricamente, cuál es el porcentaje de fármaco que será liberado en un tiempo infinito, en este caso es 37.67%.

A pesar de la coincidencia que tienen los datos experimentales con el modelo de Weibull, es posible poner en duda el valor del parámetro  $F_{max}$  debido a que se ha observado que el modelo no tiene la capacidad de correlacionar los resultados a corto y largo tiempo cuando se hacen estudios con formas farmacéuticas de liberación modificada y, por lo tanto, la asíntota marcada en este modelo puede no coincidir con la real (Ignacio, Chubynsky, Slater, 2017). Cuando se emplea el parámetro  $F_{max}$  con el propósito de mejorar el modelado, puede descartarse este error (Costa, Sousa, Pais, et al. 2003).

El sistema, como se menciona en el apartado "5.8 Morfología microscópica del gel de formación *in-situ* de progesterona." Es de tipo matricial y poroso lo que permite la difusión de la progesterona hacia el medio esto es congruente con el mecanismo de liberación descrito por el modelo de Weibull ( $\beta \approx 1$ ) que indica a la difusión regulada por la primera ley de Fick. La primera ley de Fick postula que la difusión se presenta de regiones de mayor a menor concentración, con una magnitud proporcional al gradiente de concentración.

Aunque el implante está formado con el copolímero Kollicoat® MAE 30 DP, ácido metacrílico, que es soluble a  $pH > 5.5$  (BASF, 2010), no se observa un mecanismo de liberación por erosión en las pruebas, esto puede deberse a que al utilizar agar al 0.5% en el medio de liberación, la cantidad de agua disponible es menor a la del lumen del intestino que es donde se ha observado este efecto al ser el Kollicoat® MAE 30 DP un polímero que se usa para recubrir tabletas y hacerlas gastro-resistentes. También puede deberse a que la cantidad de copolímero presente en el implante es mucho mayor que la del recubrimiento para las tabletas.

## 6.0 Conclusiones

- Se desarrolló un implante de formación *in-situ* para la administración de progesterona para rumiantes, se realizó su caracterización fisicoquímica y se obtuvo el perfil de liberación del sistema.
- Se fabricó un implante de formación *in-situ* con características superiores a las de la patente MX/a/2015/007665 con el uso de la técnica de dispersión sólida.
- Se evaluó la reología de las formulaciones de los geles y se determinó que poseían un flujo pseudo-plástico. El gel que presentó una viscosidad menor, de 83.80 a 22.68 cP, fue el DS de PPGK.
- Se caracterizó el sistema con lo que respecta a la cantidad de fármaco en las formulaciones, que fue la adecuada, y al pH que fue de  $5.39 \pm 0.23$ .
- Fue posible determinar la fuerza necesaria para la inyección de la formulación y su administración resultó viable.
- Se evaluó la formación del implante que resultó tener propiedades elásticas y de adaptación a la forma del contenedor entre otras y se determinó la velocidad del intercambio de disolventes que permite su formación.
- Se observó la estructura macromolecular del implante formado en presencia y ausencia del fármaco por lo que se determinó que el sistema es poroso y de tipo matricial.
- El perfil de liberación del sistema se ajustó al modelo de modelo de Weibull con  $F_{max}$ , que indica que sigue una cinética de liberación de orden uno que obedece a la primera ley de difusión de Fick, lo cual coincide con lo esperado a partir de lo observado en la morfología de la superficie del gel al ser una matriz porosa.

## 7.0 Referencias

- Accessdata.fda.gov. (2018). *Dissolution Methods*. [online] Available at: [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp\\_SearchResults.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults.cfm) [Accessed 7 Jan. 2018].
- 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.
- 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.
- Alekseev, K., Blynskaya, E., Tikhonova, N., Alekseev, V., Uvarov, N. and Chernova, O. (2012). Polymers in the formulation of drug dosage forms with modified release. *Russian Journal of General Chemistry*, 82(3), pp.564-571.
- 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.
- Al-Shamklani, A., Bhakoo, M., Tuboku, M. and Duncan, R. (1991). Evaluation of the biological properties of alginates and gellan and xanthan gum. *Proc Int Symp Control Release Bioact Mater*, pp.213-214.
- Andersen, B. and Galloway, D. (2008). *Mapping work processes*. Milwaukee, Wis.: ASQ Quality Press.
- BASF (2009). *Kollocoat MAE grades*. Technical Information. p.3.
- Bernad Bernad, M. (2017). *Formas Farmacéuticas de liberación modificada*. Facultad de Química, UNAM.
- Bernad Bernad, M., Lugo Espinosa, A. and Urbiola Verdejo, G. (2017). *COMPOSICION FARMACEUTICA DE USO VETERINARIO BASADA EN UNA SUSPENSION DE PROGESTERONA EN UN SISTEMA POLIMERICO, QUE TIENE PROPIEDADES DE GELIFICACION INSITU*. MX/a/2015/007665.
- 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.
- 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.
- Costa, E., Arancibia, A. and Añache, J. (2004). Sistemas Matriciales. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(2), pp.259-265.
- Costa, F. and Sousa Lobo, J. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), pp.123-133.

- Costa, F., Sousa, J., Pais, A. and Formosinho, S. (2003). Comparison of dissolution profiles of Ibuprofen pellets. *Journal of Controlled Release*, 89(2), pp.199-212.
- 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.
- Cunningham, N. (2018). *Rheology & Viscosity Testing & Profiling Techniques & Methods*. [online] Rheologyschool.com. Available at: <http://www.rheologyschool.com/testing/testing-examples> [Accessed 7 Jan. 2018].
- Dash, S., Murthy, P., Nath, L. and Chowdhury, P. (2010). KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, 67(3), pp.217-223.
- Dhirendra, K., Lewis, S., Udupa, N. and Atin, K. (2009). SOLID DISPERSIONS: A REVIEW. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 22(2), pp.234-246.
- Dickson, M. and Sharpe, D. (1985). Continuous subcutaneous tissue pH measurement as a monitor of blood flow in skin flaps: an experimental study. *British Journal of Plastic Surgery*, 38(1), pp.39-42.
- Drugbank.ca. (2018). *Progesterone - DrugBank*. [online] Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00396> [Accessed 5 Feb. 2018].
- 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.
- 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 7 Jan. 2018].
- Fideicomisos Instituidos en relación con la agricultura (2017). *Panorama Agroalimentario*. México, pp.2, 14, 18.
- Guía de validación de métodos analíticos. (2002). México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
- Gupta, M. and Brijesh, R. (2012). A REVIEW ON: SUSTAINED RELEASE TECHNOLOGY. *International Journal of Therapeutic Applications*, 8, pp.18-23.
- Haan, P. and Lerk, C. (1984). Oral controlled release dosage forms. A review. *Pharmaceutisch Weekblad*, 6(2), pp.57-67.
- Hatefi, A. and Amsden, B. (2002). Biodegradable injectable in situ forming drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 80(1-3), pp.9-28.
- Ignacio, M., Chubynsky, M. and Slater, G. (2017). Interpreting the Weibull fitting parameters for diffusion-controlled release data. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 486, pp.486-496.

- 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.
- Iyer, S., Barr, W. and Karnes, H. (2006). Profiling in vitro drug release from subcutaneous implants: a review of current status and potential implications on drug product development. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 27(4), pp.157-170.
- Jaimini, M. and Kothari, A. (2012). SUSTAINED RELEASE MATRIX TYPE DRUG DELIVERY SYSTEM: A REVIEW. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(6).
- 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.
- Kalam, M., Humayun, M., Parvez, N., Yadav, S., Garg, A., Amin, S., Sultana, Y. and Ali, A. (2007). RELEASE KINETICS OF MODIFIED PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS: A REVIEW. *Continental J. Pharmaceutical Sciences*, 1(2007), pp.30-35.
- Karuppiah, S. (2012). ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT FOR DISSOLUTION RELEASE OF FINISHED SOLID ORAL DOSAGE FORMS. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(2), pp.48-53.
- 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.
- Materials Engineering Department at San Jose State University (2005). *Introduction to Scanning Electron Microscopy*. San Jose.
- Nirmal, H., Bakliwal, S. and Pawar, S. (2010). In-Situ gel: New trends in Controlled and Sustained Drug Delivery System. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), pp.1398-1408.
- 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.
- Patel, R. (2010). PARENTERAL SUSPENSION: AN OVERVIEW. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 2(3), pp.4-13.
- 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.
- Rajgor, N., Bhaskar, V. and Patel, M. (2011). Implantable drug delivery systems: An overview. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 2(2), p.91.

- Remteke, K., Dighe, P., Kharat, A. and Patil, S. (2004). Mathematical Models of Drug Dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)*, 3(5), pp.388-396.
- 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.
- Séchoy, O., Tissié, G., Sébastien, C., Maurin, F., Driot, J. and Trinquand, C. (2000). A new long acting ophthalmic formulation of Carteolol containing alginate acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 207(1-2), pp.109-116.
- Shah, V., Tsong, Y., Sathe, P. and Liu, J. (1998). In Vitro Dissolution Profile Comparison—Statistics and Analysis of the Similarity Factor,  $f_2$ . In Vitro Dissolution Profile Comparison—Statistics and Analysis of the Similarity Factor,  $f_2$ . *Pharmaceutical Research*, 15(6), pp.889-896.
- Singh, A. and Van den Mooter, G. (2016). Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 100, pp.27-50.
- 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.
- Spectrum Laboratory Products (2013). *Progesterone*. Material Safety Data Sheet. New Brunswick, NJ: Sonia Owen.
- TA Instruments (1964). *Understanding Rheology of Structured Fluids*. A. Frank.
- Tabilo-Munizaga, G. and Barbosa-Cánovas, G. (2005). Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), pp.147-156.
- Taylor, L. and Zografis, G. (1997). *Pharmaceutical Research*, 14(12), pp.1691-1698.
- Troxel, T. (1982). *The Bovine Estrous Cycle Dynamics and Control*. Illinois, pp.3-7.
- Troxel, T. (2013). *Synchronization of estrus in cattle*. [Little Rock, Ark.]: Cooperative Extension Service, University of Arkansas.
- 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.
- Zhang, G., Chen, Y., Qiu, Y. and Yihong Qiu. (2009). *Developing Solid Oral Dosage Forms: Pharmaceutical Theory and Practice*. Academic Press, pp.501-517.
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. and Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), pp.263-271.

## 8.0 Anexos

### Anexo 1: Validación del sistema del espectrofotómetro AIS DT000CE-130 para la detección de progesterona.

#### Disoluciones

- Preparar 3 soluciones stock (SS) con una concentración de 10 mg/mL con 50 mg de progesterona en 5 mL usando MeOH como disolvente. Tomar una alícuota de 100  $\mu$ L y aforar a 10 mL con MeOH (SS2) para obtener una concentración de 100  $\mu$ g/mL.
- Fabricar un placebo (PGS) utilizando la formulación del gel eliminando la progesterona:
  - PEG 6000 al 20% (1 g)
  - Copolímero de acrilatos al 3% (0.5 mL)
  - EtOH : H<sub>2</sub>O (Aforo a 5 mL)  
75 : 25
- Tomar una alícuota de PGS de 100  $\mu$ L y colocar en un matraz aforado de 10 mL (SG1) aforar con MeOH.

#### 1. Precisión del sistema

##### Procedimiento

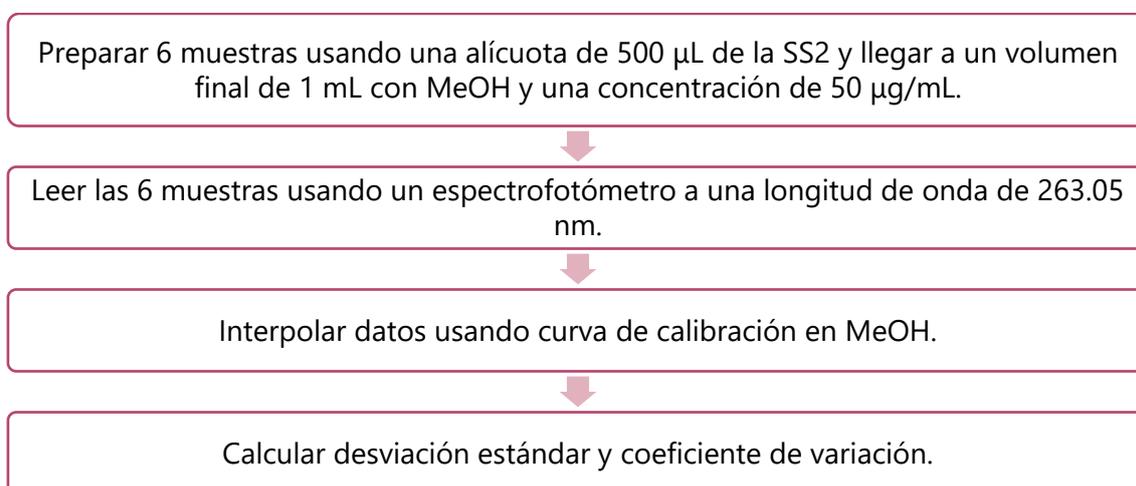


Figura 46. Procedimiento para evaluar el parámetro de precisión en el sistema.

#### Resultados

Tabla 15. Resultados de la prueba para evaluar la precisión del sistema.

Muestra	Absorbancia a 263.05 nm	Concentración (mg/mL)
1	0.580	46.5
2	0.577	46.3
3	0.578	46.3
4	0.582	46.6
5	0.59	47.3
6	0.571	45.8
S	0.006	0.5
%CV	1.083%	1.1%

Tabla 16. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la precisión del sistema.

Criterio de aceptación	Decisión
%CV < 1.5%	Cumple

## 2. Especificidad del sistema

### Procedimiento

Fabricar soluciones de las siguientes sustancias en una matriz de EtOH : H<sub>2</sub>O 75:25.

- Copolímero Kollicoat 30 al 3% (0.5 mL en 5 mL)
- PEG 6000 al 20% ( 1 g en 5 mL)
- EtOH : H<sub>2</sub>O 75:25 (2 mL)



Para cada una de las soluciones, preparar una dilución A tomando una alícuota de 50 µL en 5 mL total y posteriormente, hacer una dilución B tomando una alícuota de 100 µL de la dilución A y aforar a 1 mL total. En ambos casos, aforar con MeOH.



Medir y registrar absorbancia de las diluciones B a 263.05 nm. Usar como blanco MeOH.

Figura 47. Procedimiento para evaluar el parámetro de especificidad en el sistema.

### Resultados

Tabla 17. Resultados de la prueba para evaluar la especificidad del sistema.

Sustancia	Absorbancia a 263.05 nm
Copolímero Kollicoat® MAE 30 DP	Nula
PEG 6000	Nula
EtOH : H <sub>2</sub> O	Nula

Tabla 18. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la especificidad del sistema.

Criterio de aceptación	Decisión
No debe existir interferencia	Cumple

### 3. Linealidad del sistema

#### Procedimiento

Preparar 5 diluciones con SS2 y usando MeOH como disolvente para obtener por triplicado las siguientes concentraciones de progesterona:

- 1 µg/mL (10 µL de SS2 en 1 mL)
- 10 µg/mL (100 µL de SS2 en 1 mL)
- 50 µg/mL (500 µL de SS2 en 1 mL)
- 75 µg/mL (750 µL de SS2 en 1 mL)
- 100 µg/mL (1 mL de SS2)



Medir absorbancia de las curvas en el espectrofotómetro a 263.05 nm. Usar MeOH como blanco.



Graficar las curvas patrón y calcular el valor de la pendiente (m), la ordenada en el origen (b), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ ).

Figura 48. Procedimiento para evaluar el parámetro de linealidad en el sistema.

#### Resultados

Tabla 19. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del sistema.

Curva	m	b	r <sup>2</sup>	IC(β <sub>1</sub> )
1	0.0126	-0.0059	0.9957	0.0112, 0.0139
2	0.0123	0.0084	0.9911	0.0107, 0.0138
3	0.127	0.0381	0.9934	0.0131, 0.0151

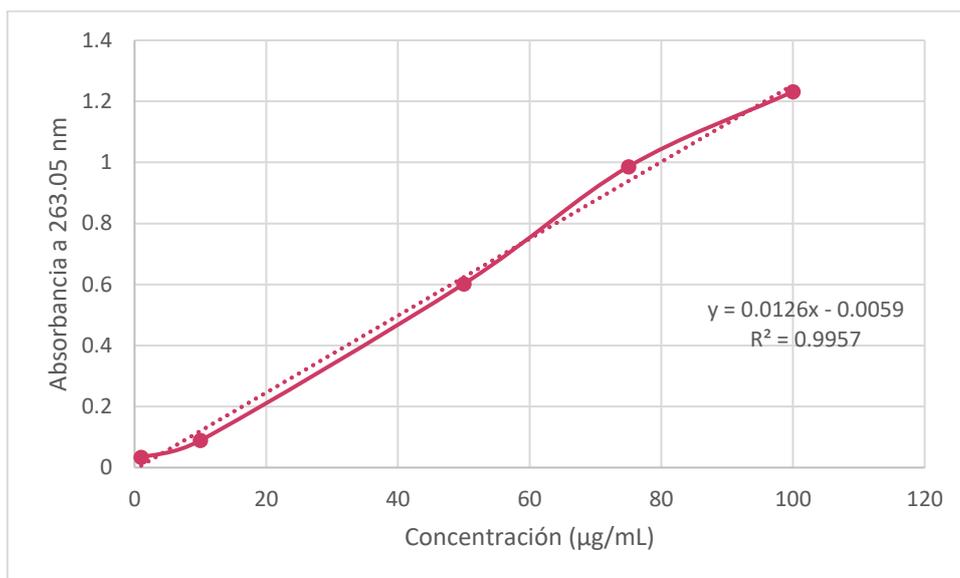


Figura 49. Curva patrón 1 para la prueba de linealidad del sistema.

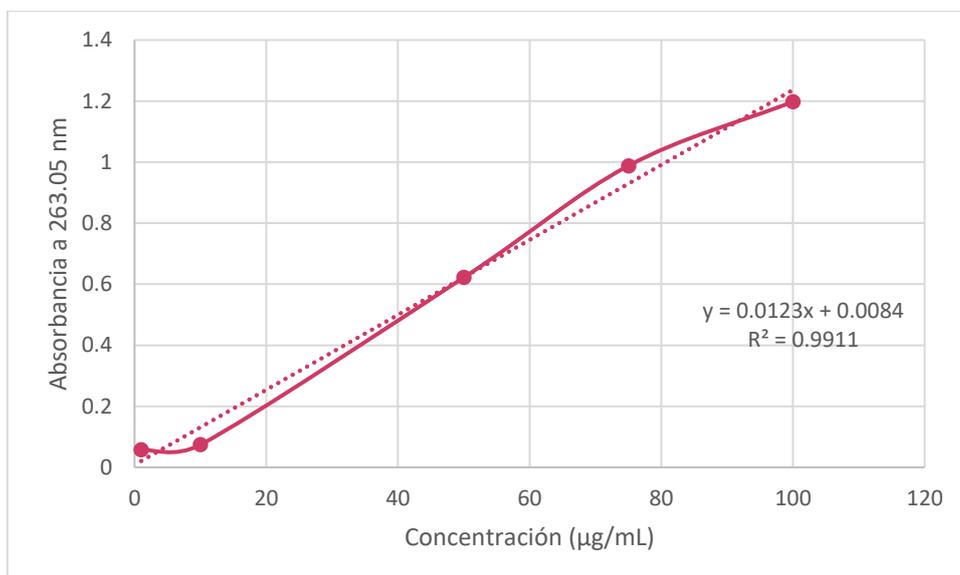


Figura 50. Curva patrón 2 para la prueba de linealidad del sistema.

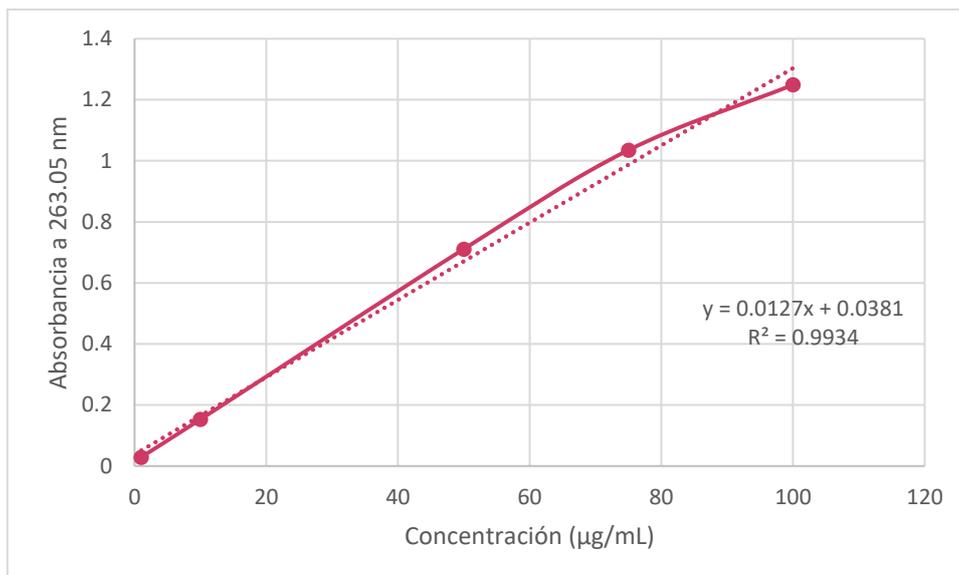


Figura 51. Curva patrón 3 para la prueba de linealidad del sistema.

Tabla 20. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la linealidad del sistema.

<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Decisión</b>
IC( $\beta_1$ ) no debe incluir el cero.	Cumple
$r^2 \leq 0.98$	Cumple

Anexo 2: Validación del método de valoración del gel de formación *in-situ* de progesterona utilizando el espectrofotómetro AIS DT000CE-130.

## 1. Exactitud y repetibilidad del método

### Procedimiento

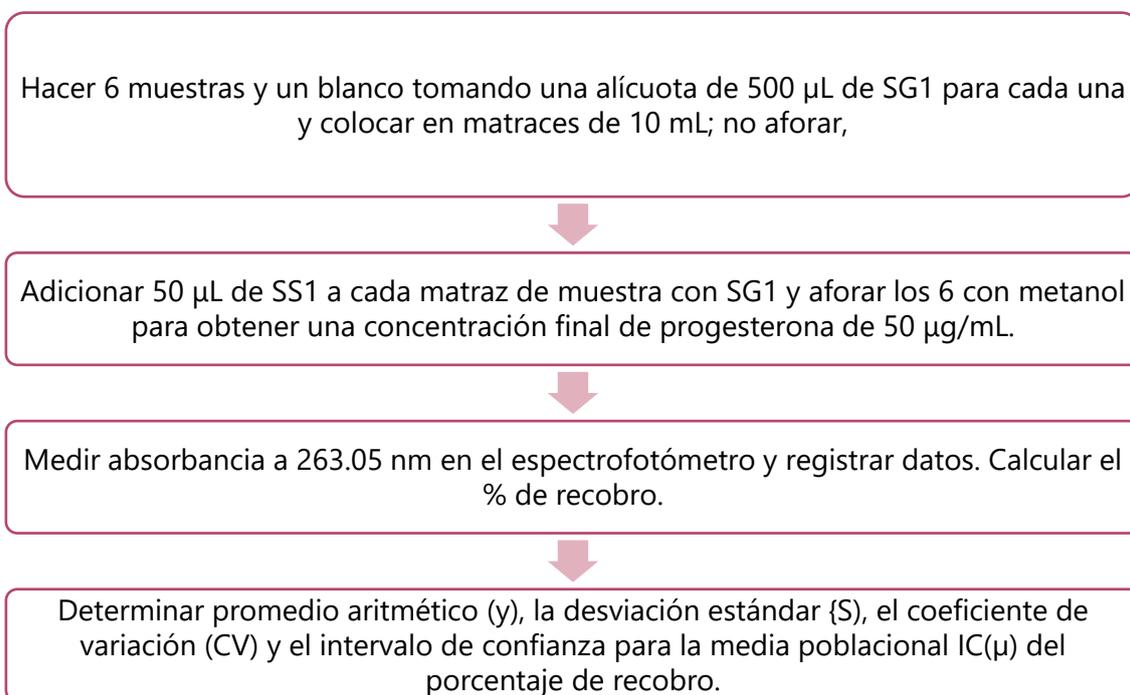


Figura 52. Procedimiento para evaluar los parámetros de exactitud y repetibilidad del método.

### Resultados

Tabla 21. Resultados de la prueba para evaluar la exactitud y repetibilidad del método.

Muestra	Absorbancia 263.05 nm	%Recobro
1	0.811	98.3
2	0.823	100.0
3	0.822	99.8
4	0.814	98.7
5	0.827	100.6
6	0.837	101.9
Y		99.9
S		1.3
CV		1.1%
IC( $\mu$ )		101.0-98.8

Tabla 22. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la exactitud y repetibilidad del método.

Criterio de aceptación	Decisión
------------------------	----------

IC( $\mu$ ) debe incluir el 100%.	Cumple
$\%CV \leq 3\%$	Cumple

## 2. Linealidad del método.

### Procedimiento

Preparar 5 diluciones con SS2, SS1 y SG1 usando MeOH como disolvente para obtener por triplicado las siguientes concentraciones de progesterona:

- 1  $\mu\text{g/mL}$  (10  $\mu\text{L}$  de SS2 + 100  $\mu\text{L}$  de SG1 en 1 mL)
- 10  $\mu\text{g/mL}$  (100  $\mu\text{L}$  de SS2 + 100  $\mu\text{L}$  de SG1 en 1 mL)
- 50  $\mu\text{g/mL}$  (500  $\mu\text{L}$  de SS2 + 100  $\mu\text{L}$  de SG1 en 1 mL)
- 75  $\mu\text{g/mL}$  (750  $\mu\text{L}$  de SS2 + 100  $\mu\text{L}$  de SG1 en 1 mL)
- 100  $\mu\text{g/mL}$  (10  $\mu\text{L}$  de SS1 + 100  $\mu\text{L}$  de SG1 en 1 mL)



Medir absorbancia de las curvas en el espectrofotómetro a 263.05 nm. Usar como blanco una solución de 100  $\mu\text{L}$  de SG1 y aforar a 1 mL con MeOH.



Graficar las curvas patrón y calcular el valor de la pendiente ( $m$ ), la ordenada en el origen ( $b$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el porcentaje de recobro ( $IC(\beta_1)$ ,  $IC(\beta_0)$ ,  $IC(\mu)$ ) y el  $CV_{x/y}$

Figura 53. Procedimiento para evaluar el parámetro de linealidad del método.

### Resultados

Tabla 23.1. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método.

Curva	$m$	$b$	$r^2$	$IC(\beta_1)$	$IC(\beta_0)$
1	1.0004	0.0007	0.9984	0.93-1.07	4.09,-4.09
2	1.0010	-0.0011	0.9999	0.99-1.01	0.85,-0.85
3	0.9974	0.0004	0.9999	0.95-1.05	2.92,-2.92

Tabla 23.2. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método.

Curva patrón 1
----------------

Concentración teórica (µg/mL)	Absorbancia 263.05 nm	Concentración real (µg/mL)	%Recobro
10	0.223	9.72	97.19
45	0.745	45.47	101.05
60	0.967	60.68	101.13
75	1.150	73.21	97.62
80	1.264	81.02	101.28
IC(µ)			102.21-97.09
CV			2.10%

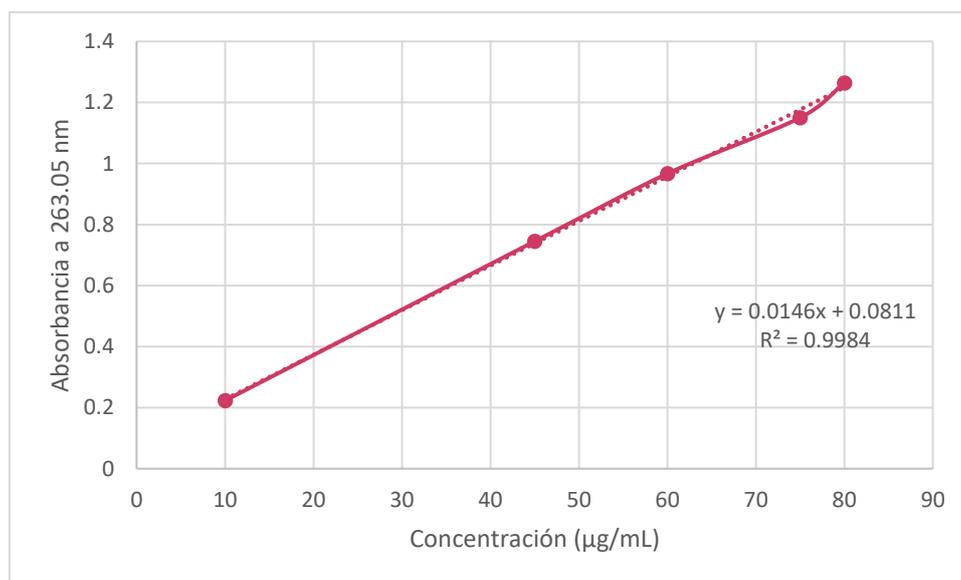


Figura 54. Curva patrón 1 para la prueba de linealidad del método para la valoración.

Tabla 23.3. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método.

Curva patrón 2			
Concentración teórica (µg/mL)	Absorbancia 263.05 nm	Concentración real (µg/mL)	%Recobro
10	0.188	9.93	99.29
45	0.740	44.51	98.90
60	0.968	60.42	100.70
75	1.217	75.77	101.03
80	1.284	78.66	98.33
IC(µ)			101.10-98.20
CV			1.22%

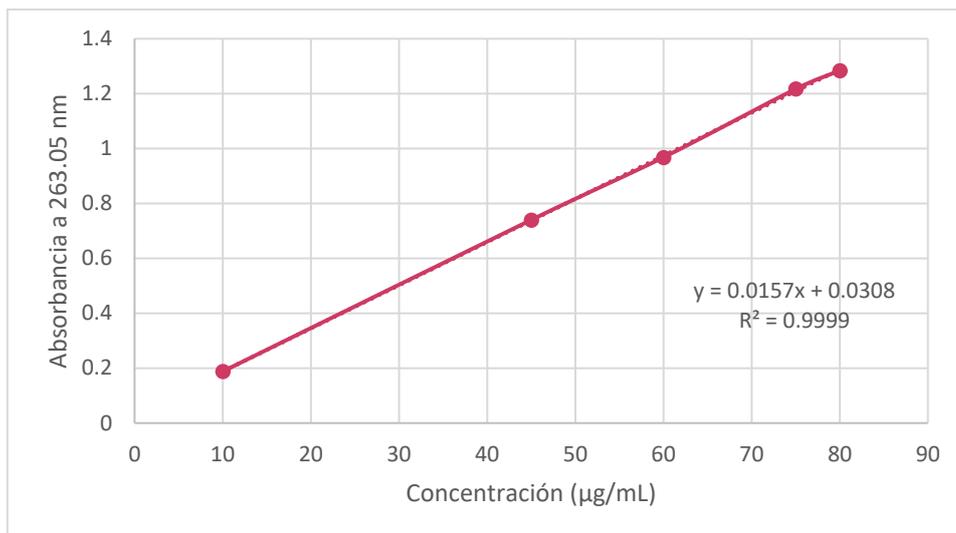


Figura 55. Curva patrón 2 para la prueba de linealidad del método para la valoración.

Tabla 23.4. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método.

<b>Curva patrón 3</b>			
<b>Concentración teórica (µg/mL)</b>	<b>Absorbancia 263.05 nm</b>	<b>Concentración real (µg/mL)</b>	<b>%Recobro</b>
10	0.188	10.01	100.13
45	0.740	45.17	100.38
60	0.968	59.69	99.49
75	1.217	75.55	100.74
80	1.284	79.82	99.78
IC(µ)			100.71-99.49
CV			0.49%

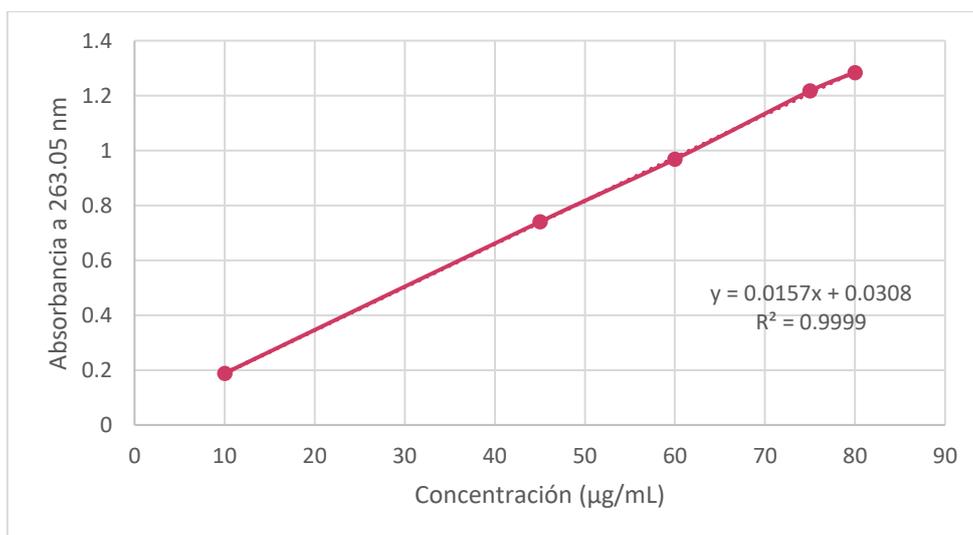


Figura 56. Curva patrón 3 para la prueba de linealidad del método para la valoración.

Tabla 24. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la linealidad del método.

<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Decisión</b>
El IC( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad.	Cumple
El IC( $\beta_0$ ) debe incluir el cero.	Cumple
$\%CV \leq 3\%$	Cumple
El IC( $\mu$ ) debe estar en el intervalo 97 - 103%	Cumple

### 3. Precisión del método

#### Procedimiento

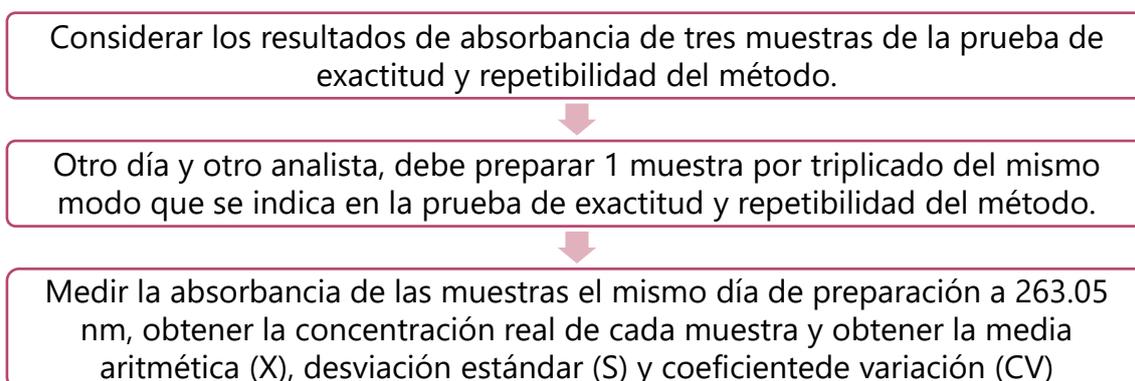


Figura 57. Procedimiento para evaluar el parámetro de precisión del método.

#### Resultados

Tabla 25. Resultados de la prueba para evaluar la precisión del método.

<b>Muestra</b>	<b>Analista</b>	<b>Fecha</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1	Analí M. C.	06/09/17	0.814	59.28
2	Analí M. C.	06/09/17	0.837	60.91
3	Analí M. C.	06/09/17	0.801	58.36
4	Diana T.G.	05/09/17	0.782	57.01
5	Diana T.G.	05/09/17	0.810	59.00
6	Diana T.G.	05/09/17	0.822	59.85
X		08/09/17	0.811	59.07
S		08/09/17	0.018	1.32
CV		08/09/17	0.023	2.19%

Tabla 26. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la precisión del método.

<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Decisión</b>
$\%CV \leq 3.00\%$	Cumple

Anexo 3: Validación del método de cuantificación para las pruebas de liberación del gel de formación *in-situ* de progesterona utilizando el espectrofotómetro AIS DT000CE-130.

Disoluciones

- Preparar 3 soluciones stock (SS) con una concentración de 10 mg/mL con 50 mg de progesterona en 5 mL usando MeOH como disolvente. Tomar una alícuota de 100  $\mu$ L y aforar a 10 mL con MeOH (SS2) para obtener una concentración de 100  $\mu$ g/mL.

1. Exactitud y repetibilidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Procedimiento

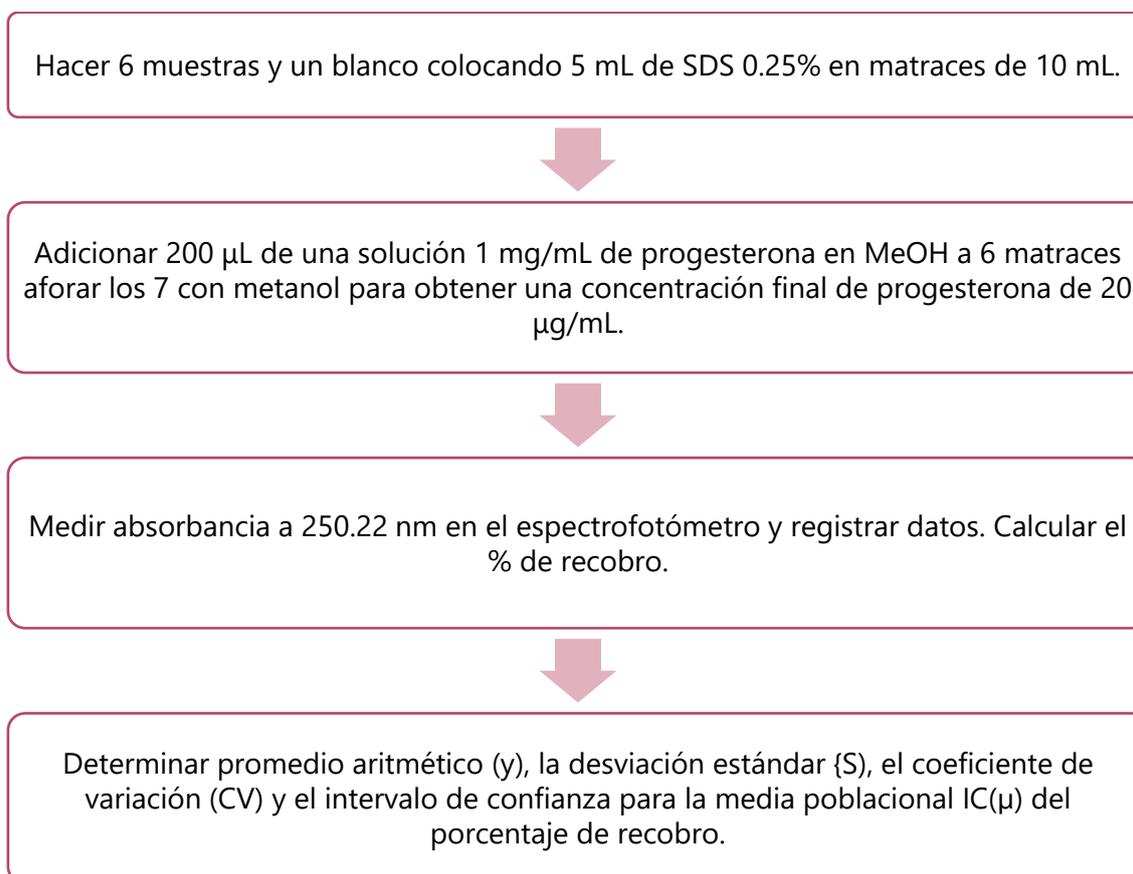


Figura 58. Procedimiento para evaluar el parámetro de exactitud y repetibilidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

## Resultados

Tabla 27. Resultados de la prueba para evaluar la exactitud y repetibilidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia 250.22 nm</b>	<b>%Recobro</b>
1	0.973	100.79
2	0.985	102.25
3	0.985	102.25
4	0.972	100.68
5	0.942	97.05
6	0.970	100.43
Y		100.58%
S		1.91
CV		1.89%
IC( $\mu$ )		102.7367375, 98.41741907

Tabla 28. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la exactitud y repetibilidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Decisión</b>
IC( $\mu$ ) debe incluir el 100%.	Cumple
$\%CV \leq 3.00\%$	Cumple

## 2. Linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

### Procedimiento

Preparar 5 soluciones usando 5 mL de SDS 0.25% en cada matraz de 10.0 mL y adicionando las siguientes alícuotas de una solución 1 mg/mL de progesterona en MeOH y aforar con MeOH. Realizar por triplicado las siguientes concentraciones de progesterona:

- 10 µg/mL (100 µL)
- 15 µg/mL (150 µL)
- 20 µg/mL (200 µL)
- 25 µg/mL (250 µL)
- 30 µg/mL (300 µL)



Medir absorbancia de las curvas en el espectrofotómetro a 250.22 nm. Usar como blanco una solución preparada con 5mL de SDS 0.25% y aforada a 10.0 mL con MeOH.



Graficar las curvas patrón y calcular el valor de la pendiente (m), la ordenada en el origen (b), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), el porcentaje de recobro  $IC(\beta_1)$ ,  $IC(\beta_0)$ ,  $IC(\mu)$  y el  $CV_{x/y}$

Figura 59. Procedimiento para evaluar el parámetro de linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

### Resultados

Tabla 29.1. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Curva	m	b	$r^2$	$IC(\beta_1)$	$IC(\beta_0)$
1	1.000	0	0.9990	0.9421, 1.0578	2.2506,-2.2520
2	1.001	0	0.9981	0.9272, 1.0747	2.0700,-1.2480
3	1.000	0	0.9978	0.9134, 1.0865	1.1705,-1.1705

Tabla 29.2. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

<b>Curva patrón 1</b>			
<b>Concentración teórica (µg/mL)</b>	<b>Absorbancia 250.22 nm</b>	<b>Concentración real (µg/mL)</b>	<b>%Recobro</b>
10	0.567	10.11	101.14
15	0.749	14.64	97.61
20	0.973	20.21	101.07
25	1.173	25.19	100.75
30	1.36	29.84	99.46
IC(µ)			101.87, 98.14
CV			1.50%

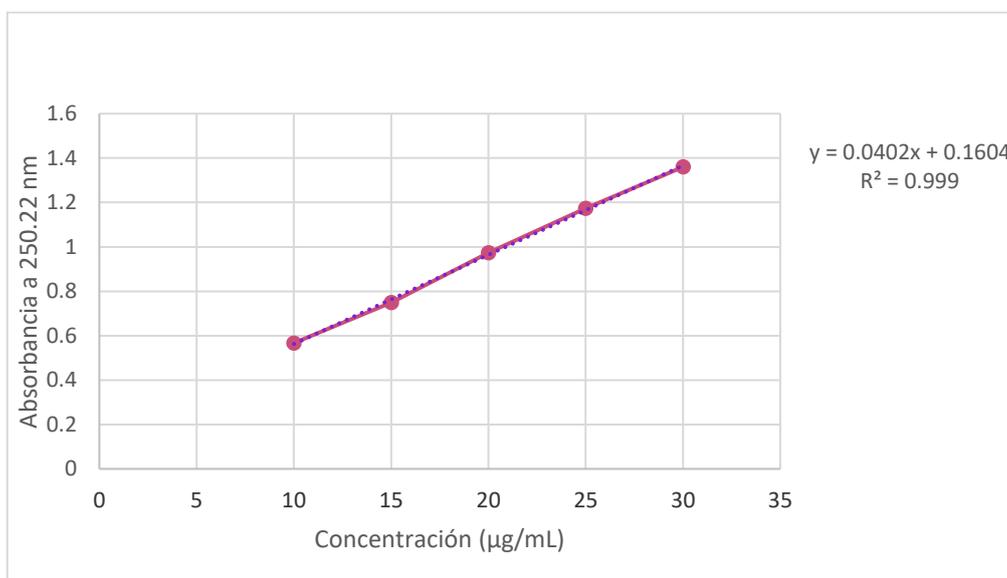


Figura 60. Curva patrón 1 para la prueba de linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Tabla 29.3. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

<b>Curva patrón 2</b>			
<b>Concentración teórica (µg/mL)</b>	<b>Absorbancia 250.22 nm</b>	<b>Concentración real (µg/mL)</b>	<b>%Recobro</b>
10	0.555	10.04	100.39
15	0.744	14.61	97.44
20	0.985	20.45	102.26
25	1.183	25.24	100.98
30	1.369	29.75	99.16
IC(µ)			102.32, 97.76
CV x/y			1.83%

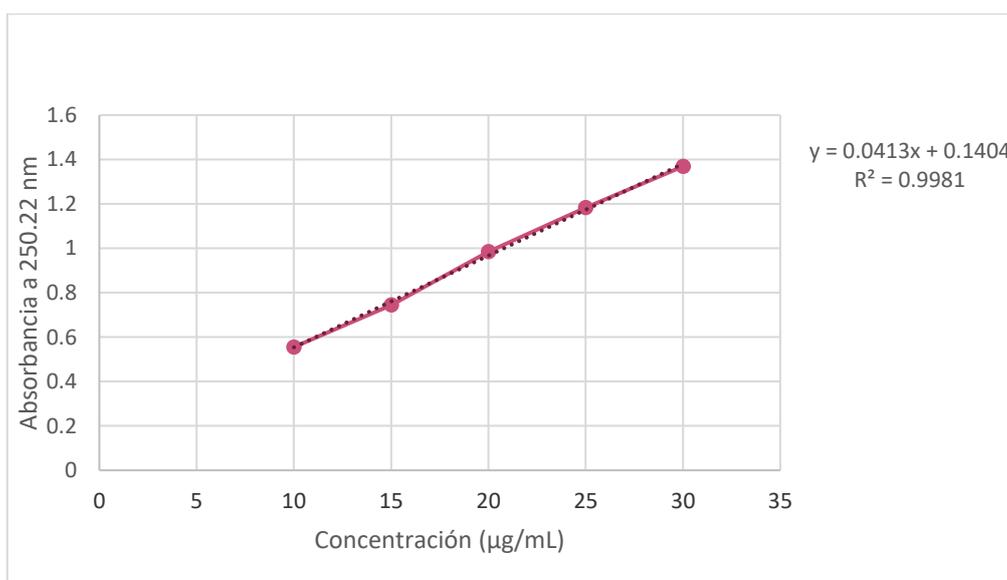


Figura 61. Curva patrón 2 para la prueba de linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Tabla 29.4. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Concentración teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia 250.22 nm	Concentración real ( $\mu\text{g/mL}$ )	%Recobro
10	0.542	9.78	97.85
15	0.756	14.90	99.36
20	0.985	20.38	101.91
25	1.194	25.38	101.53
30	1.368	29.54	98.48
IC( $\mu$ )			102.09, 97.57
CV			1.82%

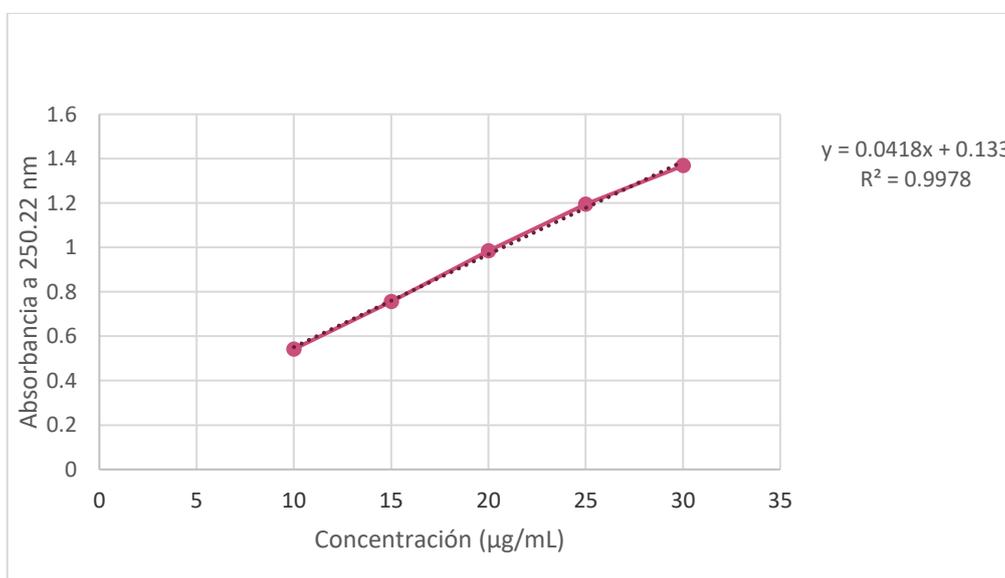


Figura 62. Curva patrón 2 para la prueba de linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Tabla 30. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Criterio de aceptación	Decisión
El IC( $\beta_1$ ) debe incluir la unidad.	Cumple
El IC( $\beta_0$ ) debe incluir el cero.	Cumple
$\%CV \leq 3\%$	Cumple
El IC( $\mu$ ) debe estar en el intervalo 97 - 103%	Cumple

### 3. Precisión del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

#### Procedimiento

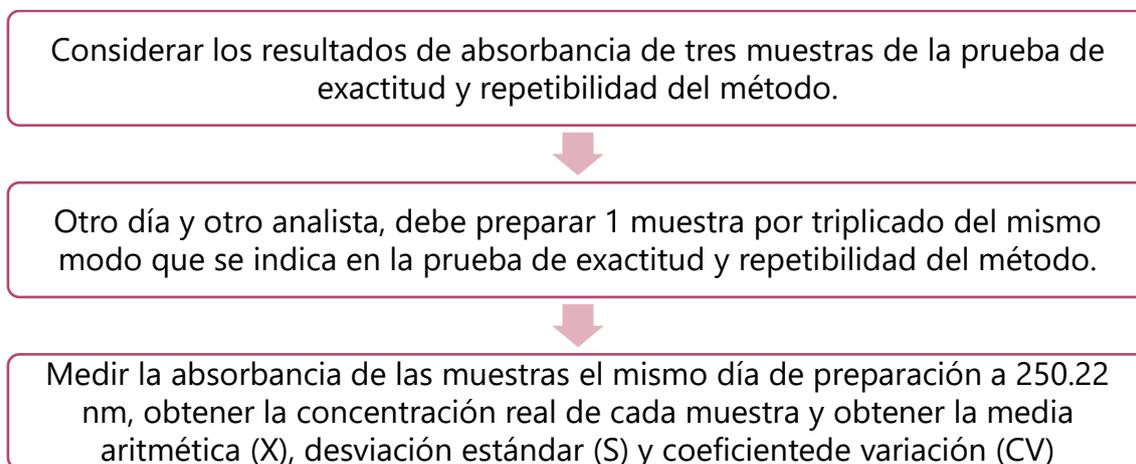


Figura 63. Procedimiento para evaluar el parámetro de precisión del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

#### Resultados

Tabla 31. Resultados de la prueba para evaluar la linealidad del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Muestra	Analista	Fecha	Absorbancia	Concentración (µg/mL)
1	Diana T. G.	21/11/17	0.972	20.13
2	Diana T. G..	21/11/17	0.942	19.40
3	Diana T. G.	21/11/17	0.97	20.09
4	Viridiana L.R.	12/12/17	0.964	19.94
5	Viridiana L.R.	12/12/17	0.971	20.11
6	Viridiana L.R.	12/12/17	0.978	20.28
X			0.971	19.99
S			0.013	0.31
CV			1.331	1.53

Tabla 32. Criterio de aceptación de la prueba para evaluar la precisión del método de cuantificación para las pruebas de liberación.

Criterio de aceptación	Decisión
$\%CV \leq 3.00\%$	Cumple

Anexo 4. Prueba de liberación.

Tabla 33. Resultados de las 5 pruebas de liberación.

Tiempo (h)/PG liberada	Vaso 1		Vaso 2		Vaso 3		Vaso 4		Vaso 5	
	mg	%								
0.50	9.27	9.27	9.38	9.38	9.38	9.38	9.38	9.38	9.38	9.38
0.75	12.87	12.87	13.37	13.37	13.37	13.37	13.37	13.37	13.37	13.37
3.55	31.14	31.14	36.59	36.59	30.88	30.88	36.07	36.07	33.41	33.41
22.13	33.63	33.63	41.26	41.26	34.72	34.72	40.73	40.73	41.04	41.04
24.97	31.01	31.01	39.99	39.99	35.20	35.20	39.03	39.03	38.86	38.86
21.13	33.11	33.11	41.13	41.13	34.72	34.72	41.04	41.04	39.56	39.56

Tabla 34. Resultados de la prueba de estabilidad realizados en una solución de progesterona en el medio de disolución (agar 0.5% y SDS 0.25%) por 3 días con el tratamiento de muestra descrito en el método.

Día	Absorbancia a 250.22 nm	Concentración (µg/mL)	Concentración teórica (µg/mL)	Porcentaje de recobro (%)
1	1.052	22.07	21.5	102.66
	1.022	21.35	21.5	99.28
	1.029	21.52	21.5	100.07
3	1.053	22.09	21.5	102.78
	1.026	21.44	21.5	99.73
	1.043	21.85	21.5	101.65
X				101.39
S				1.54
%CV				1.52%

Tabla 35. Resultados de la prueba de eficiencia de extracción de progesterona del medio de disolución con 5 mL de medio de disolución con progesterona, 5 mL de metanol y reposo de 2 h previo a la filtración.

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia a 250.22 nm</b>	<b>Concentración (µg/mL)</b>	<b>Concentración teórica (µg/mL)</b>	<b>Porcentaje de recobro (%)</b>
1	0.981	20.35	20.00	101.77
2	0.951	19.63	20.00	98.13
3	0.972	20.13	20.00	100.68
4	0.962	19.89	20.00	99.47
5	0.948	19.55	20.00	97.77
X				99.56
S				1.68
%CV				1.69%

Anexo 5. Gráficas correspondientes a la prueba de inyectabilidad.

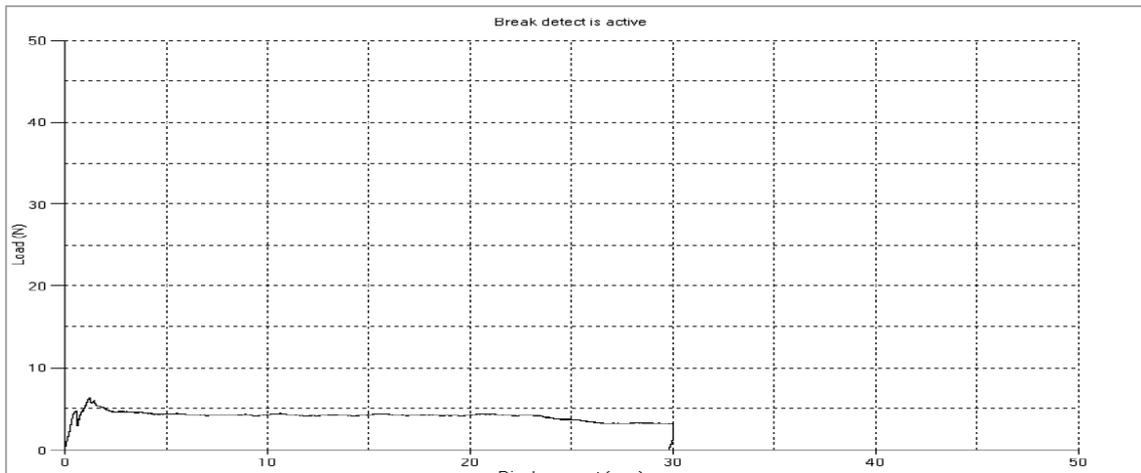


Figura 64. Medición blanco obtenida al inyectar la jeringa vacía.

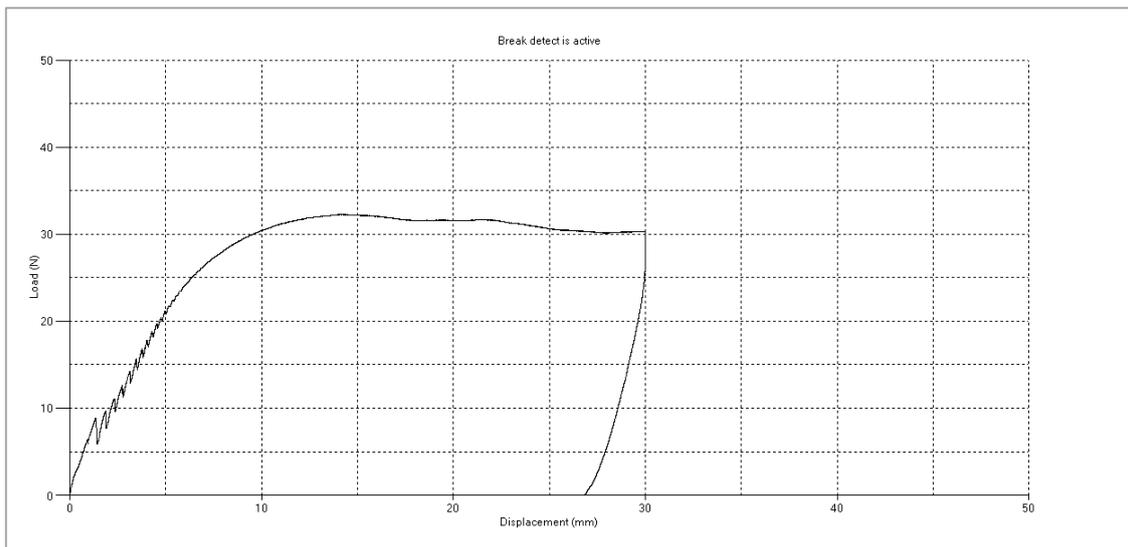


Figura 65. Medición de muestra 1 en aire.

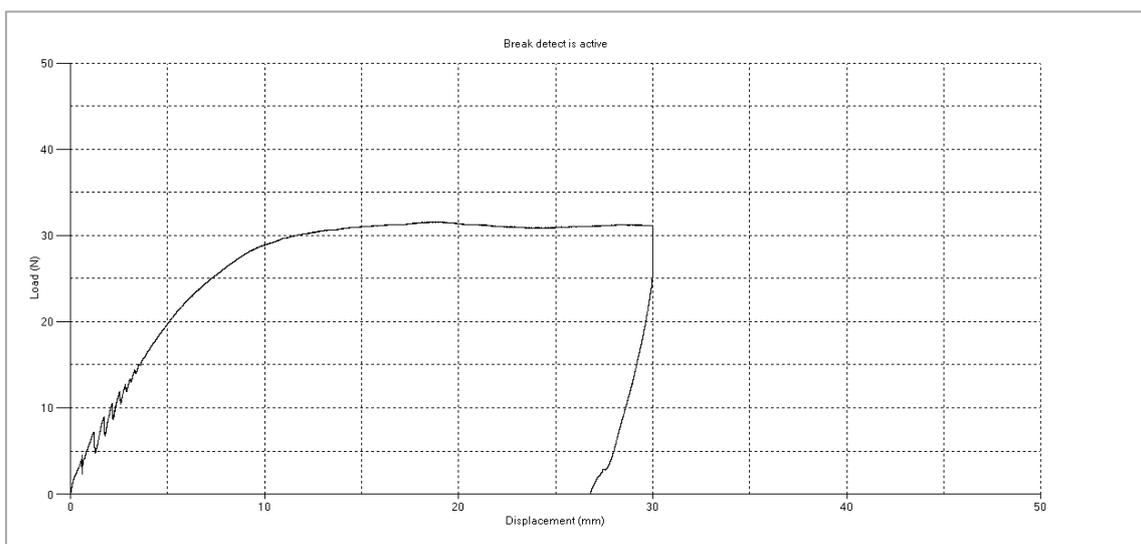


Figura 66. Medición de muestra 2 en aire.

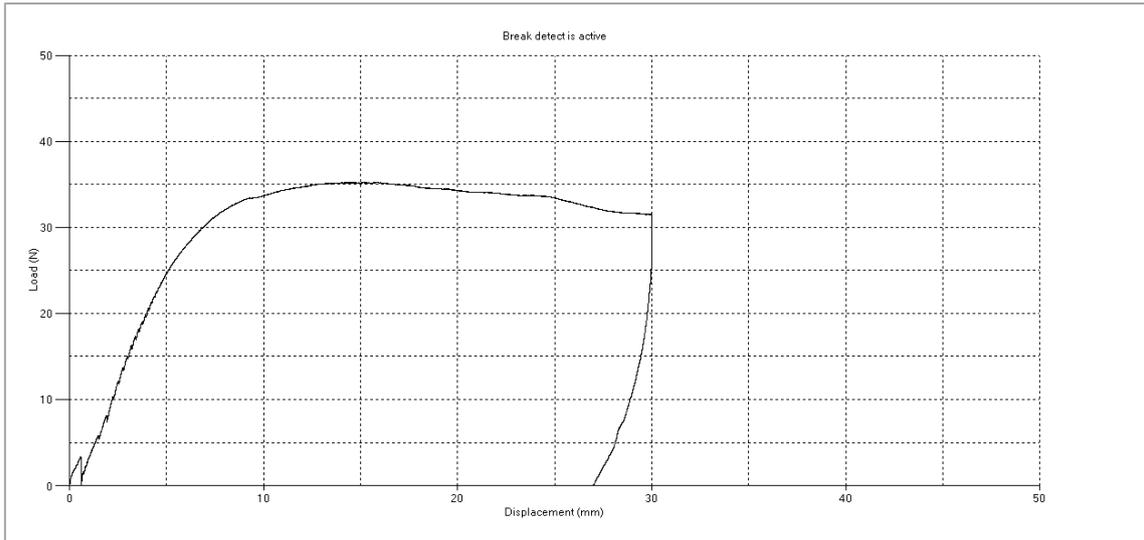


Figura 67. Medición de muestra 3 en aire.

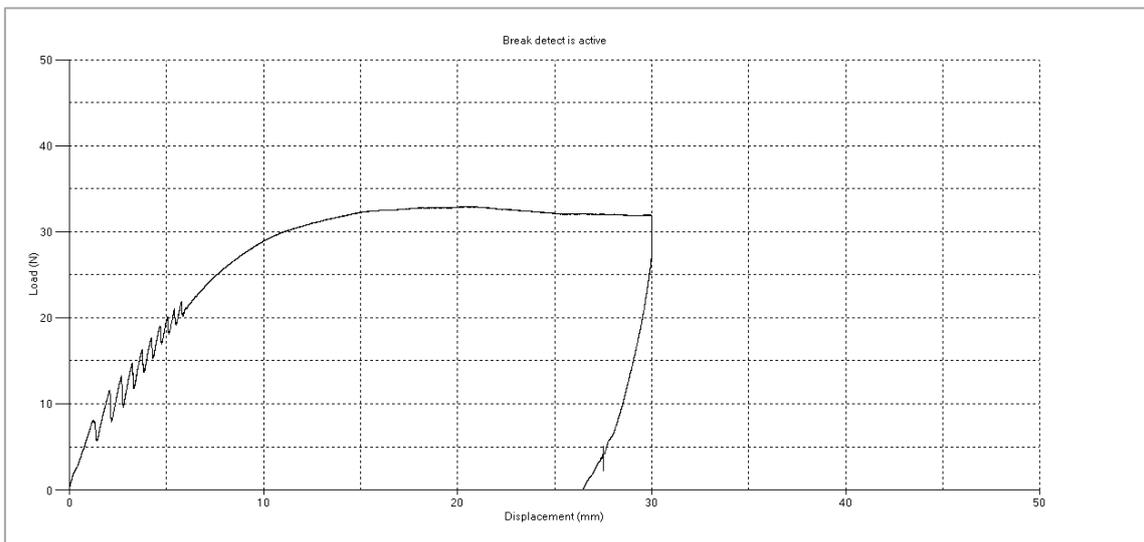


Figura 68. Medición de muestra 4 en aire.

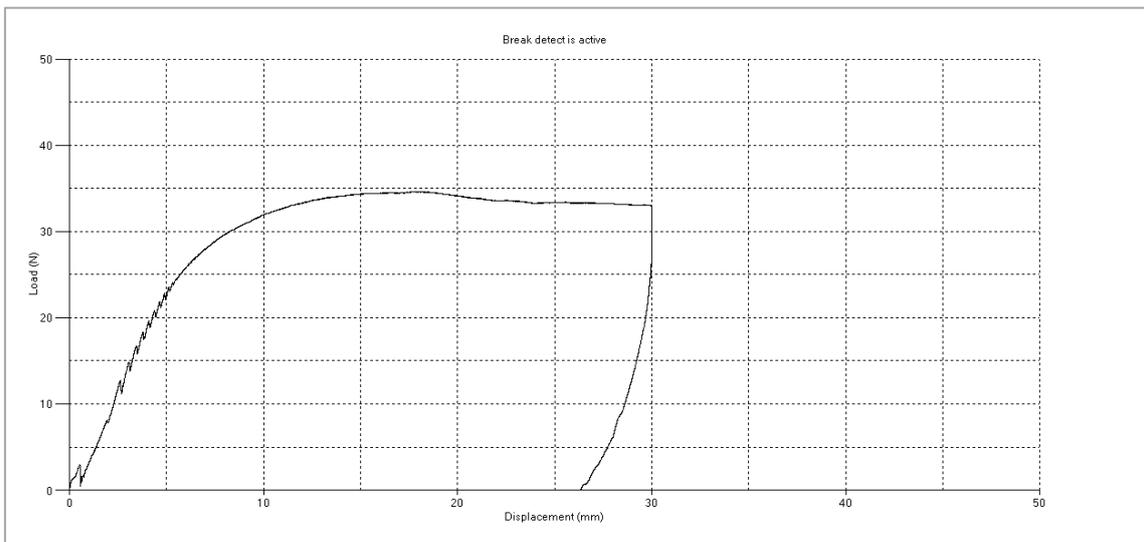


Figura 69. Medición de muestra 5 en aire.

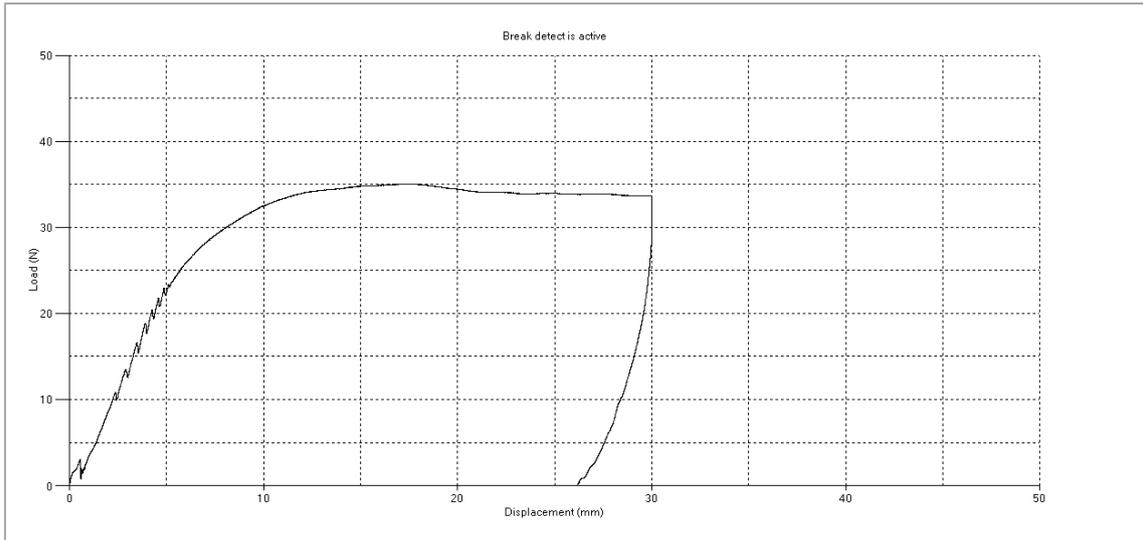


Figura 70. Medición de muestra 6 en aire.

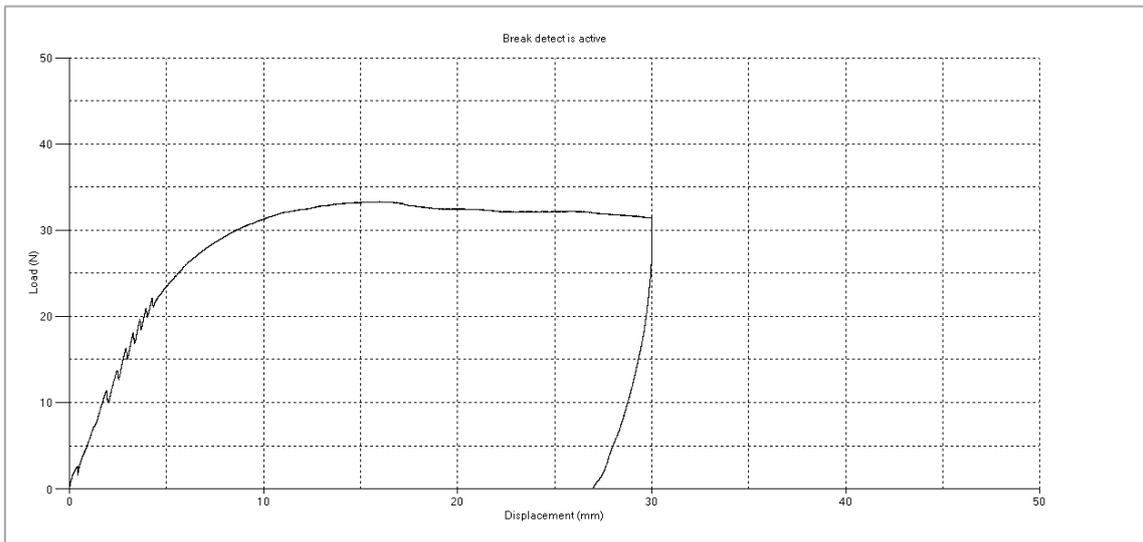


Figura 71. Medición de muestra 7 en aire.

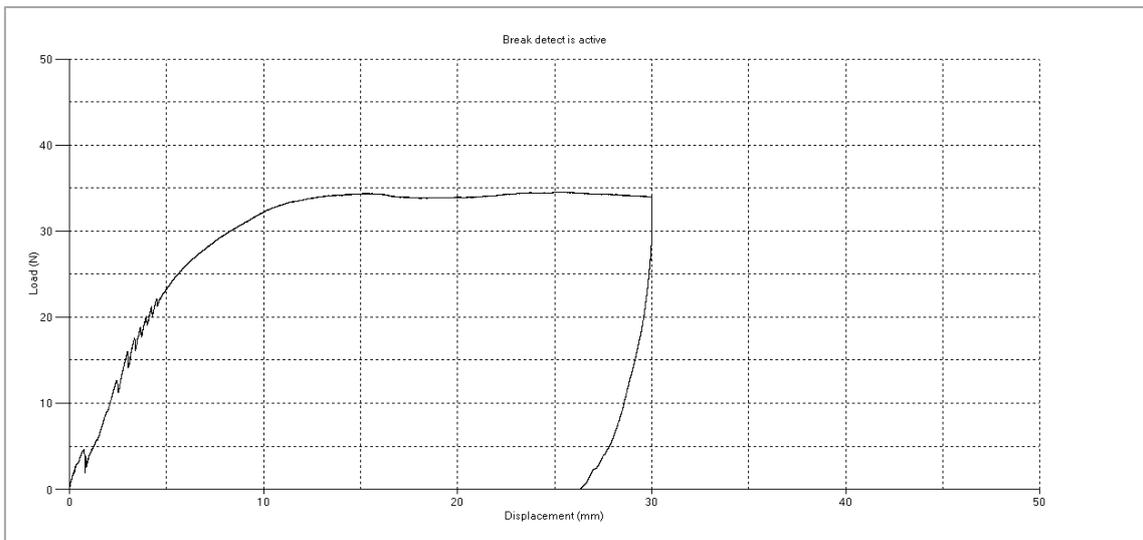


Figura 72. Medición de muestra 8 en aire.

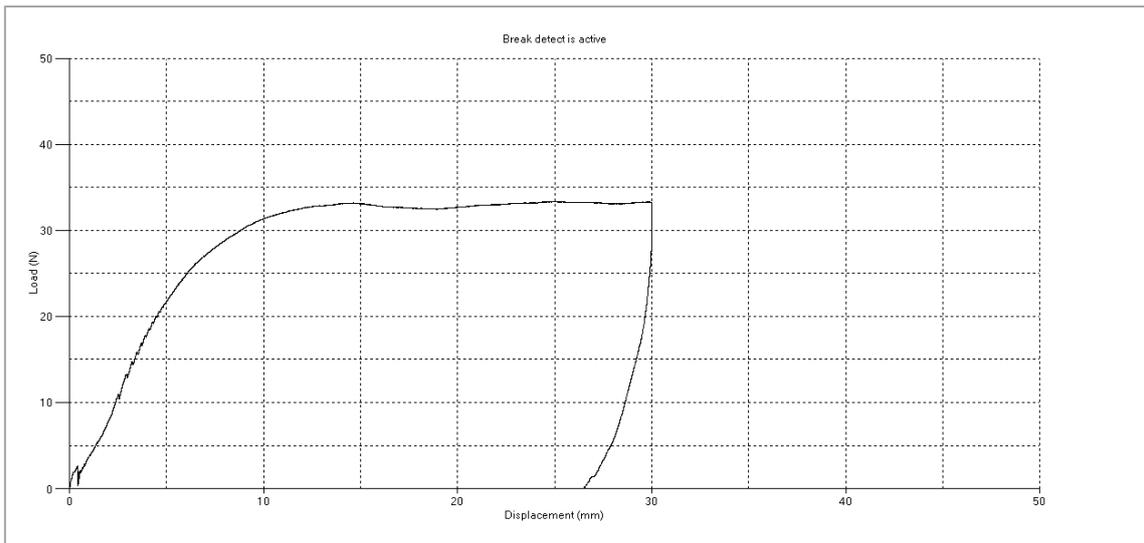


Figura 73. Medición de muestra 9 en aire.