

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 907 686**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 31/546 (2006.01)
A61P 15/14 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2016** **PCT/US2016/060015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017** **WO17079216**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2016** **E 16805561 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022** **EP 3370698**

54 Título: **Compuestos poliméricos sol-gel y sus usos**

30 Prioridad:

03.11.2015 US 201562250126 P
31.03.2016 US 201662315756 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2022

73 Titular/es:

ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US

72 Inventor/es:

RAJAGOPALAN, SUMITRA;
BAILLE, WILMS;
KUJAWA, PIOTR;
ZOOK, CHRISTOPHER A.;
QUESNELL, REBECCA R.;
HUCZEK, DENNIS L.;
SECREAST, STEPHEN L.;
LUO, LAIBIN y
SANDERS, TAMMY A.

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 907 686 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos poliméricos sol-gel y sus usos

CAMPO TÉCNICO

La presente divulgación se refiere en general a compuestos poliméricos sol-gel únicos y a sus usos novedosos. Más en particular, la divulgación se refiere a los compuestos poliméricos sol-gel que forman un sólido fuerte en respuesta a un estímulo fisiológico, el sólido fuerte que tiene una permeabilidad predeterminada y propiedades mecánicas en respuesta al estímulo fisiológico. Los compuestos son fácilmente inyectables y tienen propiedades de adelgazamiento por cizallamiento, lo que los hace útiles en una amplia gama de aplicaciones para salud humana y animal en las que es deseable inyectar un líquido que se solidifica rápidamente después de la inyección en un individuo. La divulgación también se refiere a nuevos procedimientos para proteger las glándulas mamarias de los animales de ganado lácteo de la carga patógena utilizando los compuestos como selladores de pezones para disminuir o prevenir la incidencia de mastitis en los animales.

ANTECEDENTES

Los hidrogeles son redes macromoleculares altamente hidratadas, dispersas en agua u otros fluidos biológicos. Los hidrogeles que presentan la propiedad específica de aumentar la viscosidad con el aumento de la temperatura se conocen como hidrogeles termorreversibles, termosensibles (o termoestables). Es sabido que los hidrogeles termosensibles pueden prepararse a partir de polímeros de origen natural, tal como el quitosano, que es un polímero comercialmente disponible y económico, obtenido por desacetilación parcial o sustancial de alcalina de la quitina, un polisacárido lineal, formado por unidades de N-acetilglucosamina, unidas mediante enlaces β -1,4-glicosídicos. El procedimiento de desacetilación se realiza generalmente utilizando soluciones calientes y concentradas de hidróxido, generalmente hidróxido de sodio.

El quitosano es biocompatible, no tóxico y no inmunógeno, lo que permite su uso en los campos médicos, farmacéuticos, cosméticos y de construcción de los tejidos. Por ejemplo, se han utilizado aplicaciones tópicas oculares e inyecciones intraoculares o trasplantes en la proximidad de la retina. Además, el quitosano es metabolizado-escindido por ciertas enzimas específicas, por ejemplo, la lisozima, por lo que puede considerarse biodegradable. Además, se ha informado que el quitosano actúa como potenciador de la penetración al abrir las uniones estrechas epiteliales. El quitosano también favorece la cicatrización de las heridas y presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales.

La complejidad de las estructuras biológicas, tal como los tejidos naturales, ha llevado a los investigadores a explorar el uso de biomateriales y dispositivos médicos que se introducen en la piel o en el cuerpo de un individuo como un líquido y que se vuelven sólidos o similares a un sólido mediante una simple aplicación o inyección. Por ejemplo, los hidrogeles de quitosano han demostrado ser útiles para la regeneración del cartílago y la prevención del dolor de rodilla asociado a los defectos agudos y crónicos del cartílago. También se ha demostrado que los geles a base de quitosano se convierten y sirven como andamiajes para la encapsulación de células del disco intervertebral (DIV) al atrapar grandes cantidades de proteoglicanos aniónicos recién sintetizados. Es sabido que el quitosano forma geles termorreversibles en presencia de varios aniones multivalentes, como los derivados del fosfato. La formación de geles de polisacáridos iónicos dependientes de la temperatura, como los sistemas acuosos de quitosano/organofosfato, se ha descrito, por ejemplo, en la Publicación internacional de PCT Núm. WO 99/07416 y en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.344.488. Sin embargo, los hidrogeles fabricados a partir de polisacáridos iónicos, como el quitosano, son débiles y suelen formarse sólo tras un tiempo de espera relativamente largo, después de mezclar el polímero y la solución salina. Esto se debe principalmente al hecho de que es difícil obtener soluciones de quitosano homogéneas y completamente hidratadas con una alta concentración de quitosano, especialmente de alto peso molecular, debido a su escasa solubilidad. Además, varias aplicaciones médicas requieren no sólo una transición sol-gel sencilla, sino una estructura sólida con la macroporosidad y las propiedades mecánicas deseadas. Además, la temperatura es un estímulo no específico y puede ser desencadenada por elementos ajenos al cuerpo humano, como el clima caluroso o, en el caso de las aplicaciones orales, el simple hecho de ingerir una bebida caliente. Por lo tanto, se necesitan implantes y parches que respondan a los estímulos y que puedan alcanzar las propiedades mecánicas y/o de permeabilidad deseadas sólo cuando sean activados por estímulos fisiológicos específicos.

La Patente de los Estados Unidos Núm. 9.034.348 desvela mezclas inyectables de quitosano que forman hidrogeles. Se describen composiciones de quitosano que forman un hidrogel a un pH casi fisiológico y a 37°C, que comprenden al menos un tipo de quitosano que tiene un grado de acetilación en el intervalo de aproximadamente 30% a aproximadamente 60%, y al menos un tipo de quitosano que tiene un grado de desacetilación de al menos aproximadamente 70%. Además, se desvela una composición de quitosano que forma un hidrogel a un pH casi fisiológico y a 37°C que incluye al menos un tipo de quitosano con un grado de desacetilación de al menos 70% y un peso molecular de 10-4000 kDa, y al menos un tipo de quitosano con un peso molecular de 200-20000 Da. También son desvelados procedimientos de preparación y usos de las composiciones de quitosano.

La Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2010/0028434 desvela soluciones acuosas biopoliméricas autogelificantes dependientes de la temperatura y del pH. Se describen composiciones acuosas

líquidas biopoliméricas para producir sistemas y geles autogelificantes, que comprenden un medio ácido de base acuosa, de 0,1 a 10% en peso de un biopolímero soluble en ácido con pH gelificante, y de 0,1 a 10% en peso de una molécula soluble en agua que tiene un carácter básico y un pKa entre 6,0 y 8,4, o un residuo o secuencia de la molécula soluble en agua que tiene un carácter básico y un pKa entre 6,0 y 8,4. Las composiciones líquidas tienen un pH final que oscila entre 5,8 y 7,4, y forman un gel sólido y homogéneo estable dentro de un intervalo de temperatura de 10 a 70°C. También se describen los procedimientos de preparación de las composiciones y sus usos.

La Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2010/0285113 desvela hidrogeles compuestos de gelificación térmica inversa que tienen una estabilidad mejorada. Se describen hidrogeles compuestos que comprenden una mezcla de una solución acuosa de un polisacárido aniónico o un derivado del mismo, como el hialuronano (también conocido comúnmente como ácido hialurónico) o un derivado del mismo, y una solución acuosa de metilcelulosa u otro derivado de celulosa soluble en agua del mismo, que tiene partículas poliméricas dispersas, como partículas poliméricas hidrófobas en el mismo seleccionadas entre micropartículas y nanopartículas, y en los que la estabilidad del hidrogel se mejora en relación con la estabilidad del hidrogel solo. Las partículas poliméricas pueden contener al menos un agente terapéutico, en cuyo caso cada agente terapéutico exhibe una tasa de liberación sostenida lineal que puede ser sintonizada o alterada mediante la selección de la formulación polimérica apropiada de las micropartículas y/o nanopartículas. El compuesto puede ser inyectable y, en ausencia de un agente terapéutico, puede utilizarse como agente de relleno para la cirugía reconstructiva y estética o puede actuar como plataforma para la posterior administración de agentes terapéuticos. El documento US 2005/0191270 desvela hidrogeles sol-gel a base de quitosano para su uso como selladores para la curación y la prevención de la mastitis.

En lo que respecta a las cuestiones de salud veterinaria, la mastitis es una inflamación de la glándula mamaria que suele estar causada por bacterias que, en la mayoría de los casos, entran en la glándula a través del orificio del pezón. Durante el período de no lactancia o "período seco" en la glándula, los depósitos de queratina en el orificio del pezón y el canal de la veta forman un mecanismo de defensa primario. El tapón de queratina que se forma en el pezón del animal constituye una barrera protectora, y los tejidos ricos en inmunidad de la roseta de Furstenburg en el pezón, así como los factores protectores naturales de las secreciones de las vacas secas, contienen altos niveles de sustancias antibacterianas naturales (proteínas catiónicas) que inhiben el paso de las bacterias desde el orificio del pezón hasta la cisterna del mismo (seno papilar) y la cisterna de la glándula. Sin embargo, dicho tapón de queratina y dichos mecanismos naturales de defensa inmunitaria pueden ser superados por la invasión bacteriana cuando el animal entra en el período seco al final de la lactancia, durante el período seco del animal, y/o durante el parto. Como resultado, las bacterias invaden la glándula y causan mastitis durante el período seco o, más particularmente, inmediatamente después del parto.

Los principales patógenos causantes de la mastitis son de las especies *Staphylococcus* tal como, por ejemplo, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* y similares, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma*, coliformes como, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp. y *Citrobacter* spp., especies *Streptococcus* ambientales tal como, por ejemplo, *Strep. dysgalactiae*, *Strep. uberis* y *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. Aunque la mastitis está causada principalmente por bacterias, la inflamación también puede producirse como resultado de una infección vírica (por ejemplo, herpesvirus bovino II y IV, un virus paravaccinia como Pseudo Cowpox, y similares) o una infección con patógenos atípicos como microbios micóticos (por ejemplo, *Candida* spp. y *Aspergillus* spp.) o algales (por ejemplo, *Prototheca* spp.) con o sin desarrollo de una infección bacteriana secundaria.

La mastitis debida a la presencia de patógenos puede convertirse en una condición altamente contagiosa dentro de los confines de una granja lechera que resulta en enormes pérdidas de producción para la industria láctea. La reducción de la leche potable se produce entonces por los efectos de los patógenos nocivos o por diversos tratamientos que hacen que la leche no sea apta para el consumo humano. Si bien los casos graves pueden acabar en la muerte, los brotes no controlados también pueden causar daños permanentes en las ubres de los animales. La mastitis, que es una de las principales enfermedades endémicas de los animales de ganado lácteo, pone en peligro el bienestar de los animales y suele conllevar una atención veterinaria muy costosa. El valor de proteger el período de lactancia temprana de las infecciones existentes y nuevas perpetuadas desde el período seco sigue siendo muy valioso para la industria. Está claro que el tratamiento y el control de la mastitis es un objetivo importante para mantener la salud del animal y reducir los altos costes de la producción de leche en la industria láctea.

Para ello, se han desarrollado productos que intentan sellar el pezón de un animal para prevenir la mastitis y otras afecciones, por ejemplo, los selladores de pezón de barrera para sellar la superficie externa y el canal del pezón durante los períodos de ordeño y los selladores de pezón internos para bloquear o sellar el canal del pezón o para tapar la cisterna del pezón durante el período seco, especialmente en el caso de las novillas y las vacas que han experimentado uno o más embarazos anteriormente.

Junto con estos productos, se describen en la técnica diversos procedimientos para reducir la incidencia de la mastitis, por ejemplo, un procedimiento que comprende la administración secuencial desde un único dispositivo de administración de una formulación antimicrobiana y una formulación de sellado en el canal del pezón de un animal no humano en el que la formulación de sellado es una sal de metal pesado no tóxica como el bismuto (Patente de los Estados Unidos Núm. 8.353.877); un procedimiento de aplicación al canal del pezón y/o al seno del pezón de una composición que comprende queratina exógena (Patente de los Estados Unidos Núm. 8.226.969); un procedimiento

de formación de una barrera física en el canal del pezón para la profilaxis durante el período seco de un animal mediante la infusión de una cantidad de una formulación de sellado del pezón en el canal del pezón del animal, en el que la formulación de sellado del pezón comprende una sal de metal pesado de titanio, zinc, bario o sus combinaciones, libre de bismuto y no tóxica, y la barrera física no causa un defecto de punto negro en los productos lácteos hechos con leche del animal (Patente de los Estados Unidos Núm. 7.906.138); un procedimiento de formación de una barrera física libre de antiinfecciosos en el canal del pezón del animal para el tratamiento profiláctico de la mastitis durante el período seco que comprende el paso de infundir una formulación de sellado en el canal del pezón del animal sin un agente antiinfeccioso, en el que la formulación de sellado comprende una sal de metal pesado no tóxica como el bismuto en una base de gel de estearato de aluminio con un vehículo como parafina líquida o una base de gel que comprende un gel de polietileno (Patente de los Estados Unidos Núm. 6.254.881) y similares.

Sin embargo, ninguna de las formulaciones de sellado o productos de inmersión externa existentes sella el pezón del animal de ganado lácteo externamente durante un tiempo suficiente para prevenir la mastitis, particularmente la forma que puede ser fatal y/o muy contagiosa en los animales, como entre las novillas. Además, si bien los selladores de pezones se han establecido como un procedimiento viable para proporcionar un mayor nivel de protección, independientemente de la elección o administración de antibióticos, los productos actuales en el mercado no logran satisfacer la demanda de facilidad de uso y adherencia duradera a los tejidos, facilidad de eliminación, evitar la contaminación de la leche y prevenir el defecto de la mancha negra en el queso envejecido. Por lo tanto, lo que se necesita es una formulación no tóxica que sea fácil y segura de administrar para el manipulador de animales y que, preferentemente, forme un sello eficaz y duradero en el lugar directamente en el tejido (es decir, *"in situ"*). Además, es necesario que la formulación del sello no interfiera con la calidad de la leche del animal de ganado lácteo, el yogur o los productos de queso creados a partir de la leche, especialmente para que el sellador evite el defecto de la mancha negra en el queso curado. De hecho, existe una necesidad reconocida en el campo veterinario de encontrar una formulación de sellado duradera, no tóxica y no irritante que forme una barrera adecuada en el pezón del animal para prevenir o reducir significativamente la incidencia de mastitis causada por patógenos, preferentemente sin el uso de antibióticos u otros agentes medicinales que requieran un período de retención para el consumo público de la leche del animal. También es necesario encontrar una fórmula de sellado de larga duración que pueda contener antibióticos y similares para el tratamiento eficaz o la prevención de la mastitis.

Es un objeto de la presente tecnología, por lo tanto, proporcionar compuestos poliméricos sol-gel que mejoren los inconvenientes de los hidrogeles conocidos.

BREVE SUMARIO

La presente divulgación se refiere a nuevos compuestos poliméricos sol-gel que comprenden quitosano, un polímero hidrófilo y un agente de gelificación en un medio adecuado. La invención se expone en las reivindicaciones de la presente memoria. El compuesto polimérico sol-gel forma un sello duradero o un sólido resistente en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos. Esta divulgación se refiere además a los compuestos poliméricos sol-gel en una variedad de usos médicos y veterinarios. Los compuestos poliméricos sol-gel de la presente invención se utilizan para prevenir o tratar la mastitis en un mamífero hembra no humano. Específicamente, la divulgación involucra dichos compuestos poliméricos sol-gel en nuevos procedimientos de formación de una barrera física en el canal del pezón de un animal de ganado lácteo para el tratamiento profiláctico o la prevención de desórdenes mamarios que ocurren principalmente cuando el animal entra en el período seco o durante el período seco, comprendiendo el paso básico de aplicar externamente un compuesto polimérico sol-gel al pezón del animal o infundir el compuesto dentro del canal del pezón o cisterna. La composición se gelifica o solidifica rápidamente en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos, incluyendo la temperatura, para formar un sólido fuerte. Esta divulgación también proporciona sistemas para formar una barrera física en el canal del pezón de un animal de ganado lácteo para el tratamiento de trastornos mamarios, dicho sistema comprende un compuesto polimérico sol-gel y un dispositivo de infusión para infundir la composición en la cisterna del pezón del animal. Estos sistemas permiten que el sellador de pezones bloquee la invasión de la glándula mamaria por un microorganismo causante de mastitis o que disminuya la aparición o reaparición de la infección.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los antecedentes de la divulgación y su desviación de la técnica se describirán más adelante con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra los gráficos de la dependencia temporal del módulo elástico (G') y de la tangente de pérdida ($\tan \delta = G''/G'$) ante un salto de temperatura de 25 a 37°C registrado a $f = 0,1$ Hz y una tensión oscilatoria de $\tau = 1$ Pa, para (A) las formulaciones F 1-20141210 y (B) F4-20141210.

La Figura 2 muestra un gráfico de la dependencia temporal del módulo elástico (G') y de la tangente de pérdida ($\tan \delta = G''/G'$) ante un salto de temperatura de 25 a 37°C para la formulación F1-20141210 registrado en el tiempo 0 y 12 semanas después de la esterilización a $f = 0,1$ Hz y tensión oscilatoria de $\tau = 1$ Pa.

La Figura 3 muestra un gráfico de los resultados del barrido de tensiones para las formulaciones F1-20140825 (no estéril) y F1-20141210 (estéril y almacenada durante 12 semanas a temperatura ambiente) registrados a

una frecuencia de oscilación $f = 0,1$ Hz y una temperatura $T = 25^{\circ}\text{C}$. La flecha indica el inicio de la región de adelgazamiento por cizallamiento, que fue similar para ambas muestras.

La Figura 4 muestra un gráfico de la dependencia de la temperatura de gelificación de la cantidad de celulosa nanocristalina (NCC) para una formulación de 17% p/p de Pluronic® F127 en 1% p/p de quitosano (CH) (pH de aproximadamente 6).

La Figura 5 muestra un gráfico de la viscosidad de PVA-acilato a 6 s-1 en función del tiempo y a diferentes temperaturas.

La Figura 6 muestra los resultados del barrido de tensiones para las formulaciones compuestas de polímeros sol-gel F1-F4, como se indica, a una frecuencia de oscilación $f = 0,1$ Hz y una temperatura $T = 25^{\circ}\text{C}$. Las flechas indican el comienzo de la región de cizallamiento.

La Figura 7 muestra la dependencia temporal del módulo elástico G' y de la tangente de pérdida, $\tan \delta = G''/G'$, ante un salto de temperatura de 25 a 37°C registrado a $f = 1$ Hz y una tensión oscilatoria de $\tau = 1$ Pa.

La Figura 8 muestra la tasa de liberación promedio de amoxicilina a partir de la formulación compuesta de polímero sol-gel F2 a $T=25^{\circ}\text{C}$ y $T=37^{\circ}\text{C}$. Las barras de error representan la desviación estándar ($n=3$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

De acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan nuevos compuestos poliméricos sol-gel que comprenden quitosano, un polímero hidrófilo que comprende metilcelulosa, y un elemento termogelificante que comprende una sal seleccionada del grupo que consiste en pirofosfato sódico tetrabásico, fosfato potásico dibásico trihidrato, y sus mezclas, en un medio ácido de base acuosa. El compuesto polimérico sol-gel tiene propiedades de adelgazamiento por cizallamiento, de manera que el compuesto puede deformarse en una jeringa a temperatura ambiente. El compuesto polimérico sol-gel también puede inyectarse con una jeringa de un solo barril y similares. El compuesto es capaz de formar un sólido, a menudo un sólido especialmente fuerte, en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos sin la adición de ningún otro agente. En la respuesta al estímulo, el compuesto polimérico sol-gel suele solidificarse rápidamente. Otra ventaja es que el compuesto proporciona un sólido de gelificación instantánea capaz de soportar presiones mecánicas o hidráulicas en condiciones fisiológicas. Además, el compuesto es capaz de formar un tapón sin fugas ni goteos tras la inyección en un individuo mamífero.

La divulgación proporciona además los compuestos poliméricos de sol-gel que se benefician de las formulaciones especialmente diseñadas para un uso preferente relativo a un procedimiento único de formación de una barrera física en el canal del pezón de un animal de ganado lácteo para el tratamiento profiláctico de los trastornos mamarios que suelen producirse cuando el animal comienza a secarse o durante el período de secado, que comprende el paso de administrar un compuesto polimérico sol-gel al pezón o dentro del canal del pezón del animal, abarcando la composición que se gelifica o solidifica rápidamente en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos, incluyendo la temperatura, para formar un sello duradero o un sólido fuerte. Además, los compuestos poliméricos sol-gel de la presente invención bloquean la invasión de la glándula mamaria por parte de los microorganismos causantes de la mastitis y reducen o previenen la incidencia de nuevas infecciones o reinfecciones.

La presente divulgación incluye sistemas para formar una barrera física, que es preferentemente una barrera interna dentro del canal del pezón, de un animal de ganado lácteo para prevenir trastornos mamarios o para disminuir los efectos nocivos de la infección, dicho sistema comprende un compuesto polimérico sol-gel y un dispositivo de administración para infundir la composición en la cisterna del pezón del animal. Estos sistemas permiten bloquear la invasión de la glándula mamaria por un microorganismo causante de mastitis o disminuir el riesgo de aparición o reaparición de la infección. Más en particular, la presente divulgación proporciona procedimientos y sistemas en los que el compuesto polimérico sol-gel se infunde predominantemente cuando el animal comienza a secarse o durante el período de secado de un animal de ganado lácteo, preferentemente una ternera o una vaca, pero también puede incluir otros animales como cabras, ovejas, búfalos de agua y similares. El compuesto de polímero sol-gel actúa como un auxiliar en la prevención y el control de la mastitis durante el período de secado, reduciendo así los casos clínicos y subclínicos durante el período de secado y en la primera etapa (posparto) de la lactancia. Al permanecer en el canal del pezón durante todo el período de secado, el compuesto de polímero sol-gel elimina o reduce la invasión microbiana a través del canal del pezón durante los períodos de alto riesgo en el animal de ganado lácteo pre-fresco.

En un aspecto, la divulgación proporciona compuestos poliméricos de sol-gel para su uso en procedimientos para combatir la mastitis mamaria microbiana en un animal de ganado lácteo cuyo procedimiento permite que la leche obtenida del animal se utilice en la producción de un producto lácteo, comprendiendo el procedimiento la aplicación tópica o la infusión de un compuesto polimérico de sol-gel directamente en el tejido mamario pertinente de un animal de ganado lácteo o dentro del canal del pezón para formar un sello del pezón. Este sellador de pezones se administraría típicamente por vía intramamaria en cada pezón en el momento del secado. Preferentemente, el compuesto polimérico sol-gel se aplica o infunde antes de la infección de un animal sano. En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para reducir el tiempo de retención de la leche obtenida de un animal que está siendo tratado por mastitis antes de que se permita el consumo público en la producción de un producto lácteo, donde

el compuesto polimérico sol-gel se aplica tópicamente o se infunde dentro del canal del pezón del animal. La presente divulgación también proporciona procedimientos para reducir el tiempo de retención de la leche obtenida de un animal que está siendo tratado profilácticamente para prevenir o reducir la frecuencia de la mastitis con el fin de mejorar la producción de un producto lácteo, en el que un compuesto polimérico sol-gel se aplica tópicamente o se infunde dentro del canal del pezón del animal.

Aún más en particular, la presente divulgación proporciona los procedimientos anteriores en los que el producto lácteo es leche, yogur o queso. Cuando el producto lácteo es leche, los procedimientos abarcan leche seca o fluida. Asimismo, la divulgación proporciona dichos procedimientos en los que el compuesto polimérico sol-gel se administra mediante infusión intramamaria o por inmersión en el pezón. En todas las realizaciones, el animal no humano que necesita los usos veterinarios pertinentes de la presente divulgación es preferentemente una novilla o una vaca, pero también puede ser otro animal de ganado lácteo; y la administración se logra preferentemente mediante infusión intramamaria cuando el animal comienza a secarse o durante el período de secado. Además, la divulgación proporciona tales procedimientos en los que el compuesto polimérico sol-gel se administra durante el período posparto de un animal no lactante o en los que el compuesto polimérico sol-gel se administra durante el período de parto de un animal.

El sellador de pezones de la presente divulgación ofrece muchas ventajas con respecto a los selladores actuales en el mercado a través de una mayor facilidad de uso (tanto en la administración como en la eliminación), así como en la suma total de su novedoso perfil de calidad, por ejemplo, la no toxicidad, la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, la elasticidad (flexibilidad), la adherencia tisular duradera, la administración en jeringa, la fluidez a temperatura ambiente, la capacidad de solidificarse en respuesta a la temperatura corporal, el rápido tiempo de gelificación a 37°C, la naturaleza no irritante e inerte, etc. En particular, los hidrogeles sol-gel infusibles de base acuosa y de transición térmica son excepcionalmente fluidos a temperatura ambiente, pero forman un gel a temperatura corporal en el canal del pezón. Las formulaciones de polímeros sol-gel demuestran una característica de adelgazamiento por cizallamiento adaptable que permite la facilidad de infusión en un amplio intervalo de temperaturas, así como la eliminación por extracción manual del canal del pezón. Al retirarlo de la cavidad del cuerpo, el compuesto polimérico sol-gel vuelve a una fase líquida a temperatura ambiente, lo que supone un beneficio real para la industria láctea. Además, a diferencia de los selladores comerciales actuales, el sellador de pezones de esta divulgación no se adhiere a las tuberías de acero inoxidable (líneas de leche) o a los tanques a granel durante la etapa de procesamiento inicial de la leche y es limpiable (es decir, se limpiará fácilmente de las superficies industriales) durante los lavados estándar con agua fría o caliente, lo que en última instancia evita la contaminación de la leche, impidiendo así el defecto de la mancha negra que a menudo se observa en el queso envejecido y que es causado por los selladores de pezones convencionales conocidos.

También es beneficioso que el sellador de pezones de la divulgación elimine o reduzca significativamente el tiempo de retención de la leche obtenida de un animal no humano que está siendo tratado profilácticamente para la mastitis, evitando así o disminuyendo el período de descarte de leche estándar que se requiere cuando los animales reciben antibióticos. Igualmente práctico, el sellador de pezones puede diseñarse preferentemente para que sea totalmente compatible con los cultivos iniciadores del queso cuando se prepara con un pH relativamente neutro, variando el componente salino del compuesto polimérico sol-gel. El calostro de los animales tratados también es seguro para alimentar a los terneros.

Definiciones

Debe apreciarse que todos los términos científicos y tecnológicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado tal como lo entienden comúnmente los expertos en la técnica. Las siguientes definiciones se dan simplemente para ilustrar el significado general de los principales términos utilizados en relación con la presente divulgación.

El término "ubre" se refiere en la presente memoria a la estructura glandular y mamaria de un animal rumiante hembra como una vaca, una cabra, una oveja, un búfalo de agua y similares. En las vacas, comprende cuatro glándulas independientes, con un pezón y un conducto de salida cada una, mientras que la oveja y la cabra tienen dos glándulas. El término "pezón" se refiere en la presente memoria a la parte saliente de la glándula mamaria que contiene parte de la leche o seno del pezón.

El término "sellador de pezones" se refiere en la presente memoria a las composiciones y dispositivos utilizados para formar una barrera física en la superficie o en el interior de un pezón animal. El sellador del pezón puede estar en la superficie del pezón, en el interior del canal del estriado del pezón y/o en el interior de la cisterna del pezón.

El término "antimicrobiano" se refiere en la presente memoria a una sustancia que aniquila o inhibe el crecimiento o la reproducción de microorganismos tal como bacterias, virus, hongos, levaduras o protozoos.

El término "solución" se refiere en la presente memoria a soluciones, suspensiones o dispersiones, a menos que se indique lo contrario. El término "aerosol", tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una composición atomizada, tal como la compuesta por gotas líquidas pequeñas o grandes, como la que se aplica a través de un

aplicador de aerosol o un aplicador de aerosol de bomba con el fin de proporcionar una amplia aplicación de la composición.

El término "flujo" se refiere en la presente memoria a una aplicación continua, directa y focalizada de la composición. El término "infusión" se refiere en la presente memoria a la introducción continua de un fluido o solución en una cavidad, vena o cisterna.

El término "mamífero" se refiere en la presente memoria a un animal vertebrado de sangre caliente de la clase Mammalia, que incluye tanto al ser humano como a los animales, que posee pelo o piel en la piel, la secreción de leche de las glándulas mamarias productoras de leche por parte de las hembras para alimentar a las crías, y un corazón de cuatro cámaras.

Para las realizaciones de la divulgación que se relacionan con la mastitis, el término "animal" se refiere en la presente memoria a un mamífero hembra no humano que tiene un período de lactancia, que incluye, pero sin limitación, animales de ganado, como vacas, ovejas, cabras, caballos, cerdos, búfalos de agua y similares. Preferentemente, el animal es una vaca lechera. Aunque tanto la "vaca" como la "novilla" son bovinos hembras, el término "novilla" se refiere en la presente memoria a cualquier vaca hembra joven que no haya parido un ternero, normalmente destetada y menor de 3 años. El término "vaca" suele referirse a un animal hembra de edad avanzada que ha parido un ternero.

El término "período seco" se refiere en la presente memoria a la fase no lactante del ciclo de lactancia de una vaca u otro animal de ganado lácteo. Éste se produce entre el final de un ciclo de lactancia y el comienzo de la siguiente. Al final de cada ciclo de lactancia, el animal comienza la fase de "secado" al entrar en el período seco, que incluye los cambios fisiológicos, metabólicos y endocrinos habituales asociados al cese de la producción de leche durante el período no lactante (período seco) del animal.

El término "producto lácteo" se refiere en la presente memoria a un producto que contiene cualquier cantidad de leche en forma líquida o en polvo. También incluye queso y yogur.

El término "posparto" se refiere en la presente memoria al período de tiempo que comienza inmediatamente después del parto y se extiende por unas seis semanas. El término "preparto" se refiere en la presente memoria al período de tiempo durante la preñez, que es anterior al parto. El término "periparto" se refiere en la presente memoria al período inmediatamente anterior y posterior al parto.

El término "involución" se refiere en la presente memoria a las primeras dos o tres semanas después del cese de la producción de leche en una vaca.

El término "tapón de queratina" se refiere en la presente memoria a la oclusión a base de queratina del canal del pezón/canal del pezón de una vaca tras el cese de la producción de leche para el período seco.

El término "invasión microbiana" se refiere en la presente memoria al movimiento de microorganismos patógenos tal como, por ejemplo, bacterias, especialmente bacterias formadoras de pus o necrotizantes, virus, hongos, levaduras, protozoos y similares que proliferan en el tejido corporal o en las cavidades corporales, dando lugar a una lesión tisular que puede progresar a una infección y/o enfermedad. Para los fines de la divulgación, la "invasión microbiana" se refiere en la presente memoria típicamente a una "invasión bacteriana".

El término "compuesto polimérico sol-gel" se refiere en la presente memoria a una composición polimérica que puede someterse a un procedimiento sol-gel para formar un estado sol-gel bajo ciertas condiciones, como se describe en la presente memoria. Los términos "sólido" y "gel", y "solidificación" y "gelificación" se utilizan indistintamente en la presente memoria para hacer referencia al gel/sólido formado después de que se haya producido la transición de fase sol-gel en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos.

El término "polímero" se refiere en la presente memoria a un material que incluye un conjunto de macromoléculas. Las macromoléculas incluidas en un polímero pueden ser iguales o diferir entre sí de alguna manera. Una macromolécula puede tener cualquiera de una variedad de estructuras esqueléticas, y puede incluir uno o más tipos de unidades monoméricas. En particular, una macromolécula puede tener una estructura esquelética lineal o no lineal. Algunos ejemplos de estructuras esqueléticas no lineales son las estructuras esqueléticas ramificadas, como las ramificadas en estrella, las ramificadas en peine o las ramificadas en dendrita, y las estructuras esqueléticas en red. Una macromolécula incluida en un homopolímero típicamente incluye un tipo de unidad monomérica, mientras que una macromolécula incluida en un copolímero típicamente incluye dos o más tipos de unidades monoméricas. Los ejemplos de copolímeros incluyen los copolímeros estadísticos, los copolímeros aleatorios, los copolímeros alternos, los copolímeros periódicos, los copolímeros en bloque, los copolímeros radiales y los copolímeros de injerto.

Tal como se utiliza en la presente memoria con referencia a un polímero, el término "peso molecular (MW)" se refiere a un peso molecular promedio en número, un peso molecular promedio en peso o un índice de fusión del polímero.

El término "módulo elástico" (también denominado "módulo de Young" o módulo de almacenamiento (G')) se define en la presente memoria como el cambio de tensión con una deformación aplicada (es decir, la relación entre la tensión de cizallamiento (fuerza por unidad de superficie) y la deformación de cizallamiento (deformación proporcional)) en un

material. Esencialmente, el módulo elástico es una medida cuantitativa de la rigidez de un material elástico que mide la capacidad del material probado para volver a su forma y tamaño originales. G' puede calcularse mediante una fórmula derivada de la ley de Hooke, que establece que el módulo elástico es igual a la relación entre la tensión y la deformación (es decir, la relación entre la presión aplicada y el cambio fraccional de tamaño). La medida del módulo elástico se informa como la fuerza por unidad de superficie (la relación métrica estándar del Newton a la unidad de superficie (N/m^2) o el pascal (Pa) en el que un pascal equivale a un Newton (1 N) de fuerza aplicada sobre un área de un metro cuadrado (1m^2)). Esta unidad pascal es un término reconocido por la técnica que se utiliza a menudo para definir una unidad de presión, resistencia a la tracción, tensión y elasticidad.

El término "adelgazamiento por cizallamiento", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la característica común de los fluidos no newtonianos en los que la viscosidad del fluido disminuye con el aumento de la tasa de cizallamiento o la tensión. El adelgazamiento por cizallamiento se observa en suspensiones, emulsiones, soluciones poliméricas y geles. Debido a los atributos de adelgazamiento por cizallamiento, la disminución de la viscosidad de un polímero, una macromolécula o un gel es posible al aumentar la velocidad de cizallamiento. Básicamente, como resultado de la disminución de la viscosidad al aumentar la velocidad de cizallamiento, la propiedad de "adelgazamiento por cizallamiento" es una medida de la capacidad de la red de hidrogeles para deformarse temporalmente mediante la aplicación de una suave presión manual del pistón de una jeringa. Este fenómeno de adelgazamiento por cizallamiento puede utilizarse, por ejemplo, para hacer infusible un hidrogel biocompatible que de otro modo sería rígido.

El término "tangente de pérdida $\tan \delta$ " o " $\tan \delta$ " se refiere en la presente memoria a la tangente del ángulo de fase, es decir, la relación entre el módulo viscoso (G'') y el módulo elástico (G') y un cuantificador útil de la presencia y el grado de elasticidad en un fluido. Los valores $\tan \delta$ inferiores a la unidad indican un comportamiento elástico dominante (es decir, de tipo sólido) y los valores superiores a la unidad indican un comportamiento viscoso dominante (es decir, de tipo líquido). En un sólido elástico, $\tan \delta = 0$.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, se entiende por "fuerte" el módulo elástico G' que generalmente puede oscilar ampliamente entre aproximadamente 420 Pa o más, entre aproximadamente 600 Pa y aproximadamente 10.000 Pa, o entre aproximadamente 6000 Pa y aproximadamente 10.000 Pa, etc. a temperatura fisiológica. En función del nivel de rigidez, un cuerpo sólido, por ejemplo, se deforma cuando se le aplica una carga. Si el material es elástico, el cuerpo vuelve a su forma original después de retirar la carga. Un "sólido fuerte" es generalmente un gel o un sólido formado después de la transición de fase sol-gel para el que G' en condiciones fisiológicas (por ejemplo, 37°C , y/o cerca del pH fisiológico) es típicamente superior a aproximadamente 560 Pa, aunque los sólidos fuertes pueden formarse por debajo de aproximadamente 560 Pa o por encima de aproximadamente 10.000 Pa dependiendo de otros factores en las etapas de procesamiento para hacer, esterilizar o almacenar la formulación.

El término "temperatura fisiológica" utilizado en la presente memoria se refiere al intervalo de temperaturas corporales normales de un mamífero, por ejemplo, de aproximadamente 35°C a aproximadamente 40°C , de aproximadamente 36°C a aproximadamente 40°C , de aproximadamente 37°C , de aproximadamente $37,5^\circ\text{C}$ y similares.

El término "uno o más estímulos fisiológicos" se refiere en la presente memoria a una selección de uno o más estímulos que abarcan, pero sin limitación, la temperatura (por ejemplo, la temperatura corporal, como una temperatura de aproximadamente 36°C a aproximadamente 40°C , o aproximadamente 37°C), el pH (por ejemplo, cerca del pH fisiológico, condiciones alcalinas o ácidas), la fuerza iónica (por ejemplo, condiciones hipotónicas o hipertónicas) y similares. Otros tipos de estímulos fisiológicos incluyen la exposición a un fluido corporal como, por ejemplo, la leche materna u otras secreciones, la sangre y similares. Otro tipo de estímulo puede provenir del contacto con una sustancia química o macromolécula corporal como, por ejemplo, iones, electrolitos, calcio, sodio, citotoxinas, macrófagos, enzimas, antígenos, glucosa, estrógenos, etc.

Componentes y características de la composición

En general, el compuesto polimérico sol-gel de la presente divulgación comprende quitosano, un polímero hidrófilo y un agente de gelificación en un medio ácido adecuado a base de agua. Opcionalmente, los compuestos poliméricos sol-gel incluyen además un agente de refuerzo como rellenos nanocristalinos adecuados y/o uno o más agentes antimicrobianos. El compuesto polimérico sol-gel forma un sello duradero o un sólido fuerte en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos, incl. Las formulaciones muestran una combinación única de capacidad de administración, hinchazón y adhesión.

Para los elementos del nuevo compuesto polimérico sol-gel, el quitosano está acilado en algunos casos, por ejemplo, el quitosano comprende el quitosano acil que incluye, pero sin limitación, el carboximetil quitosano (CMCh). En algunas realizaciones, el quitosano tiene un grado de desacetilación (% DDA) de al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 77%, al menos aproximadamente 80% o al menos aproximadamente 90%. En algunas realizaciones, el quitosano tiene un DDA% de aproximadamente 75%, de aproximadamente 77%, de aproximadamente 80%, de aproximadamente 95%, de aproximadamente 96%, de aproximadamente 97%, de aproximadamente 98%, de aproximadamente 99%, o superior. El polímero hidrófilo del compuesto polimérico sol-gel de la presente invención comprende metilcelulosa (MC), como éteres de metilcelulosa o éteres de celulosa. Otros polímeros hidrófilos incluyen el acetato de polivinilo (PVA), el acilato de PVA, la hidroxipropilcelulosa (HPC), la

etilhidroxietilcelulosa (EHEC), el ácido hialurónico (HA), un poloxámero (un copolímero tribloque no iónico) como Pluronic®, el polietilenglicol (PEG), el alginato de sodio u otro polisacárido soluble en agua capaz de formar un gel termosensible de alta viscosidad. El polímero hidrófilo puede estar acilado. De forma deseable, el compuesto polimérico sol-gel comprende metilcelulosa que forma una mezcla fina (suspensión espesa) tras la disolución en agua fría y un gel espeso a temperaturas fisiológicas.

El agente de gelificación es un elemento termogelificante que sufre una reticulación física en respuesta a la temperatura. En la presente invención el elemento termogelificante comprende una sal seleccionada del grupo que consiste en pirofosfato de sodio tetrabásico, fosfato de potasio dibásico trihidrato, y sus mezclas. Otras sales incluyen β -glicerofosfato disódico hidratado o pentahidratado. Ventajosamente, el agente de gelificación es una mezcla de sales de pirofosfato sódico tetrabásico y de fosfato potásico dibásico trihidrato. Los términos "agente de gelificación" y "gelificador" se utilizan indistintamente en la presente memoria.

Es preferente preparar los compuestos poliméricos sol-gel en un medio acuoso débilmente ácido como, por ejemplo, ácido acético acuoso 0,1 M.

La formulación de los compuestos poliméricos sol-gel puede incluir opcionalmente un agente de refuerzo, tal como un relleno nanocristalino. El material de refuerzo denominado "relleno nanocristalino" es generalmente un material nanocristalino, por ejemplo, una partícula o polímero nanocristalino, capaz de proporcionar refuerzo mecánico al compuesto polimérico sol-gel a través de interacciones físicas no covalentes tal como, sin limitación, enlaces de hidrógeno o atracciones electrostáticas. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, celulosa nanocristalina (NCC), una arcilla inorgánica, una arcilla orgánica, negro de carbón, sílice pirógena, grafeno, grafito y similares. Preferentemente, el relleno nanocristalino es celulosa nanocristalina (NCC). Alternativamente, el relleno nanocristalino comprende, por ejemplo, un almidón nanocristalino, una nanoarcilla, grafeno, un nanotubo de carbono, una nanoarcilla orgánica o una organoarcilla. Por ejemplo, el relleno nanocristalino puede ser montmorillonita, bentonita, caolinita, hectorita, halloysita, etc.

En algunas realizaciones, los compuestos poliméricos sol-gel comprenden un agente de refuerzo como un relleno inorgánico, *por ejemplo*, dióxido de silicio (SiO₂).

En algunas realizaciones, los compuestos poliméricos sol-gel comprenden además fosfato de calcio como agente de refuerzo. En otras realizaciones, los compuestos poliméricos sol-gel forman un hidrogel de doble red para reforzar una fase sólida fuerte. Los geles de doble red se caracterizan por una estructura de red especial formada por dos tipos de componentes poliméricos y tienen tanto un alto contenido de agua (aproximadamente 90% en peso) como una gran resistencia mecánica y tenacidad.

La composición también puede incluir opcionalmente uno o más agentes farmacéuticos, particularmente agentes antimicrobianos con actividad antibacteriana, antiviral, antimicótica o antiparasitaria y similares. El agente o agentes farmacéuticos quedarán atrapados en la composición al formarse y se liberarán de la misma inmediatamente o durante un período de tiempo.

Dado que el patógeno típico de la mastitis es una bacteria, es deseable que los compuestos poliméricos sol-gel contengan el agente antibacteriano. Existe una variedad de agentes antibacterianos disponibles para uso en animales. Estos agentes antibacterianos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: macrólidos, por ejemplo, tulatromicina (Draxxin®), tildipirosina (Zuprevo®), tilmicosina (Micotil®), fosfato de tilosina (Tylan®) y gamitromicina (Zactran®); cefalosporinas, por ejemplo, ceftiofur sódico (por ejemplo, Naxcel® y Excenel®), clorhidrato de ceftiofur (por ej., Excenel RTU®, Excenel RTU EZ®, Spectramast®), ceftiofur ácido libre cristalino (Excede®), cefovecina sódica (Convenia®) y cefpodoxima proxetil (Simplicef®); antibióticos lincosamínicos, por ejemplo, lincomicina (Lincomix®), clorhidrato de pirlmicina (Pirsue®) y clorhidrato de clindamicina (Antirobe®); fluoroquinolonas, por ejemplo, danofloxacin (Advocin®), enrofloxacin (Baytril®) y marbofloxacin (Zeniquin®); y tetraciclinas, por ejemplo, clortetraciclina, oxitetraciclina y doxiciclina. Otros agentes antibacterianos incluyen, pero sin limitación, amoxicilina trihidratada y el ácido clavulónico (Clavamox®), espectinomina (Adspec®), sulfonamidas potenciadas, tal como trimetoprima/sulfadiazina (Tucoprim®) y sulfadimetoxina/orimetoprima (Primor®), y florfenicol (por ejemplo, Nuflor® y Nuflor® Gold). Un agente antimicrobiano puede administrarse simultánea o secuencialmente con las composiciones de la presente divulgación.

Los compuestos poliméricos sol-gel de la divulgación pueden formar sellos duraderos o sólidos fuertes en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 37°C. Idealmente, un polímero sol-gel sólido "fuerte" significa que el módulo elástico G' (también denominado módulo de almacenamiento (G')) es al menos de aproximadamente 420 Pa o superior a temperatura fisiológica. El "sólido fuerte" es generalmente un gel o un sólido formado tras la transición de fase sol-gel para el que G' en condiciones fisiológicas (por ejemplo 37°C, y/o cerca del pH fisiológico) es generalmente superior a aproximadamente 560 Pa, a menudo aproximadamente 600 Pa o más, pero también abarca de aproximadamente 450 Pa a aproximadamente 10.000 Pa e incluye, pero sin limitación, valores de aproximadamente 490 Pa, aproximadamente 560 Pa, aproximadamente 650 Pa, aproximadamente 800 Pa, aproximadamente 1700 Pa, aproximadamente 1900 Pa, aproximadamente 2500 Pa, aproximadamente 5500 Pa, aproximadamente 6000 Pa, aproximadamente 6500 Pa, aproximadamente 7000 Pa, aproximadamente 7500 Pa, aproximadamente 8000 Pa, aproximadamente 8500 Pa, aproximadamente 9800,

aproximadamente 9000 Pa, aproximadamente 9500 Pa, aproximadamente 10.000 Pa o más, y similares. En algunas realizaciones, G' es de aproximadamente 450 Pa a aproximadamente 600 Pa, de aproximadamente 500 Pa a aproximadamente 1000 Pa, de aproximadamente 1000 Pa a aproximadamente 6000 Pa, de aproximadamente 5000 Pa a aproximadamente 9800 Pa, de aproximadamente 7000 Pa a aproximadamente 10.000 Pa, de aproximadamente 8500 Pa a aproximadamente 10.000 Pa, etc. El compuesto de polímero sólido sol-gel "fuerte" de la divulgación es generalmente más fuerte que los hidrogeles de quitosano conocidos, que se sabe que son débiles (en otras palabras, un compuesto de polímero sólido sol-gel fuerte tiene propiedades mecánicas más fuertes o más altas que los hidrogeles de quitosano conocidos). En otras realizaciones, el G' del compuesto polimérico sol-gel útil como sellador de pezones puede ser de aproximadamente 420 Pa a 9.800 Pa o superior, en el que se ha descubierto inesperadamente que el compuesto polimérico es infusible sin fugas y forma un sello duradero en reacción a estímulos fisiológicos similares a los compuestos poliméricos más fuertes descritos en la presente memoria.

Los compuestos poliméricos sol-gel poseen propiedades de espesamiento térmico que los hacen capaces de gelificar o solidificar rápidamente en respuesta a las temperaturas fisiológicas, para formar un sello duradero o un sólido fuerte sin la adición de ningún otro agente. Además, los compuestos poliméricos sol-gel se gelifican o solidifican muy rápidamente en respuesta a dicho estímulo fisiológico y forman el sello o la masa sólida que tiene propiedades mecánicas o viscoelásticas como se discute en la presente memoria, en el que el sólido posee suficiente fuerza para permitirle de manera única soportar presiones mecánicas o hidráulicas bajo condiciones fisiológicas en el animal. En algunos casos, los compuestos poliméricos sol-gel pueden gelificarse o solidificarse en segundos, es decir, instantáneamente o casi instantáneamente, tras la exposición al estímulo fisiológico, por ejemplo, tras la infusión en un animal de ganado lácteo. Los compuestos poliméricos sol-gel en la presente memoria proporcionados experimentan una transición de fase líquido-sólido tan rápida en respuesta a las temperaturas fisiológicas que se forma rápidamente un tapón en el lugar de la inyección. Los compuestos poliméricos sol-gel muestran propiedades favorables de adelgazamiento por cizallamiento, es decir, su viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de cizallamiento, lo que permite que los compuestos poliméricos sol-gel puedan infundirse fácilmente o, antes de la infusión, deformarse en una jeringa a temperatura ambiente, incluso si ya se ha producido la solidificación. Debido a las propiedades beneficiosas de adelgazamiento por cizallamiento, los compuestos poliméricos sol-gel pueden abarcar estructuras sólidas que tienen una alta porosidad y/o elasticidad para una mejor manipulación del material para sellar la zona del pezón y a la vez permitir la liberación de agentes farmacéuticos necesarios para el tratamiento de la mastitis.

En contraste con las desventajas del uso de geles débiles conocidos en el arte que tienden a extenderse y a gotear en ambientes fisiológicos dinámicos, es un beneficio adicional del presente compuesto polimérico sol-gel en su capacidad de solidificarse rápidamente de tal manera que el compuesto puede proporcionar un sello instantáneo y resistente o un sólido fuerte que permite una fácil infusión a través de una jeringa sin fugas o goteo y una rápida formación de un tapón sol-gel sin fugas ni goteo después de la infusión en el canal del pezón o el seno del pezón de un animal de ganado lácteo. En algunos casos, los compuestos poliméricos sol-gel son capaces de ser administrados con una jeringa de un solo barril.

Debido a las propiedades de las formulaciones poliméricas sol-gel para responder a los cambios de temperatura, pH y fuerza iónica, pueden formar sellos duraderos o geles/sólidos fuertes cuando no se aplica ninguna fuerza, pero pueden fluir y son administrables por jeringa al aplicar una fuerza externa, por ejemplo, en una jeringa. Los compuestos también pueden formar un gel duradero y elástico, una espuma o un sólido poroso tras la infusión.

Otros efectos técnicos valiosos que se observan en los compuestos poliméricos sol-gel especialmente diseñados son la capacidad de formar sustituciones hidrófobas en los polímeros para aumentar la viscosidad, esferas de microgel capaces de reticularse en fluidos fisiológicos y esferas de microgel capaces de ser utilizadas para la liberación de fármacos, así como para controlar la tasa de degradación en un animal y para formar un sólido poroso con un tamaño de poro particular en un individuo y propiedades viscoelásticas deseables a temperatura fisiológica.

De manera beneficiosa, las formulaciones de polímeros sol-gel a base de agua son capaces de ser infundidas directamente en el canal del pezón del animal productor de leche y forman un sellador firme durante el período seco. Las formulaciones pueden crear este sello impermeable a 37°C en presencia de leche y bajo el alto contenido iónico que se suele observar al secarse la glándula mamaria.

Procedimiento de fabricación de compuestos poliméricos Sol-Gel

Los procedimientos sol-gel son técnicas de química húmeda ampliamente utilizadas en el campo de la ciencia e ingeniería de materiales. Estos procedimientos se utilizan principalmente para la fabricación de materiales a partir de una solución coloidal (sol) que actúa como precursor de una red integrada (o gel) de partículas discretas o polímeros de red. En un procedimiento sol-gel, una suspensión fluida de un sólido coloidal (sol) evoluciona gradualmente hacia la formación de un sistema difásico similar a un gel que contiene tanto una fase líquida como una fase sólida cuyas morfologías oscilan de partículas discretas hasta redes poliméricas continuas (para información general, véase C.J. Brinker and G.W. Scherer, 1990, Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing, Academic Press, ISBN 0121349705 L.L. Hench and J.K. West, 1990, The Sol-Gel Process, Chemical Reviews 90:33).

En algunos casos, una reactividad y una funcionalidad de un polímero pueden alterarse mediante la adición de un conjunto de grupos funcionales que incluyen, pero sin limitación, un anhídrido ácido, un amino o una sal, un amino N-sustituido, una amida, un carbonilo, un carboxi o una sal, un ciclohexil epoxi un epoxi, un glicidilo, un hidroxilo, un isocianato, una urea, un aldehído, un éster, un éter, un alquilo, un alqueno, un alquino, un tiol, un disulfuro, un sililo o un silano, o grupos seleccionados entre glioxales, aziridinas, compuestos de metileno activo u otros compuestos β -dicarbonílicos (p.g., 2,4-pentandiona, ácido malónico, acetilacetona, acetato de etilacetona, malonamida, acetoacetamida y sus análogos metílicos, acetoacetato de etilo y acetoacetato de isopropilo), un halo, un hidruro u otros grupos polares o de enlace H y sus combinaciones. Dichos grupos funcionales pueden añadirse en varios lugares a lo largo del polímero, tal como, por ejemplo, dispersos de forma aleatoria o regular a lo largo del polímero, en los extremos del polímero, en el lado, en el extremo o en cualquier posición de las cadenas laterales cristalizables, unidos como grupos laterales colgantes separados del polímero, o unidos directamente a una columna vertebral del polímero. Además, un polímero puede ser capaz de reticulación, entrelazamiento o formación de enlaces de hidrógeno para aumentar su fuerza mecánica o su resistencia a la degradación en condiciones ambientales o de procesamiento.

Como puede apreciarse, un polímero puede proporcionarse en una variedad de formas que tienen diferentes pesos moleculares, ya que un peso molecular (MW) del polímero puede depender de las condiciones de procesamiento utilizadas para formar el polímero. Por consiguiente, en la presente memoria se puede hacer referencia a un polímero como si tuviera un peso molecular específico o un intervalo de pesos moleculares.

Los compuestos poliméricos sol-gel se basan en sistemas de gelificación rápidos, inducidos por la sal y termorreversibles, basados en el quitosano, que se forman mezclando el quitosano con polímeros hidrófilos (por ejemplo, polisacáridos solubles en agua) que crean geles termosensibles altamente viscosos. Estas formulaciones compuestas de polímero que se pueden sumergir en el agua sufren una rápida gelificación al aumentar la temperatura, el pH y la fuerza iónica. Los compuestos suelen contener dos polímeros hidrófilos y gelificadores iónicos. El primer polímero sufre una gelificación inducida por la temperatura y permite la formación de un gel elástico en el canal del pezón a temperaturas fisiológicas, por ejemplo, a aproximadamente 37°C. El segundo polímero forma un gel al entrar en contacto con gelificadores iónicos (agentes de gelificación) introducidos en la formulación. Con la adición del agente de gelificación (es decir, un elemento termogelificante), el sistema crea una reticulación física. La gelificación se debe básicamente a cambios físicos de conformación en los polímeros que son los principales ingredientes del producto, sin que se formen enlaces covalentes de reticulación entre los polímeros. La fuerza del gel del segundo polímero depende de la cantidad de gelificador que se añada, así como del pH y la fuerza iónica de la formulación, que suele tener un pH de aproximadamente 5,1 a 6,8 y una fuerza iónica de aproximadamente 5 g/L. Los dos polímeros hidrófilos tienen un profundo efecto en la gelificación del quitosano, lo que provoca una rápida respuesta a estímulos como la adición de sal y la temperatura corporal. Como resultado, los geles se refuerzan al cambiar el pH y el contenido iónico en el canal del pezón de secado.

Al ajustar cuidadosamente las concentraciones del polímero, la sal y el agente de gelificación en el sistema, es posible ajustar con precisión la temperatura de gelificación y las propiedades mecánicas o la integridad del sistema, tanto por debajo como por encima del umbral de gelificación, incluyendo la velocidad y la reversibilidad de la formación del gel en condiciones fisiológicas (por ejemplo, la temperatura), así como la biocompatibilidad, las propiedades viscoelásticas (por ejemplo, G'), la permeabilidad/porosidad del sistema y la durabilidad del sello o sólido fuerte que se forma después de la gelificación. Por ejemplo, el polímero, la adición de sal y el agente de gelificación pueden manipularse para que los compuestos poliméricos sol-gel sean adecuados para usos humanos o veterinarios especialmente diseñados que requieran un sólido macroporoso con un tamaño de poro específico y que tenga propiedades duraderas y elásticas, o en aplicaciones que requieran estructuras sólidas con una alta porosidad o con un tamaño de poro particular para permitir el libre paso de biomoléculas como los antibióticos.

Además, las formulaciones de polímeros sol-gel pueden diseñarse preferentemente para su compatibilidad y uso con cultivos iniciadores de queso, por ejemplo, *Lactococcus lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus* y similares. Dado que el cultivo iniciador vivo necesita lograr una acidificación adecuada para que el procedimiento de elaboración del queso funcione, la acidez de las formulaciones poliméricas puede ajustarse convenientemente alterando el componente de sal para evitar que interfiera en la actividad y el crecimiento del cultivo. Por lo tanto, para que las formulaciones de polímeros sol-gel sean beneficiosamente compatibles con los cultivos iniciadores del queso, el componente de sal se varía fácilmente para neutralizar la acidez del producto final. Normalmente, por ejemplo, la formulación con un pH de aproximadamente 6,8 (relativamente neutro), no inhibe los cultivos bacterianos estándar y podría utilizarse con cultivos iniciadores de queso.

Para ilustrar las formulaciones de la presente invención, el compuesto polimérico sol-gel comprende de aproximadamente 7,3% en peso de metilcelulosa, de aproximadamente 1,8% en peso de quitosano, de aproximadamente 9,4% en peso de pirofosfato sódico tetrabásico (como sal en solución), de aproximadamente 0,05% en peso de pirofosfato sódico tetrabásico (como sal sólida), y de aproximadamente 82% en peso de ácido acético acuoso 0,1 M. Este compuesto se denomina en la presente memoria formulación "F1" o "F1-20141210". Por propósitos de comparación, se prepararon otros compuestos poliméricos sol-gel de la presente invención, como las formulaciones F2 o F3 que se muestran en las Tablas B y C a continuación.

Como regla general, las cantidades de los ingredientes en las formulaciones de compuestos poliméricos sol-gel de la presente divulgación pueden variar un poco. Por ejemplo, la cantidad de metilcelulosa puede oscilar entre

aproximadamente el 4% en peso y aproximadamente el 12% en peso, el quitosano puede oscilar entre aproximadamente el 0,5% en peso y aproximadamente el 4% en peso, la sal en solución o el agente gelificante puede oscilar entre aproximadamente el 6% en peso y aproximadamente el 12% en peso, la sal sólida puede oscilar entre aproximadamente el 0,01% en peso y aproximadamente el 4% en peso, y pueden utilizarse concentraciones superiores a 0,1M del ácido acético acuoso. No obstante, debe apreciarse que los intervalos de ciertas combinaciones pueden ajustarse fácilmente, incluyendo cantidades mayores o menores que los intervalos indicados, con el fin de formar un gel o un hidrogel que tenga las propiedades deseadas descritas en la presente memoria.

Usos de los compuestos poliméricos Sol-Gel

Los compuestos poliméricos sol-gel proporcionados en la presente memoria experimentan una transición de fase líquido-sólido en respuesta a uno o más estímulos fisiológicos. Por lo tanto, pueden tener uso en una amplia gama de aplicaciones de salud animal y humana donde es deseable inyectar un líquido que se solidifica rápidamente después de la inyección en un individuo. En particular, los compuestos poliméricos sol-gel pueden tener uso en aplicaciones en las que es deseable disponer de estructuras sólidas que tengan alta porosidad, elasticidad o suficiente resistencia para soportar presiones mecánicas o hidráulicas en condiciones fisiológicas en un individuo.

Debe comprenderse que la idoneidad de los compuestos poliméricos sol-gel para una aplicación concreta vendrá dictada por numerosos factores, como su biocompatibilidad, integridad mecánica, velocidad y reversibilidad de la formación de gel en condiciones fisiológicas (por ejemplo, temperatura), propiedades mecánicas o viscoelásticas (por ejemplo, G'), porosidad/permeabilidad y durabilidad. De acuerdo con la presente tecnología, dichas propiedades pueden determinarse ajustando las concentraciones de polímero y de agente de gelificación en el sistema, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, en algunas realizaciones los compuestos poliméricos sol-gel son adecuados para uso en aplicaciones que requieren un sólido macroporoso con un tamaño de poro específico y que tenga propiedades duraderas y elásticas, o en aplicaciones que requieren estructuras que sean sólidas con una alta porosidad o un tamaño de poro particular para permitir el paso libre de biomoléculas como la glucosa, el oxígeno o la insulina.

Compuestos poliméricos de sol-gel como selladores de pezones para animales

Debe comprenderse que las características deseadas del sellador de pezones que engloba los compuestos poliméricos sol-gel de la presente divulgación variarán dependiendo del uso previsto del sellador, como el lugar al que se aplicará (por ejemplo, el tejido mamario exterior o dentro de la cavidad del pezón), la formulación del sellador y otros factores. Sin embargo, se pueden indicar algunas características generales del sellador de pezones. Cuando el sellador se coloca de manera intramamaria en el canal del pezón, por ejemplo, la característica de adelgazamiento por cizallamiento a medida permite una fácil infusión, así como la eliminación por extracción manual del canal del pezón. Es ventajoso que el sellador de pezones adherido sea fácilmente extraíble del pezón. Al ajustar la formulación del sellador de el pezón, los compuestos poliméricos sol-gel pueden hacerse lo suficientemente fuertes como para que el sellador pueda despegarse fácilmente de el pezón y retirarse en una unidad cohesiva en la primera banda dejando poco o ningún material detrás. Cuando los compuestos poliméricos sol-gel se utilizan como tapones a nivel macro o micro, pueden formularse para abarcar un intervalo apropiado de adhesión que permita que las composiciones formadas *in situ* se adhieran al tejido y permanezcan en su lugar todo el tiempo que sea necesario, a la vez que puedan retirarse fácilmente de forma manual del lugar. Además, si estas composiciones se tapan en un lugar en el que es necesaria una barrera para retener o absorber fluidos, la composición puede formularse para absorber el fluido de forma natural mientras permanece en su ubicación deseada.

Además, es ventajoso que el sellador de pezones formado *in situ* de la presente divulgación se adapte a la forma del pezón o del canal del pezón. La propiedad de flexibilidad del compuesto de polímero sol-gel permite que el sellador se adapte a la topografía de la superficie del pezón o del canal, así como a la superficie del tejido que rodea el pezón para lograr un buen ajuste. Esta conformabilidad también prolonga la longevidad, la comodidad y la eficacia del sellador de pezones.

El compuesto polimérico sol-gel útil como sellador de pezones en la divulgación también es seguro y estable. La propiedad no tóxica del sellador proporciona seguridad al animal objetivo, así como al manipulador humano del animal y al aplicador del sellador en el animal. Dado que el sellador de pezones no causa ninguna acumulación residual de sellador en las líneas de leche o en el equipo de la sala de ordeño, la no toxicidad del sellador también garantiza que los productos alimenticios humanos, como la leche y los productos lácteos elaborados con la leche obtenida de los animales tratados, sean seguros de consumir. Todos los ingredientes de la composición son de naturaleza no metálica, biocompatibles, biodegradables, adherentes a los tejidos y no irritantes para el animal en las cantidades presentes en las formulaciones finales del sellador de pezones. Dado que los compuestos poliméricos sol-gel son adecuados para su infusión en la glándula mamaria del animal, están libres de materiales tóxicos, irritantes, *etc.*, y son adecuados para su uso en condiciones fisiológicas de temperatura, pH, fuerza iónica, *etc.* Además, los compuestos poliméricos sol-gel pueden esterilizarse fácilmente mediante vapor estándar, esterilizadores en seco (autoclaves), irradiación gamma, procedimientos de haz de electrones (esterilización por haz electrónico) y similares. También se pueden incluir conservantes en la composición sin alterar las propiedades beneficiosas del sellador de pezones.

Dependiendo del procedimiento de administración, la viscosidad está especialmente diseñada en la formulación del sellador de pezones para que sea adecuado para la aplicación tópica, la infusión y similares. De este modo, la viscosidad de los compuestos poliméricos sol-gel se controla para que la composición pueda ser rociada o vertida sobre o dentro del pezón de manera que se cree una excelente barrera. Los compuestos poliméricos sol-gel también pasan fácilmente a través de una jeringa y tienen excelentes propiedades de cizallamiento que son necesarias para moldear el compuesto en una jeringa a temperatura ambiente para un uso rápido y fácil del producto por parte del manipulador de animales. En particular, el compuesto polimérico sol-gel es capaz de ser infundido utilizando una jeringa de un solo barril. Cuando se infunden directamente en el pezón, las fórmulas tienen la capacidad de llenar el canal del pezón y pasar rápidamente a ser un gel a temperatura corporal. La propiedad de adelgazamiento por cizallamiento de las formulaciones permite tanto la facilidad de infusión como la capacidad de retiro.

La gelificación de la composición en el pezón es preferentemente rápida, para evitar el escurrimiento o la pérdida de la composición del lugar de aplicación. El tiempo de gelificación puede ser de aproximadamente 5 minutos o menos, preferentemente menos de aproximadamente tres minutos, más preferentemente menos de aproximadamente 30 segundos y, en algunas situaciones, tan bajo como aproximadamente 10 segundos o menos, especialmente con la aplicación externa de los compuestos poliméricos sol-gel.

Varias de las características deseadas y mencionadas del sellador de pezones útil en la presente divulgación se obtienen ajustando las concentraciones del polímero y del agente de gelificación en el compuesto polimérico sol-gel para modificar las propiedades mecánicas y la permeabilidad/porosidad del sello duradero o sólido fuerte. Básicamente, la adhesión y las propiedades de hinchamiento del sellador de pezones se controlan diseñando especialmente la formulación. Los compuestos poliméricos sol-gel, que poseen una combinación específica de propiedades de adhesión e hinchamiento, presentan propiedades incomparables y novedosas, como la de adherirse al tejido del animal durante un período de tiempo prolongado y, sin embargo, poder retirarse fácilmente como barrera para los pezones al finalizar el tratamiento profiláctico, o ser lo suficientemente fuerte como para desprenderse del pezón del animal en una sola pieza o retirarse fácilmente como semisólido o líquido, pero ser lo suficientemente flexible como para ajustarse al cuerpo del animal para su comodidad y permanecer en su lugar como una barrera eficaz para prevenir o reducir la incidencia de trastornos mamarios.

Administración de las composiciones de sellado de pezones

La viscosidad adecuada depende del medio de suministro a ser empleado. En general, la composición debe tener una viscosidad inferior a aproximadamente 800 cps a temperatura ambiente o durante las condiciones de uso (es decir, no en el animal), preferentemente inferior a 300 cps, más preferentemente inferior a 200 cps para ser administrada en aerosol. El suministro a través de una bomba de pulverización requiere normalmente una viscosidad más baja, por ejemplo inferior a aproximadamente 150 cps. La pulverización sin aerosol requiere una viscosidad inferior a aproximadamente 50 cps (la conversión de cps a mPa-s es de 1 a 1).

La formulación del sellador del pezón se aplica al pezón por medios convencionales como, por ejemplo, una pulverización o chorro desde una jeringa, bomba, boquilla de pulverización, aerosol, inmersión u otro tipo de dispositivo. Una combinación de pulverización y chorro puede aplicarse en un procedimiento similar al de una regadera, en el que múltiples chorros proporcionan la amplia cobertura simulada de una aplicación de pulverización. Los compuestos de polímero sol-gel se pulverizan o se vierten externamente sobre el tejido del pezón, en el que forman un sello de barrera.

Para la aplicación por infusión en el interior del pezón, como en el seno del pezón o en la cisterna, se puede utilizar cualquier jeringa veterinaria que tenga un extremo cónico de jeringa, una aguja de pezón o una punta intramamaria hecha especialmente para la inserción de soluciones en el canal del pezón. Por ejemplo, los geles pueden introducirse a través de una cánula de infusión convencional o una boquilla de infusión utilizando una jeringa estándar de 5 o 6 ml. La cantidad efectiva de sellador de pezones que formará la barrera física deseada en un canal de pezones para prevenir o tratar un trastorno mamario depende de la especie de animal de ganado lácteo y del tamaño de sus pezones. Normalmente, un volumen de entre 2 y 3 ml es satisfactorio para llenar adecuadamente el canal del pezón, pero la cantidad puede variar y puede ser fácilmente titulada por el manipulador infundiendo el sellador en el pezón.

Generalmente, se administrarán aproximadamente 0,5 a 5,0 ml de la composición a un pezón del animal, preferentemente aproximadamente 1,0 a 4,0 ml, más preferentemente aproximadamente 2,0 ml o más, y aún más preferentemente aproximadamente 3,0 ml. Las formulaciones pueden ser precargadas en jeringas para facilitar la administración de dosis unitarias. De manera deseable, la composición se administra cuando el animal de ganado lácteo entra en el período seco al final del ciclo de lactancia o durante el período seco del animal, especialmente cuando se trata de una novilla o vaca.

La composición también puede administrarse de forma externa o tópica en el pezón desde un dispositivo de pulverización o de chorro. El dispositivo de pulverización puede incluir un recipiente con un dispensador para la administración de la composición líquida por pulverización. El tipo de recipiente utilizado es variable, dependiendo de la compatibilidad con la composición y el dispensador de aerosol y puede ser de vidrio, plástico o metal. Si las soluciones tienen una viscosidad lo suficientemente baja, puede conseguirse un suministro por pulverización con simples fuerzas mecánicas como las que se consiguen al presionar el émbolo de una jeringa con la mano a través de

una boquilla diseñada adecuadamente. Puede ser conveniente aplicar varias capas de la composición en el pezón para asegurar una cobertura adecuada del mismo. En cualquier caso, la cantidad efectiva para formar la barrera física puede determinarse fácilmente por el aspecto visual del sellador en el pezón.

La composición también puede administrarse mediante una jeringa equipada con un cabezal de pulverización. Generalmente, cualquier procedimiento químico, mecánico o electrónico para impulsar la composición líquida como una pulverización desde el recipiente es apropiado. En un aspecto, un propulsor de aerosol líquido o gaseoso compatible se coloca en un recipiente apropiado junto con la composición y el dispensador incluye un mecanismo de válvula que permite la administración de aerosol atomizado de la composición líquida. De manera deseable, se puede utilizar un dispositivo de infusión intramamaria para suministrar la composición selladora de pezones directamente al pezón. El dispositivo puede tener un único dispensador, como una punta de pulverización de Nordson Corporation (Westlake, Ohio, EE. UU.). El dispositivo puede incluir un medidor de modo de poder controlar la cantidad de composición.

Los ejemplos de dispositivos que pueden utilizarse, o modificarse para su uso, para administrar las composiciones como selladores de pezones incluyen los descritos en el documento WO 2015/038281 (Zoetis), la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 2015/0080841 (C. M. Bradley et al.), la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.989.215 (Y. Delmotte et al.), la Patente de los Estados Unidos Núm. 8.353.877 (S. Hallahan et al.), WO 2003/022245 (Bimeda Research & Development Limited), y el documento WO 2013/021186 (Norbrook Laboratories Limited).

La descripción anterior muestra cómo preparar las nuevas formulaciones de polímeros compuestos sol-gel, así como sus propiedades únicas para su uso en la presente divulgación. Los siguientes ejemplos demuestran otros aspectos de la divulgación. Los productos químicos se adquirieron de Sigma-Aldrich en St. Louis, Missouri, a menos que se indique lo contrario. Debe apreciarse que la secuencia de etapas en la preparación de los compuestos poliméricos sol-gel no es crítica y puede variarse a partir de los ejemplos. Por ejemplo, se puede alterar el orden de introducción de los ingredientes en un tanque (como añadir primero la metilcelulosa en lugar de añadir primero el quitosano y similares) sin que ello vaya en detrimento del producto final. Se debe apreciar además que cuando se han dado las condiciones típicas de reacción (*por ejemplo*, la temperatura, los tiempos de reacción, etc.), también se pueden utilizar las condiciones tanto por encima como por debajo de los intervalos especificados, aunque generalmente de forma menos conveniente. Los ejemplos se llevan a cabo a temperatura ambiente (entre 23°C y 28°C aproximadamente) y a presión atmosférica. Todas las partes y porcentajes a los que se hace referencia en la presente memoria están en base al peso y todas las temperaturas se expresan en grados centígrados, a menos que se especifique lo contrario.

Se puede obtener una mayor comprensión de la divulgación a partir de los ejemplos no limitantes que siguen a continuación.

Ejemplo 1.

Preparación y propiedades de los compuestos poliméricos Sol-Gel

Se prepararon cuatro formulaciones de polímeros compuestos (F1, F2, F3 y F4) como se indica a continuación. Las Tablas A, B, C y D muestran las formulaciones F1, F2, F3 y F4 respectivamente. Las formulaciones se prepararon en lotes de aproximadamente 30 g, 110 g o 165 g, como se indica en las tablas.

Tabla A. Formulación F1

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitosano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	12	12,000	7,251%	38,70967742	Líquido claro viscoso, pH 6, viscosidad reducida tras autoclave
Quitosano	3,0	3,000	1,813%		
Pirofosfato de sodio tetrabásico (como solución de 5 g/L)	15,5	0,078	0,047%		
Ácido acético ac. 0,1 M	135,0				
Total	165,5	15,1	9,110%		

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitosano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	8	8,000	7,271%	40	Gel claro viscoso, pH 6
Quitosano	2,0	2,000	1,818%		
Pirofosfato de sodio tetrabásico (como solución de 5 g/L)	10,0	0,050	0,045%		
Ácido acético ac. 0,1 M	90,0				
Total	110,0	10,1	9,157%		

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitosano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	2,4	2,400	8,000%	40	Líquido claro viscoso, pH 6, viscosidad reducida tras autoclave
Quitosano	0,6	0,600	2,000%		
Pirofosfato de sodio tetrabásico (como solución de 5 g/L)	3,0	0,015	0,050%		
Ácido acético ac. 0,1 M	24,0				
Total	30,0	3,0	10,050%		

Tabla B. Formulación F2

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitosano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	2,4	2,400	8,000%	2	Pasta elástica blanca, pH 7, viscosidad reducida tras autoclave
Quitosano	0,6	0,600	2,000%		
Fosfato de potasio dibásico trihidratado (como solución de 100 g/L)	3,0	0,300	1,000%		
Ácido acético ac. 0,1 M	24,0				
Total	30,0	3,3	11,000%		

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitosano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	8	8,000	7,271%	2	Pasta elástica blanca, pH 7, viscosidad reducida tras autoclave
Quitosano	2,0	2,000	1,818%		
Fosfato de potasio dibásico trihidratado (como solución de 100 g/L)	10,0	1,000	0,909%		
Ácido acético ac. 0,1 M	90,0				
Total	110,0	11,0	10,020%		

Tabla C. Formulación F3

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitosano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	2,4	2,400	8,000%	3,8	Gel opaco, pH 7, viscosidad reducida tras autoclave
Quitosano	0,6	0,600	2,000%		
Pirofosfato de sodio tetrabásico/ fosfato de potasio dibásico trihidratado (como solución de 2,5 g/L y 50 g/L)	3,0	0,158	0,525%		
Ácido acético ac. 0,1 M	24,0				
Total	30,0	3,2	10,525%		

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitosano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	8	8,000	7,271%	2	Pasta elástica blanca, pH 7, viscosidad reducida tras autoclave
Quitosano	2,0	2,000	1,818%		
Pirofosfato de sodio tetrabásico/ fosfato de potasio dibásico trihidratado (como solución de 2,5 g/L y 50 g/L)	10,0	0,525	0,477%		
Ácido acético ac. 0,1 M	90,0				
Total	110,0	10,6	9,589%		

Tabla D. Formulación F4 (no una realización de la presente invención)

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	12	12,000	7,273%	0,6	Gel opaco, pH 7, puede ocurrir separación de fase durante esterilización
Quitano	3,0	3,000	1,818%		
β -glicerofosfato disódico (como solución acuosa 44%)	15,0	4,884	2,960%		
Ácido acético ac. 0,1 M	135,0				
Total	165,0	19,9	12,051%		

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	2,4	2,400	8,000%	0,6	Gel opaco, pH 7, puede ocurrir separación de fase durante esterilización
Quitano	0,6	0,600	2,000%		
β -glicerofosfato disódico (como solución acuosa 44%)	3,0	0,977	3,256%		
Ácido acético ac. 0,1 M	24,0				
Total	30,0	4,0	13,256%		

5

Sustancia	Peso (g)	Sólido (g)	Sólido %	Quitano/gelificante (p/p)	Comentarios
Metil celulosa	8	8,000	7,271%	0,6	Gel opaco, pH 7
Quitano	2,0	2,000	1,818%		
β -glicerofosfato disódico (como solución acuosa 44%)	10,0	3,256	2,959%		
Ácido acético ac. 0,1 M	90,0				
Total	110,0	13,3	12,071%		

Las formulaciones F1 y F4 se prepararon de la siguiente manera: En primer lugar, se preparó AcOH 0,1 M añadiendo 0,813 g (0,772 ml) de AcOH a 135,5 ml de agua para F1. Para F4, se añadieron 0,81 g (0,77 ml) de AcOH a 135,0 ml de agua. A continuación, se preparó una solución de metilcelulosa (12 g), quitano (3 g) en AcOH 0,1 N (0,1 M) (135,5 ml para F1 y 135,0 ml para F4). La solución se preparó añadiendo los polvos de polímero a AcOH 0,1 N (0,1 M) calentado a 85-90°C con agitación vigorosa. Se siguió calentando hasta obtener una dispersión homogénea (aproximadamente 5 minutos). A continuación, la solución se enfrió a temperatura ambiente con agitación (300 rpm). Al enfriarse, la solución se clarificó y se volvió muy viscosa, lo que obligó a reducir la velocidad de agitación a 60-100 rpm. El enfriamiento y la clarificación duraron aproximadamente 1 hora. A continuación, la solución se almacenó a 4°C hasta su futuro uso.

A continuación, se preparó una solución de agente gelificante (la sal funciona en la formulación como agente de gelificación, también denominada en la presente memoria como agente "gelificador") en agua, mezclando la sal en polvo con agua. Las concentraciones de las soluciones salinas fueron las siguientes: Para la F1, se preparó pirofosfato sódico tetrabásico (5 g/L) añadiendo 100 mg de pirofosfato sódico tetrabásico en 20 ml de agua y agitándolo hasta su completa disolución. Para F4, se preparó hidrato de β -glicerofosfato disódico (como solución acuosa al 44% en peso) (44 g por 66 g de agua) añadiendo 22 g de hidrato de β -glicerofosfato disódico (como solución acuosa al 44% en peso) en 33 ml de agua y se calentó a 45°C con agitación hasta su completa disolución.

La solución de gelificante así preparada se añadió a la solución de polímero fría con agitación mecánica lenta (con un mezclador a 100 rpm) hasta que fuera homogénea. Se observó un aumento significativo de la viscosidad y la formación de burbujas. La solución se dejó reposar durante la noche a 4°C. Las formulaciones se esterizaron en autoclave en el ciclo de líquidos.

Las formulaciones F2 y F3 se prepararon de la siguiente manera: Se preparó AcOH 0,1 M añadiendo 0,6 g (0,57 ml) de AcOH a 100 ml de agua. Se preparó una solución de metilcelulosa (8 g), quitosano (2 g) y azida sódica (0,025 g) en AcOH 0,1 N (90 ml). Se pesó el vaso de precipitados con la barra agitadora. La solución se preparó añadiendo los polvos (de una vez) a AcOH 0,1 N calentado hasta la ebullición (85-90°C) bajo agitación. Se detuvo el calentamiento y se obtuvo una dispersión homogénea agitando con una espátula durante aproximadamente 3 min. Se completó con la adición de AcOH hasta alcanzar el peso final (sin sal). A continuación, la solución se enfrió a temperatura ambiente. Al enfriarse, la solución se clarificó y se volvió muy viscosa. El enfriamiento y la clarificación duraron aproximadamente 1 hora. El vaso de precipitados se revistió con parafilm y se guardó a 4°C durante 24 horas (o hasta su uso posterior).

A continuación se preparó una solución de agente gelificante (sal como agente de gelificación o gelator) en agua, mezclando la sal en polvo con agua hasta la concentración deseada. La solución de gelificación se añadió a la solución de polímero fría bajo agitación mecánica lenta (con una espátula o un mezclador a 100 rpm). Se observó un aumento significativo de la viscosidad y la formación de burbujas. La solución se dejó reposar toda la noche a 4°C. La solución se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para retirar las burbujas de aire.

Se probaron varios polímeros en varias concentraciones en las formulaciones para seleccionar los polímeros y las concentraciones más favorables para el rendimiento de la formulación. También se probaron varios agentes de gelificación para ajustar la respuesta a la temperatura de la formulación, su administración en jeringa y sus propiedades de flujo. A continuación, se seleccionaron cuatro formulaciones de polímeros compuestos sol-gel (F1 - F4) con una amplia gama de propiedades de flujo para realizar más pruebas.

La caracterización preliminar de las muestras F1 - F4 se muestra en la Tabla E. Cabe destacar que el pH de los geles estaba entre 6 y 7 aproximadamente. En este experimento, se demostró que los geles podían inyectarse a través de una aguja estándar de calibre 16 utilizando una jeringa de 6 ml, lo que demuestra su capacidad única para ser infundidos a través de una aguja o boquilla de pezón para su uso como selladores de pezones. Para los datos de la Tabla E, las formulaciones probadas fueron las preparadas con los ingredientes y las cantidades de las Tablas A-D para 110 g en total.

Tabla E. Propiedades de las formulaciones de compuestos poliméricos F1-F4

Formulación	Contenido sólidos (%)	pH	Aspecto (25°C)	Capacidad de administración en jeringa (25°C)	Formación de tapones en presencia de leche (37°C)
F1	9%	6	Gel transparente	+	+
F2	10%	7	Gel blanquecino	+	+
F3	10%	7	Gel opaco	+	+
F4	13%	7	Gel opaco	+	+

La formación de tapones en presencia de leche se probó añadiendo las formulaciones (1,5-2 ml) en tubos de ensayo que contenían 0,5 ml de leche (3,5% de grasa) a 37°C. Todas las formulaciones formaron un tapón de gel en la superficie de la leche. La inspección de la interfaz entre la leche y los geles mostró que, aunque se esperaba un cierto grado de mezcla entre las formulaciones y la leche al añadir el gel a la leche, las muestras mostraron inesperadamente una miscibilidad muy limitada con la leche al formarse el tapón. Los resultados indicaron que las formulaciones eran capaces de formar un gel en presencia de la leche y de evitar las fugas de los tubos de ensayo.

Se realizó un ensayo de barrido de tensión (*es decir*, mediciones de los módulos de elasticidad y de pérdida en función de la tensión a una frecuencia fija) para confirmar el carácter de cizallamiento de las muestras. Los resultados se muestran en la Figura 6. Para los datos de la Fig. 6, las formulaciones probadas fueron las preparadas con los

A bajas tensiones aplicadas, los valores del módulo elástico G' eran constantes. La elasticidad de las muestras abarcaba un amplio espectro, que iba de aproximadamente 10 Pa para F1 a aproximadamente 440 Pa para F4. Se observó un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento (*es decir*, una disminución del módulo elástico G' en función de la tensión aplicada) a valores de tensión más elevados. La región de adelgazamiento por cizallamiento comenzó en la tensión más baja para la formulación F2, seguida de F1, F3 y F4. Estos resultados confirman que las muestras son administrables en jeringa y que su infusión es posible. Dado que la fuerza aplicada durante la infusión de la formulación y el desprendimiento de los pezones después del tratamiento es muy superior a 300 Pa, todas las formulaciones no sufrirían ningún problema de administración o recuperación.

A continuación, se controló la reología de las formulaciones tras un salto brusco de temperatura desde la temperatura ambiente hasta la temperatura corporal. Se siguieron los valores de los módulos elásticos y de almacenamiento en función del tiempo a una tensión constante de 1 Pa (*es decir*, en la región de la meseta) y de la frecuencia ($f = 0,1$ Hz). En la primera etapa del experimento (10 min.), la temperatura se mantuvo a 25°C. En la segunda etapa (10 min.), la temperatura se fijó en 37°C. El procedimiento de calentamiento entre ambas etapas demoró aproximadamente 20 segundos. Los resultados se muestran en la Tabla F y en la Fig. 7; se expresan como módulo elástico G' y tangente de pérdida $\tan \delta = G''/G'$, la relación de las propiedades elásticas y viscosas muestra cuál es la dominante. Con un valor $\tan \delta$ de 1, las propiedades elásticas y viscosas del material son iguales. Cuanto menor es la tangente de pérdida, más elástico es el material. Para los geles físicos, $G' > G''$ y $\tan \delta < 1$. Para los líquidos viscosos, $G'' > G'$ y $\tan \delta > 1$. Para los datos de la Tabla F y la Fig. 7, las formulaciones probadas fueron las preparadas con los ingredientes y las cantidades de las Tablas A-D para 110 g en total. Se comprenderá que los valores pueden variar en función del equipo y de los procedimientos reológicos empleados; y, además, estos valores son relativos entre sí dependiendo de los protocolos de ensayo particulares.

Tabla F. Resultados de las pruebas reológicas de las formulaciones de compuestos poliméricos Sol-Gel F1-F4 (Los valores de G' y $\tan \delta$ se registraron 10 min. después de la aplicación de la tensión. Frecuencia angular $f = 0,1$ Hz, tensión oscilatoria $\tau = 1$ Pa)

Formulación	T=25°C		T=37°C		$G'(37^\circ\text{C})/G'(25^\circ\text{C})$
	G' (Pa)	$\tan \delta$	G' (Pa)	$\tan \delta$	
F1	9,3	3,4	490	0,08	53
F2	71	0,26	1900	0,06	27
F3	32	0,84	870	0,05	27
F4	420	0,13	8600	0,04	20

La elasticidad de F1-F4 aumentó significativamente con la temperatura, como lo demuestran los valores de la relación $G'(37^\circ\text{C})/G'(25^\circ\text{C})$ (Tabla E) que cambiaron de 53 (F1) a 20 (F4). A temperatura ambiente, F1 se comportó como un líquido viscoso ($\tan \delta > 1$). Otras tres formulaciones mostraron un comportamiento similar al de los sólidos que se hizo más pronunciado en el orden $F3 < F2 < F4$.

A 37°C, el módulo elástico aumentó significativamente. Esto se acompañó de una rápida disminución de la tangente de pérdida, lo que indica el refuerzo de la estructura del gel. Este procedimiento demoró aproximadamente 1-2 minutos para F2, F3 y F4. Fue ligeramente más largo (aproximadamente 5 minutos) para la formulación F1.

En conclusión, se prepararon y caracterizaron cuatro formulaciones de polímeros compuestos sol-gel que cubren una amplia gama de propiedades de flujo. Las formulaciones de compuestos poliméricos sufren una rápida gelificación al aumentar la temperatura, el pH y/o la fuerza iónica. Los compuestos contienen dos polímeros hidrófilos y gelificadores iónicos. Como se ha descrito, el primer polímero sufre una gelificación inducida por la temperatura y permite la formación de un gel elástico a aproximadamente 37°C. El segundo polímero forma un gel al entrar en contacto con gelificadores iónicos introducidos en la formulación. La concentración del gel del segundo polímero depende de la cantidad de gelificador añadido, así como del pH y la fuerza iónica de la formulación.

Las muestras eran infusibles debido a sus propiedades de cizallamiento. Éstas mostraron un engrosamiento inducido por la temperatura, es decir, su estructura de gel se hizo más fuerte al aumentar la temperatura. Los resultados

indicaron que la elasticidad de las formulaciones, el inicio del adelgazamiento por cizallamiento, el grado de espesamiento inducido por la temperatura, así como la escala de tiempo de estos procedimientos, dependen del agente de gelificación utilizado en la formulación, permitiendo potencialmente un ajuste preciso de las propiedades de flujo.

5 Ejemplo 2.

Efecto de la esterilización en las formulaciones de compuestos poliméricos Sol-Gel

Se probó el autoclave como procedimiento de esterilización. Es sabido que los polímeros similares a los utilizados en las formulaciones anteriores pueden sufrir una degradación significativa tras la esterilización con radiación ionizante u óxido de etileno. Esta degradación puede reducirse utilizando una temperatura elevada para esterilizar las muestras.

10 La esterilización se realizó a 121°C durante 10 min. La duración total del ciclo, incluyendo las partes de calentamiento y enfriamiento fue de aproximadamente 45 min. La Tabla 1 muestra una comparación de las propiedades de las formulaciones preparadas con dos gelificadores diferentes (F1 y F4) antes y después de la esterilización. Para los datos de la Tabla 1, las formulaciones probadas se prepararon utilizando las recetas de las Tablas A y D para 165,5 y 165 g en total, respectivamente.

15 Tabla 1. Propiedades de las formulaciones de compuestos poliméricos antes y después de la esterilización.

Formulación	Condiciones	pH	Aspecto (25°C)	Capacidad de administración en jeringa (25°C)
F1-20141210	Antes de la esterilización	6	Gel transparente ligeramente amarillento	+
	Después de la esterilización	6	Solución viscosa transparente y amarillenta	+
F4-20141210	Antes de la esterilización	7	Gel opaco ligeramente amarillento	+
	Después de la esterilización	7	Gel amarillento opaco	+

Después de la esterilización, todas las formulaciones pudieron ser inyectadas a través de una aguja estándar de calibre 16 utilizando una jeringa de 6 ml, lo que demuestra que las formulaciones pueden ser inyectadas como selladores de pezones a través de una aguja o boquilla de pezón. El pH de las formulaciones no cambió significativamente tras la esterilización. Sin embargo, la observación visual indicó que ambas formulaciones mostraban un color amarillo/marrón más pronunciado después de la esterilización en autoclave y que sus propiedades de flujo cambiaban. En el caso de F1-20141210, se produjo un cambio de "gel" a "líquido" a 25°C.

A continuación, se controlaron más estrechamente los cambios en las propiedades de flujo de las formulaciones estériles y no estériles tras un salto de temperatura de 25°C a 37°C. Se siguieron los valores de los módulos elásticos y de almacenamiento en función del tiempo a una tensión constante (1 Pa) y a una frecuencia ($f = 0,1$ Hz). En la primera etapa del experimento (10 min.), la temperatura se mantuvo a 25°C. En el segundo paso (10 min.), la temperatura se fijó en 37°C. El procedimiento de calentamiento entre ambas etapas demoró aproximadamente 20 segundos. Los resultados se muestran en la Tabla 2 y en la Fig. 1, en la que se expresan como módulo elástico G' y tangente de pérdida $\tan \delta = G''/G'$, la relación de las propiedades elásticas y viscosas muestra cuál es la dominante. Cuando el valor de $\tan \delta$ es 1, las propiedades elásticas y viscosas del material son iguales. Cuanto menor es la tangente de pérdida, más elástico es el material. Para los geles físicos, los valores son $G' > G''$ y $\tan \delta < 1$. Para los líquidos viscosos, los valores son $G'' > G'$ y $\tan \delta > 1$. Para los datos de la Tabla 2 y la Fig. 1, las formulaciones probadas se prepararon utilizando las recetas de las Tablas A y D para 165,5 y 165 g en total, respectivamente.

Tabla 2. Resultados de las pruebas reológicas de las formulaciones de compuestos poliméricos antes y después de la esterilización. Los valores de G' y $\tan \delta$ se registraron 10 minutos después de la aplicación de la tensión. Frecuencia angular $f = 0,1$ Hz, tensión oscilante $\tau = 1$ Pa.

Formulación	Condiciones	T=25°C		T=37°C	
		G' (Pa)	$\tan \delta$	G' (Pa)	$\tan \delta$
F1-20141210	Antes de la esterilización	17	0,83	560	0,07
	Después de la esterilización	8,7	0,91	650	0,05
F4-20141210	Antes de la esterilización	480	0,15	9800	0,03
	Después de la esterilización	440	0,10	5500	0,05

- 5 Las formulaciones estériles se caracterizaron por un valor ligeramente menor del módulo elástico en comparación con sus contrapartes no estériles. Sin embargo, esta diferencia fue pequeña, especialmente en el caso de F4-20141210. A 37°C, el módulo elástico aumentó significativamente. Esto se acompañó de una rápida disminución de la tangente de pérdida, lo que indica el refuerzo de la estructura del gel. Este procedimiento demoró entre 1 y 2 minutos para la formulación F4-20141210 y fue ligeramente más largo (aproximadamente 5 minutos) para la muestra F1-20141210.
- 10 La esterilización de las muestras no afectó significativamente a la cinética del aumento de la viscosidad ni a los valores finales de G' y $\tan \delta$ alcanzados por las muestras a 37°C (Fig. 1).

En conclusión, se probaron dos geles compuestos. Los compuestos eran infusibles debido a sus propiedades de cizallamiento. Estos mostraron un engrosamiento inducido por la temperatura, es decir, su estructura de gel se hizo más fuerte al aumentar la temperatura. Aunque la esterilización de las muestras indujo algunos cambios sutiles en su aspecto, la elasticidad de las formulaciones, el grado de espesamiento inducido por la temperatura y la escala temporal de este procedimiento no se ven afectados de forma significativa por el procedimiento de esterilización.

Ejemplo 3.

Estudios adicionales sobre la esterilización de formulaciones de compuestos de polímeros

20 Las formulaciones F1 y F4 son compuestos poliméricos que se pueden dilatar en agua y que experimentan una rápida gelificación al aumentar la temperatura, el pH y/o la fuerza iónica. Los compuestos contienen dos polímeros hidrófilos y gelificadores iónicos. El primer polímero sufre una gelificación inducida por la temperatura y permite la formación de un gel elástico a aproximadamente 37°C. El segundo polímero forma un gel al entrar en contacto con gelificadores iónicos introducidos en la formulación. La fuerza del gel del segundo polímero depende de la cantidad de gelificador que se añada, así como del pH y la fuerza iónica de la formulación (normalmente, pH de aproximadamente 5,1 a 6,8 y fuerza iónica de aproximadamente 5 g/L).

En el Ejemplo 2, se demostró que las propiedades de flujo de las formulaciones no se vieron afectadas significativamente por la esterilización. Este estudio adicional muestra el efecto de la esterilización en los compuestos poliméricos que se pueden dilatar en el agua.

30 Para la muestra F1-20141210, se repitieron las mediciones reológicas doce semanas después de la esterilización. Durante este período, la muestra se almacenó en la oscuridad en viales de plástico cerrados a temperatura ambiente. La observación visual confirmó que el aspecto y la consistencia de la muestra no cambiaron significativamente tras 12 semanas de almacenamiento. Además, no se detectó ningún signo visual de crecimiento de microorganismos en la muestra.

35 En primer lugar, se controlaron los cambios en las propiedades de flujo tras un salto de temperatura de 25°C a 37°C. Se siguieron los valores de los módulos elásticos y de almacenamiento en función del tiempo a una tensión constante (1 Pa) y a una frecuencia ($f = 0,1$ Hz). En la primera etapa del experimento (10 min.), la temperatura se mantuvo a 25°C. En el segundo paso (10 min.), la temperatura se fijó en 37°C. El procedimiento de calentamiento entre ambas etapas demoró aproximadamente 20 segundos. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y en la Fig. 2; se expresan como módulo elástico G' y tangente de pérdida $\tan \delta = G''/G'$, la relación de las propiedades elásticas y viscosas muestra cuál es la dominante. Con un valor de $\tan \delta$ de 1, las propiedades elásticas y viscosas del material son iguales. Cuanto menor es la tangente de pérdida, más elástico es el material. Para los geles físicos, los valores son $G' > G''$ y $\tan \delta < 1$. Para los líquidos viscosos, los valores son $G'' > G'$ y $\tan \delta > 1$. Para los datos de la Tabla 3 y la Fig. 2, las formulaciones probadas se prepararon utilizando las recetas de las Tablas A y D para 165,5 y 165 g en total, respectivamente.

Tabla 3. Resultados de las pruebas reológicas de la formulación F1-20141210 inmediatamente y 12 semanas después de la esterilización. Los valores de G' y $\tan \delta$ se registraron 10 minutos después de la aplicación de la tensión. Frecuencia angular $f = 0,1$ Hz, tensión oscilante $\tau = 1$ Pa.

Condiciones	T=25°C		T=37°C	
	G' (Pa)	$\tan \delta$	G' (Pa)	$\tan \delta$
Inmediatamente después de la esterilización	8,7	0,91	650	0,05
12 semanas después de la esterilización	10	1,3	420	0,05

- 5 Los datos muestran que el almacenamiento de la muestra F1-20141210 durante 12 semanas no afectó significativamente a las propiedades de flujo ni a la magnitud del efecto de engrosamiento térmico (Fig. 2). A 25°C, la muestra mostró una tangente de pérdida de aproximadamente 1. El calentamiento a 37°C se acompañó de una rápida disminución de $\tan \delta$, lo que indica el refuerzo de la estructura del gel. La cinética de este procedimiento fue similar para las muestras recién esterilizadas y las de 12 semanas.
- 10 Se realizó una prueba de barrido de tensión (*es decir*, mediciones de los módulos elásticos y de pérdida en función de la tensión a una frecuencia fija) para confirmar el carácter de adelgazamiento por cizallamiento de la muestra almacenada durante un período de 12 semanas. Los resultados se muestran en la Figura 3. A bajas tensiones aplicadas, los valores del módulo elástico G' fueron constantes y similares a los obtenidos para la muestra F1-20140825 (preparada con la receta de la tabla A para 110 g en total) (*es decir*, muestra no estéril preparada en condiciones similares a las de F1-20141210, que se preparó en un lote de 165,5 g en total). Se observó un comportamiento de adelgazamiento por cizallamiento (*es decir*, una disminución del módulo elástico G' en función de la tensión aplicada) para ambas formulaciones a un valor similar de aproximadamente 80 Pa. Estos resultados confirman que la administración en jeringa de la muestra no se verá afectada significativamente tras un almacenamiento de 12 semanas a temperatura ambiente.
- 15
- 20 En conclusión, se evaluó la estabilidad físico-química de una de las muestras de gel compuesto después de 12 semanas de almacenamiento a temperatura ambiente (en un recipiente cerrado, en la oscuridad). Los resultados muestran que las propiedades de flujo y la administración en jeringa de la muestra no se ven afectadas significativamente tras 12 semanas de almacenamiento.
- 25 Los ejemplos 4 a 6 no son realizaciones de la presente invención.

Ejemplo 4.

Preparación del gel Pluronic® F127 reforzado con celulosa nanocristalina

- 30 El desarrollo se realizó en términos de (1) el inicio de la gelificación de la formulación a una temperatura cercana a la temperatura del cuerpo/de la piel (32-35°C), (2) la administración en jeringa de la formulación a temperatura ambiente, y (3) el tiempo necesario para inducir la formación del gel a 35°C.

- 35 Todas las formulaciones se prepararon siguiendo el siguiente procedimiento: El polímero Pluronic® F127 se fundió en un vial de vidrio de 20 ml con calentamiento y agitación (1,6 a 1,8 g). Se añadió un agente de carga (celulosa nanocristalina (NCC)), si era necesario (100 o 200 mg). La agitación y el calentamiento se continuaron durante aproximadamente 5 minutos. La solución de quitosano en 2% ac. Se añadió AcOH bajo agitación hasta un peso final de la muestra de 10 g. La muestra se mantuvo bajo agitación vigorosa durante la noche (sin calentamiento).

El inicio de la gelificación se midió calentando la muestra en un baño de agua hasta la temperatura deseada. Para varias formulaciones, se verificó la administración en jeringa/la capacidad de fluir a temperatura ambiente pasando aproximadamente 3 ml de la formulación desde una jeringa de plástico de 10 ml a través de una aguja de calibre 16.

- 40 En un experimento separado, se estimó el tiempo de gelificación depositando una gota de la muestra mantenida a temperatura ambiente a través de una aguja de calibre 16 en la pared de un tubo Eppendorff de plástico calentado a 37°C. El tiempo necesario para detener el flujo de la solución se tomó como una aproximación del tiempo de gelificación.

- 45 Las soluciones de quitosano se prepararon de la siguiente manera: Se preparó una solución de quitosano (CH, 2% p/p) mediante la agitación vigorosa durante la noche del polvo de quitosano suspendido en AcOH al 2%, lo que dio lugar a la formación de una solución transparente y homogénea de color amarillento. Esta solución se diluyó hasta una concentración de 1 % y de 0,5 % con agua, seguida de la adición de una solución de NaOH a 0,5 % hasta alcanzar un pH de aproximadamente 6. Los resultados se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Soluciones de quitosano

Concentración final de Pluronic® F127 (% en peso)	Disolvente	Aditivo	Temperatura de gelificación	Capacidad de inyección a temperatura ambiente
16%	AcOH ac. (2%)	N/A	>40°C	+
	CH 1% en AcOH	N/A	>40°C	+
	CH 2% en AcOH	N/A	38°C	+
17%	AcOH ac. (2%)	N/A	37°C	+
	CH 1% en AcOH	N/A	37°C	+
	CH 2% en AcOH	N/A	37°C	+
18%	CH 0,5% en AcOH	N/A	32°C	+
	CH 1% en AcOH	N/A	31°C	+*
	CH 2% en AcOH	N/A	31°C	+*
18%	CH 1% en AcOH	NCC 100mg	29°C	+
17%	CH 1% en AcOH	NCC 100mg	36°C	+
		NCC 200mg	34°C	+
		NCC 500mg	29°C	+
*Para estas muestras, se estimó el tiempo de gelificación; la gota de formulación formó un gel casi inmediatamente después del contacto con la pared del tubo Eppendorf.				

En la Fig. 4 se muestra un gráfico que muestra la dependencia de la temperatura de gelificación con la cantidad de celulosa nanocristalina (NCC) para la formulación de 17% de Pluronic® F127 en 1% de CH (pH a aproximadamente 6).

La temperatura de gelificación de las formulaciones puede ajustarse ajustando la concentración de Pluronic® F127. La presencia de CH no tuvo ningún efecto sobre la gelificación. Todas las muestras eran administrables en jeringa a temperatura ambiente. Para las formulaciones que tienen 18% de Pluronic® F127 en una solución de CH 1% o 2%, se estimó que el tiempo de gelificación era casi inmediato. La adición de NCC provocó una disminución de la temperatura de gelificación. NCC reforzó los geles e indujo la histéresis de la temperatura (es decir, las muestras se vuelven líquidas al enfriarse a temperaturas inferiores a su punto de gelificación determinado al calentarse).

Ejemplo 5.

Síntesis de un gel de quitosano modificado

Carboximetil quitosano se preparó de la siguiente manera: La carboximetilación se llevó a cabo agitando el quitosano (2 g) en NaOH al 20% (p/v 100 ml) durante 15 minutos. A continuación, se añadió gota a gota ácido monocloroacético (15 g) a la mezcla de reacción y se continuó la reacción durante 2 horas a 40 +/- 2°C con agitación. A continuación, la mezcla de reacción se neutralizó con ácido acético al 10% y se vertió en un exceso de metanol al 70%. El carboximetil quitosano producido se filtró con un embudo sinterizado G2 y se lavó con metanol. El producto se secó al vacío a 55°C

durante 8 horas para dar 6,5 g de carboximetil quitosano seco. El grado de sustitución del carboximetil quitosano (CMCh) se determinó en 0,75 utilizando los procedimientos descritos (Biomacromolecules, Vol. 5, nº 2, 2004).

Se disolvió acetato de polivinilo (PVA) (1g) en agua (85 ml) a 45°C. Después de que la solución de PVA-agua se enfriara a temperatura ambiente, se añadió gota a gota acetona (15 ml) a la solución de PVA agitada vigorosamente durante 15 minutos para formar una solución de PVA de aproximadamente el 1% (p/v). A continuación, la solución se mantuvo a 5°C durante 24 horas hasta que se volvió de color amarillo claro, lo que indicaba que las cadenas largas de PVA se habían contraído hasta convertirse en nanopartículas. A continuación, se añadieron a la solución diferentes cantidades de CMCh (0,5, 1 y 2 % en peso). La solución se purgó con N₂ durante 30 minutos, luego se añadieron a la solución 4,0 mmol de metilenbisacrilamida (MBA), 0,4 mmol de persulfato de potasio (KPS) y 0,67 mmol de tetrametilendiamina (TEMED), y la polimerización se llevó a cabo durante 15 horas a 30°C. Los nanogeles formados se utilizaron directamente o pudieron congelarse para formar un polvo liofilizado que se dispuso fácilmente en agua, formando una dispersión de nanopartículas, antes de su uso.

El quitosano acílico se preparó de la siguiente manera: Se utilizó MeSO₃H como disolvente del quitosano para ayudar a proteger los grupos amino de las moléculas de quitosano de la reacción de acilación. Típicamente, el quitosano se disolvió en MeSO₃H a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadió cloruro de octanoilo gota a gota bajo agitación, siendo la relación molar del cloruro de octanoilo con la unidad de repetición del quitosano igual a 0,66:1. Se dejó que la reacción continuara durante 5 horas a temperatura ambiente antes de detenerla mediante la adición de hielo picado. La solución resultante se dializó durante un día para eliminar la mayor parte del ácido, y el ácido y la sal de amonio restantes se neutralizaron posteriormente con NaHCO₃. La mezcla final se dializó con agua Milli-Q durante más de 3 días y luego se liofilizó como polvo de acil quitosano (AC).

Ejemplo 6.

Síntesis de PVA-Acilato

Materiales: Alcohol polivinílico (PVA), 186K, 87%-89% hidrolizado: 10 g. R-COCl (*por ejemplo*, cloruro de lauroilo, cloruro de palmitoilo, cloruro de octanoilo): 1,68 g. Trietilamina (ET3N): 2,25 1-metil-2-pirrolidona (NMP): 100 g.

En los experimentos alternativos, los materiales fueron los siguientes: 10 g de PVA, 186 K, 87-89% hidrolizado; 3,36 g de R-COCl (cloruro de lauroilo, cloruro de palmitoilo o cloruro de octanoilo); 4,50 ml de ET3N; y 150 ml de NMP.

Procedimiento de síntesis: Se añadió PVA a NMP caliente; si era demasiado viscoso, se añadió más NMP, hasta un volumen final de 50 ml. Tras la disolución completa, se añadió R-COCl, seguido de ET3N. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche con agitación. A continuación, se diluyó PVA-acilato añadiendo 3 veces agua, agitando, y luego se purificó mediante diálisis durante 5 días, para después liofilizarse. Rendimiento: 90%.

La viscosidad a 6 s⁻¹ de PVA-ilato así preparado se muestra en la Fig. 5.

Ejemplo 7.

Evaluación de la retención y tolerancia de los selladores de pezones infundidos en vacas

El objetivo de este estudio fue evaluar la retención y la tolerancia del uso novedoso de dos formulaciones compuestas de polímeros sol-gel (F1 y F4, preparadas con las formulaciones de las Tablas A y D, respectivamente, para 165,0 g en total) como selladores intramamarios de pezones (ITS) durante el período seco de las vacas lecheras.

Ocho vacas (vacas lecheras Holstein adultas y preñadas) fueron secadas al inicio del estudio y a cada cuarto se le asignó uno de los dos grupos de tratamiento, T01 y T02. El grupo T01 recibió el tratamiento con F1 mientras que el grupo T02 recibió el tratamiento con F4. La terapia de vaca seca con Spectramast® DC (clorhidrato de ceftiofur) se administró por trimestre de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta antes de la infusión del sellador. Las formulaciones se esterilizaron con vapor antes de la infusión. Todas las dosis de STI se administraron como infusiones intramamarias en todos los cuartos disponibles de una vaca asignada. Se les asignó a los ocho animales una evaluación ecográfica consistente en momentos definidos a lo largo de la duración del estudio. Aproximadamente 60 días después de la administración, en el momento del parto, se retiró todo el STI de prueba mediante un retiro manual. A lo largo del estudio se realizaron y registraron observaciones generales de salud y observaciones visuales de la ubre/cuarto.

Las formulaciones de STI se administraron a través de una jeringa y un accesorio de punta de mezcla especializado o apósitos listos para usar, intramamarios (IMAM), 2,0 ml. Se utilizó el procedimiento de administración de inserción parcial. F1 y F4 se infundieron a 2,2 g +/- 0,5 g. Ambas formulaciones se infundieron con facilidad, aunque se observó una resistencia inicial a la iniciación debido a las propiedades de adelgazamiento del sustrato. E F4 requiere más fuerza para infundir en comparación con F1. Sin embargo, una vez iniciado el flujo, F4 se hizo más fácil de infundir. Todas las jeringas habían sido esterilizadas en autoclave antes de la infusión. La infusión del sustrato en todos los pezones de prueba de los animales se realizó fácilmente. Ninguna jeringa demostró tener defectos. Ninguna jeringa demostró tener dificultades para la infusión.

Se comprende que los terneros eran retirados inmediatamente al nacer, y por lo tanto no se les permitía mamar. El sustrato se retiró fácilmente mediante el desprendimiento manual de todos los pezones en el primer ordeño del animal después del parto, aproximadamente 60 días después de la administración. No se observó ninguna dificultad al retirar el sustrato de los pezones de ninguno de los animales.

- 5 Se tomaron muestras de la primera leche después del parto para analizar la presencia de sustrato sellador. No se determinó el peso de las muestras después de las extracciones debido a la imposibilidad de distinguir el material de sellado de los pezones del calostro. Como consecuencia de las propiedades de los selladores de pezón de ser delgados y sensibles a la temperatura, y debido a que se ejerció una fuerza de cizallamiento sobre las formulaciones para retirarlas de la cisterna del pezón, la formulación se había adelgazado al retirarla del pezón. Además, dado que
- 10 estas formulaciones se gelifican a temperaturas más cálidas y se vuelven líquidas a temperaturas más frías, el hecho de colocar las muestras de extracción de calostro recogidas en el refrigerador inmediatamente después de la recolección diluyó aún más la formulación. Cuando la formulación volvió a su forma líquida en la temperatura fría del refrigerador, se hizo difícil por medios convencionales separar el sustrato de sellado del calostro para facilitar una recuperación porcentual precisa para una medición del sustrato total eliminado.
- 15 Un patólogo examinó el interior de los canales del pezón para comprobar la seguridad de las formulaciones. No se identificó ninguna lesión macroscópica que tuviera relación con el sustrato o las formulaciones de prueba. Se observó una incidencia de un pezón con una leve fibrosis subepitelial e infiltración mononuclear. Este hallazgo no pudo correlacionarse con el sustrato de la prueba. Todos los demás pezones examinados eran normales y no presentaban ningún resultado adverso. Se enviaron los tejidos para su separación en secciones si se identificaba alguna zona de
- 20 interés patológico considerable para descartar cualquier problema de sustrato, pero no se identificó ninguno. La evaluación microscópica de los tejidos de este estudio de retención no arrojó ningún resultado relacionado con el sustrato.
- 25 Las formulaciones permanecieron en los pezones hasta el parto y se evaluaron visualmente durante todo el período de retención mediante una puntuación de ultrasonido. El personal capacitado realizó observaciones por ultrasonido para evaluar la presencia del sellador en los días 0, 1, 4 y luego semanalmente hasta el parto. Los números se registraron en una escala visual de 0 (no hay sellante evidente en la cisterna del pezón) a 5 (la cisterna del pezón parece totalmente bloqueada con sellante). Cualquier observación inusual fue registrada en el formulario de observaciones diarias. Todas las formulaciones permanecieron en los pezones durante todo el período de vaca seca sin incidencia.
- 30 Los resultados de la puntuación de ultrasonido se muestran en las siguientes Tablas 5 y 6 para F 1 y F2, respectivamente:

Tabla 5. Puntuación por Ultrasonido de Formulación F1

Identificación de la vaca	Cuarto	Día 0	Día 1	Día 4	Día 7	Día 14	Día 20	Día 28	Día 47
556	LF	5	4,5	5	5	5	3,5	4	4
556	RR	5	5	5	4,5	5	4,5	3,5	3,5
557	LF	5	4	4,5	4	4	3,5	4	4
557	LR	4,5	4	4	4	4,5	3,5	3,5	4
558	LF	5	4	5	4,5	4	4	4	4
558	RF	5	4	5	4	4,5	3,5	3,5	4
559	LF	4,5	4	4	4	4	4	3,5	4
559	LR	5	N/A	5	5	4	4	3,5	3,5
560	LR	4,5	4	4	4	4	4	4	3,5
560	RF	5	4	4	4	4	4	4	4
561	LR	5	4	3	3,5	5	3	3,5	3,5
561	RF	5	3	5	5	5	3,5	3,5	3
562	LR	4,5	4	3,5	3,5	3,5	3	3	3
562	RR	5	4	3	5	3,5	3,5	3,5	3,5
563	LR	5	5	4	3	4	4	4	no hay vídeo
563	RR	5	5	4	3	4	4	4	no hay vídeo

Tabla 6. Puntuación por Ultrasonido de Formulación F4

Identificación de la vaca	Cuarto	Día 0	Día 1	Día 4	Día 7	Día 14	Día 20	Día 28	Día 47
556	LR	5	4	4,5	4	4,5	4	4	3,5
556	RF	4,5	4	4,5	4	4,5	4,5	4	4
557	RF	4	4	4	4	N/A	4	3,5	4
557	RR	5	4	4	4	4	4	3,5	4
558	LR	5	5	4	5	4,5	3	3	4
558	RR	4,5	3,5	4	2,5	3,5	3,5	3,5	3,5
559	RF	4,5	N/A	4	4	4	4	3	3,5
559	RR	4,5	4	4	5	4	3,5	3	3,5
560	LF	4	4	4	3	3,5	3,5	3	4
560	RR	5	3,5	4	3	3	4	3	4
561	LF	5	4	5	5	5	3,5	3,5	3
561	RR	5	3	4	N/A	3,5	3,5	3	3,5
562	LF	4,5	4	5	4	3,5	3,5	3	4
562	RF	5	4	5	4	4	4	4	4
563	LF	4,5	5	4	4	3,5	4	4,5	no hay vídeo
563	RF	4,5	5	5	5	4,5	4,5	4,5	no hay vídeo

En resumen, el estudio demostró que las formulaciones compuestas de polímero sol-gel eran fáciles de administrar por infusiones intramamarias y de retirar por extracción manual. Los resultados también indicaron que las vacas lecheras toleraron los selladores de pezones sin efectos secundarios adversos. Por último, los resultados demostraron la retención de los selladores de pezones durante el período seco de las vacas lecheras hasta que los selladores fueron retirados físicamente al final del estudio.

Ejemplo 8.

Evaluación de la retención y tolerancia de los selladores de pezones infundidos en vacas

El objetivo de este estudio fue evaluar la retención y la tolerancia del uso novedoso de dos formulaciones compuestas de polímeros sol-gel (F1 y F4, preparadas con las formulaciones de las Tablas A y D, respectivamente, para 165,0 g en total) como selladores intramamarios de pezones (ITS) durante el período seco de las vacas lecheras.

Treinta vacas (vacas lecheras Holstein adultas y preñadas) fueron secadas al inicio del estudio y a cada cuarto se le asignó uno de los cuatro grupos de tratamiento, TO1 a T04. Se infundieron dos volúmenes de dosis de 2,0 y 3,0 ml por formulación para evaluar si el volumen tenía un efecto sobre la retención. Los grupos TO1 y T02 recibieron el tratamiento con F1 en un volumen de aproximadamente 2,0 ml (suministrado realmente: promedio de 1,99 +/- 0,19) y de aproximadamente 3,0 ml (suministrado realmente: promedio de 2,88 +/- 0,15), respectivamente. Los grupos T03 y T04 recibieron el tratamiento con F4 en un volumen de aproximadamente 2,0 ml (suministrado realmente: promedio de 1,54 +/- 0,37) y de aproximadamente 3,0 ml (suministrado realmente: promedio de 2,24 +/- 0,55), respectivamente. Los animales se aclimataron primero a las instalaciones, la dieta y la fuente de agua durante al menos 10 días antes de iniciar el estudio. El día del estudio -1 +/- 2 días, antes del ordeño matutino, se tomaron muestras de cuartos de leche para el análisis del recuento de células somáticas y la evaluación bacteriana.

La terapia de vaca seca con Spectramast® DC (clorhidrato de ceftiofur) se administró por trimestre de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta antes de la infusión del sellador. Todas las dosis de STI se administraron como infusión intramamaria en todos los cuartos disponibles de una vaca asignada. Se completó la evaluación semanal por ultrasonido de los pezones de los treinta animales en momentos definidos a lo largo del estudio, en un esfuerzo por determinar la retención y la evaluación de los selladores como barrera física.

Los extremos de los pezones de los cuatro cuartos de quince animales fueron expuestos semanalmente a una suspensión bacteriana durante el período seco y después de la administración del sellador de pezones y de la terapia de vaca seca para simular condiciones higiénicas deficientes en la lechería. Se utilizó un stock congelado de *E. coli* para preparar la suspensión bacteriana de 1×10^6 unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ ml) en caldo de soja tripticasa. Los cuatro extremos de los pezones de los animales se expusieron al preparado de *E. coli* mediante una única inmersión de una taza de inmersión una vez por semana a partir del día 7. La exposición a *E. coli* cesó tras el parto o el retiro del sellador de pezones.

Aproximadamente 60 días después de la administración y en el primer ordeño posparto, la prueba de STI fue retirada a mano. Las muestras de sellador recuperadas se almacenaron a temperatura ambiente. A partir del día del primer ordeño tras el parto, se observó a cada vaca en busca de signos clínicos de mastitis. Se tomaron muestras de cuartos estériles para el cultivo bacteriológico de cada cuarto de la ubre después de una cuidadosa limpieza y prevaciado de cada pezón individual en los días 1, 2, 3, 7, 10 y 14 posparto. Se recogieron muestras de leche y calostro en varios momentos del experimento para medir posibles residuos o metabolitos. También se registraron los recuentos de células somáticas y el peso de la leche para evaluar el estado de la ubre, la presencia de mastitis y la calidad de la leche.

El análisis de ultrasonido para todos los sustratos indicó la presencia de una cantidad significativa de material durante todo el período de secado, independientemente del volumen de la dosis. Se observó que el sustrato sufrió cambios de aspecto entre los días 14 y 35. Ambas formulaciones parecían persistir en el canal del pezón y permanecían como barrera protectora durante el período de secado hasta la retirada física de los selladores del pezón. El sustrato posparto se retiró del pezón mediante el retiro manual.

Tras el regreso a la lactancia, la salud de la ubre, el aspecto de la leche y la presencia de bacterias fueron supervisadas durante un período de dos semanas para todos los animales que permanecieron en el estudio. Aunque se observaron puntuaciones anormales (elevadas) en la salud de la ubre en un pequeño número de vacas individuales para todos los grupos de tratamiento en el transcurso del período de 14 días, éstas no pudieron atribuirse al fallo del sellador de pezones. Ni la salud de la ubre ni la calidad de la leche fueron estadísticamente diferentes entre los grupos de tratamiento.

Se requieren estudios de campo adecuadamente diseñados y supervisados para confirmar la prevención de la mastitis. Sin embargo, en base a este estudio de retención, se puede concluir que el compuesto polimérico sol-gel proporciona una barrera física suficiente y duradera que es capaz de proteger a los animales de ganado lácteo sanos de nuevas infecciones o reinfecciones.

En resumen, todos los tratamientos se mantuvieron durante todo el período de secado y parecieron proteger el pezón a través de la evaluación por ultrasonido. Todos los sustratos eran fácilmente retirables y no se observaron efectos relacionados con el tratamiento en la evaluación macroscópica y microscópica de los tejidos. En general, ambas formulaciones, F1 y F4, se comportaron bien con una buena retención durante el período de secado.

Ejemplo 9.

Evaluación del uso del compuesto de polímero Sol-Gel para la liberación de fármacos

El objetivo de este estudio fue evaluar la liberación y la actividad antimicrobiana de un agente antibacteriano a través de la formulación de polímero compuesto sol-gel. La formulación F2, preparada como se ha descrito anteriormente, se utilizó y se cargó con 20 mg de amoxicilina por gramo de formulación sin afectar a su propiedad reológica que, por extensión, está relacionada con la formación de tapones para el sellado de los pezones.

Carga de amoxicilina: Se preparó una formulación de polímero sol-gel cargado de F2 mezclando minuciosamente metilcelulosa (8,0 m%), quitosano (2,0 m%), trihidrato de amoxicilina (2,0 m%) y fosfato monopotásico (0,76 m%) en ácido acético 0,1 M hasta obtener una crema blanquecina homogénea.

Los datos reológicos del sol-gel F2 cargado se compararon con los del compuesto polimérico sol-gel F2 no cargado (Tabla 7). Los datos de la Tabla 7 representan las propiedades medias de varios lotes (de las mismas materias primas) de sol-gel sin carga (n=6) o con carga (n=3). Los valores del módulo de almacenamiento de cizallamiento G' y del módulo de pérdida de cizallamiento G'' eran estadísticamente iguales entre las dos formulaciones de sol-gel; los valores de $\tan \delta$ eran, por tanto, trivialmente iguales. Esto demuestra que estas propiedades físicas relevantes del compuesto polimérico sol-gel no se vieron afectadas por la incorporación de amoxicilina al 2%.

Cuantificación de la amoxicilina: Para supervisar la liberación de amoxicilina desde el compuesto polimérico sol-gel cargado, se empleó un procedimiento espectrofotométrico simple para cuantificar el fármaco. La absorbencia a 274

nm se ha correlacionado con la concentración de amoxicilina en tampón acuoso de fosfato utilizando $\epsilon_{274}=1,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Espectrofotómetro UV-Vis Cary 60, Agilent Technologies). Este coeficiente de extinción es consistente con otros valores encontrados en la literatura ($\epsilon_{274, \text{etanol}}=1,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y $\epsilon_{272, \text{HCl } 0.1\text{M}}=1,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$; *The Merck Index Online*).

- 5 Liberación de la amoxicilina. En primer lugar se depositó una cantidad de compuesto polimérico sol-gel cargado en el fondo de una cubeta de cuarzo, mantenida a $T=37^{\circ}\text{C}$ o $T=25^{\circ}\text{C}$. A continuación, se llenó la cubeta con un volumen conocido de tampón fosfato (100 mM KH_2PO_4 , 100 mM NaCl, $\text{pH}=6,5$). En este punto, la amoxicilina comenzó a difundirse fuera del sol-gel. Esta liberación se controló siguiendo la absorbancia de la solución sobre la alícuota de sol-gel a 274 nm. La liberación de amoxicilina (Fig. 8) se calculó mediante

$$\text{Liberación \%} = (A/\epsilon l) \cdot (n_{\text{amox}}/V)$$

- 10 en la que A es la absorbancia a 274 nm, ϵ es el coeficiente de extinción de la amoxicilina a 274 nm ($1,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), l es la longitud de recorrido de la cubeta, n_{amox} es la cantidad de amoxicilina contenida inicialmente en el sol-gel depositado en el fondo de la cubeta, y V es el volumen total en la cubeta (es decir, $V_{\text{tampón}} + V_{\text{gel}}$). Las curvas de la Fig. 8 representan la liberación promedio de los experimentos realizados con 3 lotes de compuestos poliméricos sol-gel. La curva a 37°C (es decir, a temperatura fisiológica) mostraba un comportamiento de liberación temprana por parte del sol-gel, con un 50% del fármaco liberado en aproximadamente 1 hora, seguido de una liberación sostenida hasta el 100% de la amoxicilina después de aproximadamente 6 horas, lo que sería beneficioso para lograr niveles sanguíneos rápidos y sostenidos del agente antimicrobiano. A 25°C , la liberación fue mucho más lenta, ya que sólo se liberó un 20% de amoxicilina del compuesto polimérico sol-gel después de 5 horas. Estos resultados demuestran que la formulación sol-gel cargada liberó su contenido siguiendo una curva de liberación bastante gradual a temperatura fisiológica. Además, se comprobó que la tasa de liberación estaba positivamente correlacionada con la temperatura de la muestra.

Tabla 7. Comparación de las propiedades reológicas de sol-gel cargados y no cargados.

	T ($^{\circ}\text{C}$)	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan \delta$
Sin carga (n=6)	25	70 ± 40	30 ± 10	$0,40 \pm 0,10$
	37	700 ± 200	50 ± 10	0,07 0,02
Cargado (n=3)	25	80 ± 50	30 ± 10	$0,37 \pm 0,03$
	37	500 ± 100	40 ± 10	$0,09 \pm 0,04$

Actividad antimicrobiana: La actividad antimicrobiana del compuesto polimérico sol-gel cargado con amoxicilina se evaluó mediante el ensayo de susceptibilidad en disco de Kirby-Bauer. Se evaluó su zona de inhibición y se comparó con la del gel no cargado.

- 30 Una alícuota de 1 g de sol-gel F2 cargado de amoxicilina, preparado como se ha descrito anteriormente, se extendió sobre un disco de celulosa de 25 mm (Millipore). A continuación, el disco se depositó en una placa de agar sangre TSA II (Oxoid) que se inoculó con 100 μl de *Escherichia coli* ATCC 25922 en cultivo de caldo y se diluyó para ajustarse a un estándar de turbidez de 0,5 McFarland. El mismo procedimiento se utilizó para el experimento de control, que se llevó a cabo con un sol-gel de F2 sin carga.

- 35 Después de 24 horas de incubación, una zona de inhibición de $d=42 \text{ mm}$ (Tabla 8) fue visible en los alrededores del disco de celulosa para el gel cargado, mientras que el control no exhibió ninguna zona de inhibición. Con una zona de inhibición de 16 mm sobre el tamaño del disco, se observa la eficaz acción antimicrobiana de la amoxicilina sobre *E. coli* ATCC 25922.

Tabla 8. Resumen de los resultados de la prueba de susceptibilidad en disco de Kirby-Bauer.

	T (°C)	Zona de inhibición (mm)
Sin carga (n=1)	37	0 ± 0
Cargado (n=3)	37	42 ± 2

En resumen, se demostró por espectrofotometría que la amoxicilina se liberaba totalmente del compuesto polimérico sol-gel en 6 horas a 37°C, mientras que a 25°C sólo se liberaba el 25%. Por último, el compuesto polimérico sol-gel cargado con amoxicilina demostró una clara actividad antimicrobiana en comparación con el sol-gel no cargado, tal como se evaluó mediante el procedimiento del disco de susceptibilidad de Kirby-Bauer.

Ejemplo 10.

Evaluación del compuesto polimérico Sol-Gel como barrera a la migración bacteriana

El propósito de las dos pruebas de este estudio era ilustrar la capacidad de las formulaciones de polímeros compuestos sol-gel para actuar como barrera contra la migración bacteriana en un pezón de vaca de vidrio simulado.

Las formulaciones compuestas de polímero sol-gel F1-F4 mostradas en la Tabla 9 se prepararon como se describe anteriormente.

Tabla 9. Composiciones de polímeros sol-gel.

Muestra	Quitano	Metilo	Sal
F1	1,8%	7,3%	pirofosfato sódico tetrabásico 0,05%
F2	2%	4%	fosfato potásico dibásico 0,7%
F3	2%	4%	pirofosfato sódico tetrabásico 0,025% / fosfato potásico dibásico 0,35%
F4	1,8%	7,3%	sal disódica de β-glicerofosfato hidratada 3,6%

Las diferentes formulaciones sol-gel pueden definirse por sus respectivas propiedades reológicas en forma de Tan δ, G' y G'' como se presenta en la Tabla 10.

Tabla 10. Propiedades reológicas, pH y aspecto del compuesto polimérico sol-gel.

Muestra	Tan δ 25/37°C	G' (Pa)	G'' (Pa)	pH	Aspecto
F1	1,59/0,04	4/672	7/23	6	Tan, líquido
F2	0,19/0,04	283/5798	52/239	6,59	Tan, blanquecino
F3	0,65/0,04	24/2742	16/75	6,29	Tan, blanquecino
F4	0,1/0,04	398/5315	38/200	6,75	Amarillento, gel

Además, se preparó un medio de prueba de motilidad de control denominado "BAM 103" mezclando triptosa 10,0 g/L y cloruro de sodio 5,0 g/L, y luego se endureció añadiendo agar 5,0 g/L.

Prueba 1 - Evaluación de la impermeabilidad del compuesto polimérico Sol-Gel a las bacterias: La prueba 1 se basó en la prueba estándar de motilidad bacteriana para comprobar la capacidad de las bacterias de migrar a través de un medio de gel que comprendía las muestras de compuestos poliméricos sol-gel. Para ello, se inoculó la bacteria móvil *Escherichia coli* ATCC 25922 como una dilución 1/10 de un cultivo durante la noche en caldo de soja Tryptic (TSB) de modo que coincidiera con un estándar de turbidez de 0,5 McFarland. En un tubo de ensayo de polipropileno

de 15 ml, se añadió primero un tapón de gel de 10 ml que se estaba investigando, y después se añadió una capa de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC 0,5 g/L) encima de cada formulación de ensayo. TTC es un colorante sensible a las bacterias, que forma un precipitado rojo al reducirse en contacto con ellas.

- 5 La solución bacteriana cultivada durante la noche en TSB se añadió como tercera capa. Se añadió 1 ml de este inóculo a TTC y se incubó el tubo de ensayo durante 24 y 48 horas a 37°C.

- 10 La capacidad de las bacterias para migrar en la formulación compuesta de polímero sol-gel se evalúa por la profundidad del color rojo medida desde la parte superior a la inferior de la capa inferior de sol-gel en el tubo de ensayo. Se examinaron los tubos de ensayo para ver el color, que puede extenderse de arriba a abajo en función de la posible migración bacteriana. Se observó la aparición un color rojo inicial en la interfaz bacteria-gel debido a la penetración parcial en el medio (reducción de TTC). Como se presenta en la Tabla 11, las formulaciones compuestas de polímero sol-gel F1-F4 de la presente divulgación no permiten la penetración bacteriana mientras que el control BAM103 permitió la penetración bacteriana en 48h. La penetración bacteriana del control de agar rígido se observó sólo en la interfaz entre los geles F1-F4 y los tubos, donde se formó la fina capa de agua interfacial del agar.

- 15 Tabla 11. Resultados de la penetración bacteriana medida (n=3) en diferentes formulaciones de compuestos poliméricos sol-gel y controles.

Muestra	Profundidad de penetración de las bacterias (mm)	
	24 h de incubación	48 h de incubación
F1	0	0
F2	0	0
F3	0	0
F4	0	0
BAM 103	48 ± 2	100
BAM 103 sin inoculación	0	0
Agar rígido	0	0
*no se detectó ninguna penetración en el interior del gel, pero se comprobó que la penetración en la interfaz Agar-tubo de ensayo era de hasta 30 mm		

El experimento anterior demostró la capacidad de las formulaciones compuestas de polímeros sol-gel de ser impermeables a las bacterias móviles.

- 20 Prueba 2 - Evaluación de las propiedades de barrera del polímero compuesto sol-gel en un pezón de vaca de vidrio artificial: La prueba 2 se utilizó para evaluar la capacidad del compuesto polimérico sol-gel para evitar la migración bacteriana entre dos recipientes. Para este experimento, se llenó un primer recipiente de fondo 1 con caldo nutritivo y bacterias. Un segundo recipiente superior 2 se llenó con caldo nutritivo estéril. Los dos recipientes estaban unidos por una pezón de vidrio simulada (ø 26 mm, 6 cm de longitud, ø 2,6 mm) rellena con la formulación de polímero compuesto sol-gel F3, preparada como se ha descrito anteriormente. El experimento consistió en realizar un seguimiento de la presencia o ausencia de contaminación bacteriana que pudiera migrar hacia el recipiente 2 a lo largo del tiempo a 37°C.

Las cepas bacterianas presentadas en la Tabla 12 fueron seleccionadas para la prueba como un cultivo mixto que sería representativo de una fuente de mastitis bovina.

Tabla 12. Cepa seleccionada para el cultivo mixto en TSB como fuente representativa de la mastitis bovina.

Microorganismo	Respuesta	Movilidad
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crecimiento	Positivo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> U 3023	Crecimiento	Negativo

En este experimento, la adhesión entre el vidrio y el tapón compuesto de polímero sol-gel parecía ser crítica para el rendimiento de la barrera. La presencia de burbujas, la adhesión desigual o la transición sucesiva del compuesto de polímero sol-gel redujeron el rendimiento al disminuir la adhesión del vidrio-gel. Este fenómeno fue especialmente significativo al inicio del experimento, provocando una fusión directa de los dos recipientes. El seguimiento del fallo de adhesión del gel de vidrio se realizó mediante la adición de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC 0,5g/L), un colorante sensible a las bacterias, que forma un precipitado rojo al reducirse en contacto con las bacterias.

Se evaluó el estudio de la capacidad del F3 marcado con TTC para mantener una propiedad de barrera bacteriana a lo largo del tiempo. En los días 0, 2, 5, 6, 9, 12 y 18, se evaluó la contaminación bacteriana en los compartimentos de medios estériles y contaminados. Las observaciones se registraron en los días 0, 3, 6, 14 y 15. La sustitución del medio de cultivo y la inoculación fresca se añadieron al compartimento contaminado los días 3, 6, 9 y 13. En el día 12, los signos de fracaso de la adhesión parcial comenzaron a mostrar una reducción de la adhesión de vidrio-gel. En los días 12 y 17, se observó un fallo de adhesión en la interfaz de la teta de vaca de vidrio con la muestra de compuesto de polímero sol-gel F1-F4. En el día 15, se detectó visualmente la contaminación en el recipiente superior 2 por encima del tapón de gel (es decir, la difusión del colorante TTC mostró un color rojo en el compartimento inicialmente no contaminado cuando el tapón bien adherido en el día 0 perdió la adherencia al vidrio). En el día 17, el tapón dejó de adherirse completamente al vidrio. En el día 18, la cuantificación de la contaminación bacteriana mediante el recuento en placa demostró el incumplimiento de la esterilidad, ya que la pérdida de adherencia al vidrio permitió que las bacterias migraran a través de la interfaz gel-vidrio, lo que provocó la contaminación del recipiente 2.

Conociendo el alto riesgo de ruptura de la adhesión del sol-gel al vidrio, esta prueba es por tanto muy desfavorable para el rendimiento del sol-gel. Hasta el fracaso de la adhesión, el rendimiento real registrado en varias pruebas entre 1 y 15 días de experimentos y combinado en la Tabla 13 muestra que F3 evitó la contaminación bacteriana. El control de vaselina/cera de parafina 1:5 se basa en un tapón hidrofóbico que se sabe que es totalmente impermeable a las bacterias, pero el control también experimentó problemas de adhesión con el vidrio similares a los observados para el compuesto sol-gel. Los resultados muestran un rendimiento similar para este control impermeable y las formulaciones de polímeros sol-gel de la divulgación. El rendimiento obtenido para F3, entre 8 y 15 días durante la capacidad de mantener la adherencia al vidrio y actuar como barrera contra las bacterias es significativamente superior a los observados para el control permeable BAM103 que no puede evitar la contaminación bacteriana después de 24 horas. Por lo tanto, la prueba 2 proporciona pruebas de que las formulaciones compuestas de sol-gel de la divulgación poseían la capacidad de ser una barrera eficaz contra la migración bacteriana.

Tabla 13. Resumen de las propiedades de barrera de los diferentes sol-gel y del control, basado en 15 días de experimentos de incubación.

Muestra	Días antes de que se detecte la contaminación hasta 15	Comentario
F1	13,5 ± 5	n=3. Señales claras de fallo de adhesión del vidrio-gel antes de la contaminación.
F2	8,5 ± 1	n=2. Señales claras de fallo de adhesión del vidrio-gel antes de la contaminación.
F3	13 ± 5,5	n=3. Señales claras de fallo de adhesión del vidrio-gel antes de la contaminación.
F4	9	n=1
BAM 103	1	n=3
Vaselina/Cera de parafina 1:5	13 ± 7	n=3. Señales claras de fallo de adhesión del vidrio-gel antes de la contaminación.
Orbeseal	15+	n=1

En resumen, la Prueba 1 demostró la capacidad de las formulaciones compuestas de polímero sol-gel para impedir la migración bacteriana en 48 horas en comparación con un gel de control BAM103 que permitía la migración de las bacterias móviles. Los resultados de las diferentes formulaciones de compuestos poliméricos sol-gel mostraron una total impermeabilidad a las bacterias, impidiendo así la penetración bacteriana en el gel. En la Prueba 2, se demostró que la propiedad de barrera en el pezón de vaca de vidrio artificial contra la migración bacteriana duraba mientras se mantuviera la adhesión entre el vidrio (sustrato simulado) y el tapón de sol-gel. Se demostró que el rendimiento es similar al control impermeable de parafina/jalea de petróleo y significativamente mayor que el control permeable de BAM103. Dado que se observó una retención a largo plazo en los estudios *in vivo* descritos en los Ejemplos 7 y 8, se puede apreciar que las formulaciones de polímero compuesto sol-gel de la divulgación actuarán como una barrera eficaz de sellado de pezones contra la migración bacteriana tanto móvil como inmóvil durante el período seco de las vacas lecheras hasta que los selladores se eliminen físicamente.

Ejemplo 11.

Evaluación del impacto del agente de carga inorgánico en la reología del sol-gel

La formulación de polímero compuesto sol-gel F2 (1,5L) se preparó como se describió anteriormente en el Ejemplo 1 y luego se mezcló con relleno (dióxido de silicio (SiO₂) o celulosa nanocristalina (NCC)) en varias concentraciones (1 % en peso, 5 % en peso y 20 % en peso). Se evaluó el impacto del relleno en la densidad y las propiedades reológicas de la formulación de polímero compuesto sol-gel. Los resultados se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Comparación de las propiedades reológicas de la formulación de polímeros sol-gel con y sin agente de carga.

Agente de carga	T (°C)	G' (Pa)	G'' (Pa)	tan δ	Densidad (g/ml)
Ninguno	25	387,7	74,8	0,193	0,96
	37	974,5	68,4	0,071	
SiO2 1 %	25	194,3	66,0	0,340	1,03
	37	1067,4	65,9	0,062	
SiO2 5 %	25	235,4	70,2	0,298	1,11
	37	1134,4	72,8	0,065	
SiO2 20 %	25	557,7	140,9	0,253	1,09
	37	2089,0	153,6	0,074	
NCC 1%	25	196,4	66,2	0,337	1,08
	37	1067,8	66,6	0,063	
NCC 5%	25	312,0	99,8	0,320	1,08
	37	1712,5	122,7	0,072	
NCC 20%	25	-	-	-	1,18
	37	-	-	-	

Los resultados muestran que el módulo de almacenamiento (G') aumentó al aumentar la cantidad de relleno en la formulación de polímero compuesto sol-gel, lo que indica que cuanto mayor sea el contenido sólido en la formulación, más rígido será el gel a 37°C. Con 1 y 5 % en peso de SiO₂, el módulo de pérdida se mantuvo ligeramente igual en comparación con la formulación original ("Ninguno"). La misma observación puede hacerse para NCC, excepto para el 5 % en peso, donde el G'' aumentó a ambas temperaturas en comparación con el material principal. En cuanto a la tan δ a 25°C, aumentó al 1 % en peso de SiO₂, lo que indica que el gel fluye mejor a temperatura ambiente en comparación con el lote original ("Ninguno"). A continuación, disminuye con el aumento del contenido de relleno por las mismas razones descritas anteriormente en relación con el contenido de sólidos. El mismo comportamiento se observó para NCC. No se observó claramente ninguna transición de gel con 20% en peso de NCC. Por último, el lote original tenía una densidad inferior (0,96 g/ml) a la del agua debido a la presencia de burbujas de aire dentro del sol-gel. La adición de relleno hasta el 20 % en peso a la formulación sol-gel permitió que el producto alcanzara una densidad de aproximadamente 1,10 g/ml dentro del margen de error de la formulación F2 libre de burbujas de aire. En resumen, los resultados muestran que la adición del agente de carga inorgánico de dióxido de silicio permite un aumento significativo de G' (hasta aproximadamente el doble) tanto para el estado de sol como de gel, sin afectar a la transición de sol a gel y al adelgazamiento por cizallamiento de la formulación.

Ejemplo 12.

Evaluación del efecto del grado de desacetilación del quitosano (DDA) en las propiedades del sol-gel

La formulación de polímero compuesto sol-gel F2 se preparó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, utilizando quitosano con diferentes grados de desacetilación (DDA%). Los resultados se detallan en la Tabla 15.

Cuando el DDA% de quitosano en la formulación F2 cayó por debajo del 76%, la formulación empezó a perder sus características de sol-gel. En particular, los valores tanδ observados a 25 °C y 37 °C, y especialmente la relación tanδ (tanδ a 25 °C/tanδ a 37 °C), proporcionan una indicación y una escala de la transición sol-gel. Al pasar a un porcentaje

bajo de quitosano con DDA (del 90% al 75,5% de DDA), se observó una notable disminución del rendimiento de la F2, en la que la relación $\tan\delta$ disminuyó de 3,3-6,4 a 1,2, como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados comparativos de la variación del DDA% entre el procedimiento a escala de laboratorio y a escala de 2L.

Escala	DDA%	$\tan\delta$ a 25 °C	$\tan\delta$ a 37 °C	relación $\tan\delta$
50 g	90,0	0,275	0,043	6,4
1,25 L	90,0	0,227	0,047	4,8
1,25 L	90,0	0,253	0,076	3,3
50 g	75,5	0,140	0,113	1,2
1,25 L	75,5	0,177	0,144	1,2
*el DDA% se determinó utilizando un lote diferente de la misma especificación de quitosano de grado reactivo.				

Para explicar la disminución del rendimiento del sol-gel, se ideó un Diseño de Experimento (DOE) de dos factores. Se consideraron dos parámetros del quitosano, a saber, el grado de desacetilación (% DDA) y el peso molecular (MW).

Los factores de salida más significativos y sus valores esperados para una formulación F2 óptima, manteniendo valores $\tan\delta$ aceptables a 37 °C, son los siguientes: Viscosidad compleja a 25 °C; $\tan\delta$ a 25 °C; y tensión de oscilación de la gelificación.

La viscosidad compleja debe ser baja y los valores de $\tan\delta$ a 25 °C deben ser altos para que la formulación F2 muestre el carácter más "líquido" posible; se espera que esto maximice la procesabilidad a escala de la formulación. La tensión de oscilación de la gelificación deberá ser baja para aumentar la "administración en jeringa" del producto, en última instancia para la administración repetida del producto mediante jeringa por parte del usuario final. Los resultados se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16. Resumen de los resultados del diseño experimental de dos factores (DOE).

MW de quitosano (kDa)	DDA% de quitosano	$\tan\delta$ a 25 °C	$\tan\delta$ a 37 °C	relación $\tan\delta$	Viscosidad compleja (Pa-s)	Tensión de oscilación (Pa)	Inicio de temperatura de gelificación (°C)
84527	76,77%	0,27	0,07	3,9	256	218	28,8
55381	94,3%	0,37	0,07	5,3	140	150	31,0
467690	77,36%	0,27	0,08	3,4	375	217	34,0
404580	97,60%	0,60	0,07	8,6	107	119	30,1

Los resultados mostrados en la Tabla 16 indican que el DDA% fue el factor más significativo en la disminución de la viscosidad del complejo, el aumento de $\tan\delta$ a 25 °C y la disminución de la administración en jeringa de la formulación. Los resultados de este DOE también sugirieron que el quitosano de alto MW/alto % DDA (404580 kDa, 97,6% DDA) produjo una formulación óptima en términos de estas propiedades. La formulación resultante fue la menos viscosa (viscosidad compleja), la más viscosa de naturaleza líquida -en contraposición a la de un gel- ($\tan\delta$ a 25 °C) y la más administrable en jeringa (tensión de oscilación) de todas las muestras examinadas, al tiempo que mantenía un gel adecuadamente viscoso a 37 °C ($\tan\delta$ a 37 °C). Los resultados sugieren que, en algunas realizaciones, se requiere que el quitosano tenga un DDA% de aproximadamente 77% o más para obtener un sol-gel funcional.

REIVINDICACIONES

1. Un producto para uso en la prevención o el tratamiento de la mastitis en un mamífero hembra no humano que tiene un período de lactancia, comprendiendo el producto una cantidad eficaz de un compuesto polimérico sol-gel que comprende quitosano, un polímero hidrófilo que comprende metilcelulosa, un elemento termogelificante que comprende una sal seleccionada del grupo que consiste en pirofosfato de sodio tetrabásico, fosfato de potasio dibásico trihidrato, y sus mezclas, y un medio ácido a base de agua, para su administración a un pezón, un canal del pezón o una cisterna del pezón del animal.
2. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio es ácido acético acuoso y/o el quitosano está acilado.
3. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto polimérico sol-gel comprende además un agente de refuerzo.
4. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el agente de refuerzo se selecciona del grupo que consiste en celulosa nanocristalina, una arcilla inorgánica, una arcilla orgánica, negro de carbón, sílice pirógena, grafeno, grafito, un almidón nanocristalino, una nanoarcilla, grafeno, un nanotubo de carbono, una nanoarcilla orgánica, una organoarcilla, montmorillonita, bentonita, caolinita, hectorita, halloysita y fosfato de calcio.
5. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto polimérico sol-gel comprende además uno o más agentes antimicrobianos.
6. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente antimicrobiano se selecciona del grupo que consiste en un macrólido, una cefalosporina, un antibiótico lincosamínido, una fluoroquinolona, una tetraciclina, una penicilina, una espectinomycinina, una sulfonamida, un cloranfenicol, un análogo sintético fluorado del tiamfenicol y una de sus mezclas.
7. El producto de uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el agente antimicrobiano es una cefalosporina y la cefalosporina es clorhidrato de ceftiofur.
8. El producto para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el compuesto polimérico sol-gel forma un sólido fuerte en respuesta a una temperatura de aproximadamente 37°C.
9. El producto de uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el medio ácido de base acuosa comprende ácido acético acuoso 0,1 M.
10. El producto de uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el compuesto comprende dióxido de silicio (SiO₂).
11. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el quitosano tiene un grado de desacetilación (DDA%) de al menos 77%.
12. El producto para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el mamífero es un animal de ganado lácteo.
13. Un sistema para formar una barrera física en el canal del pezón o en la cisterna de un mamífero hembra no humano que tiene un período de lactancia para la prevención o el tratamiento de un trastorno mamario, en el que el sistema comprende un dispositivo de suministro que contiene un producto que comprende un compuesto polimérico sol-gel como se define para uso en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

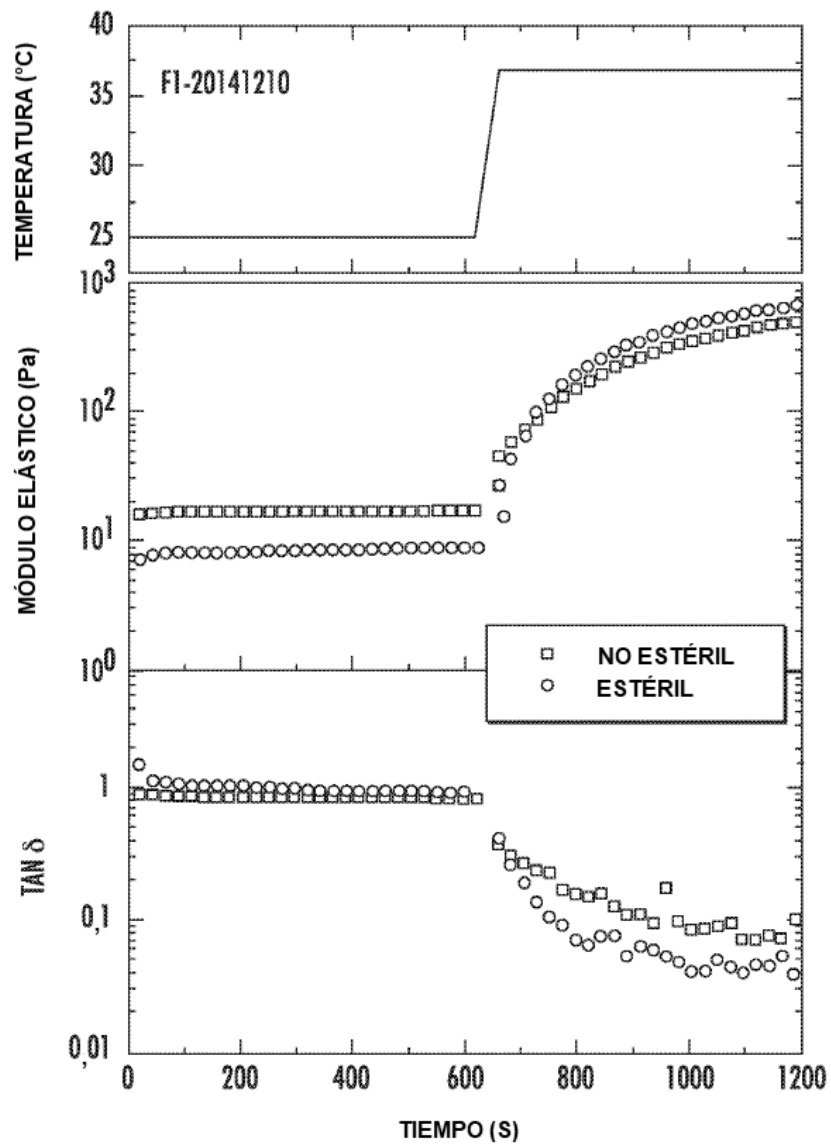


FIG. 1A

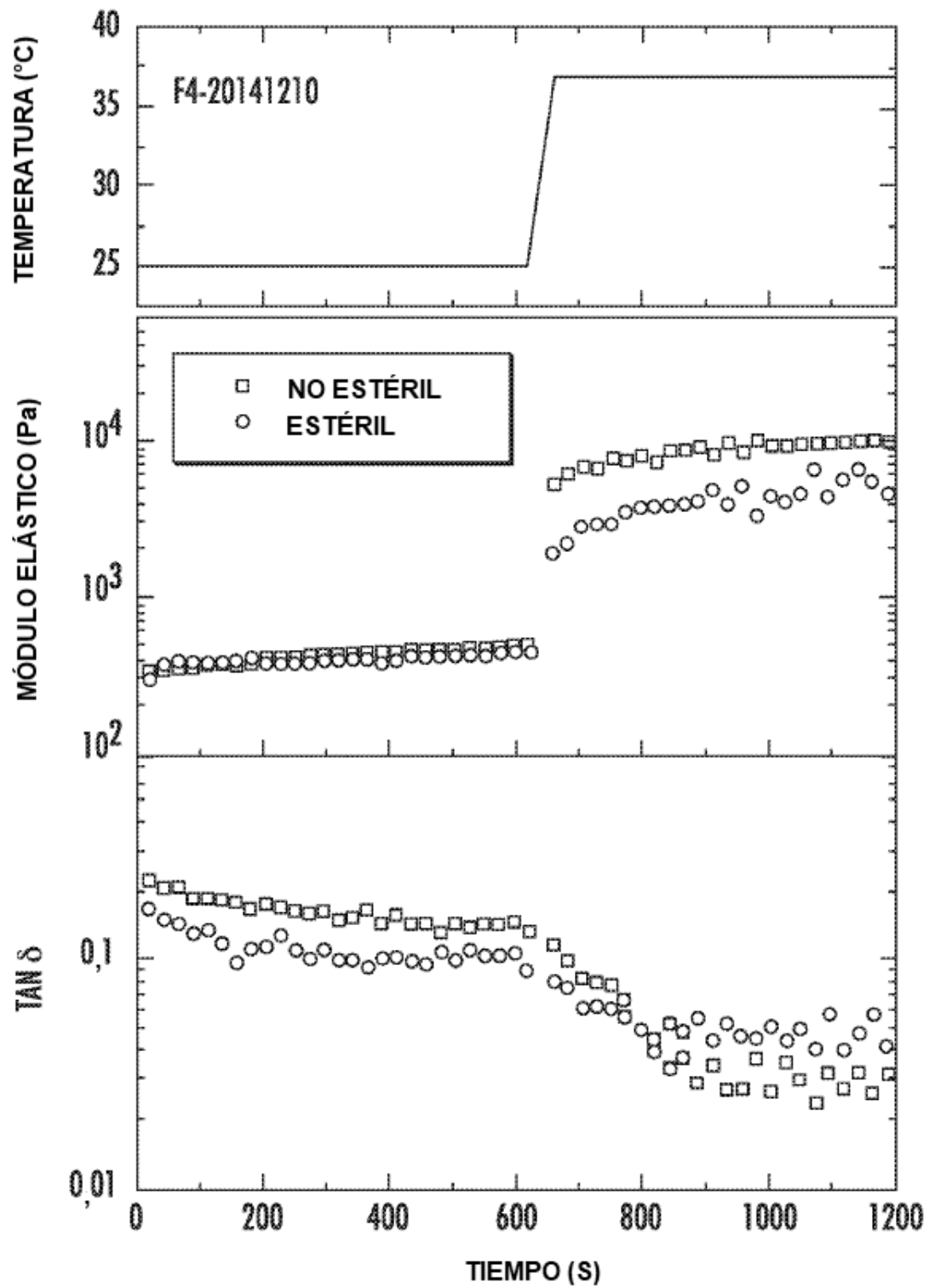
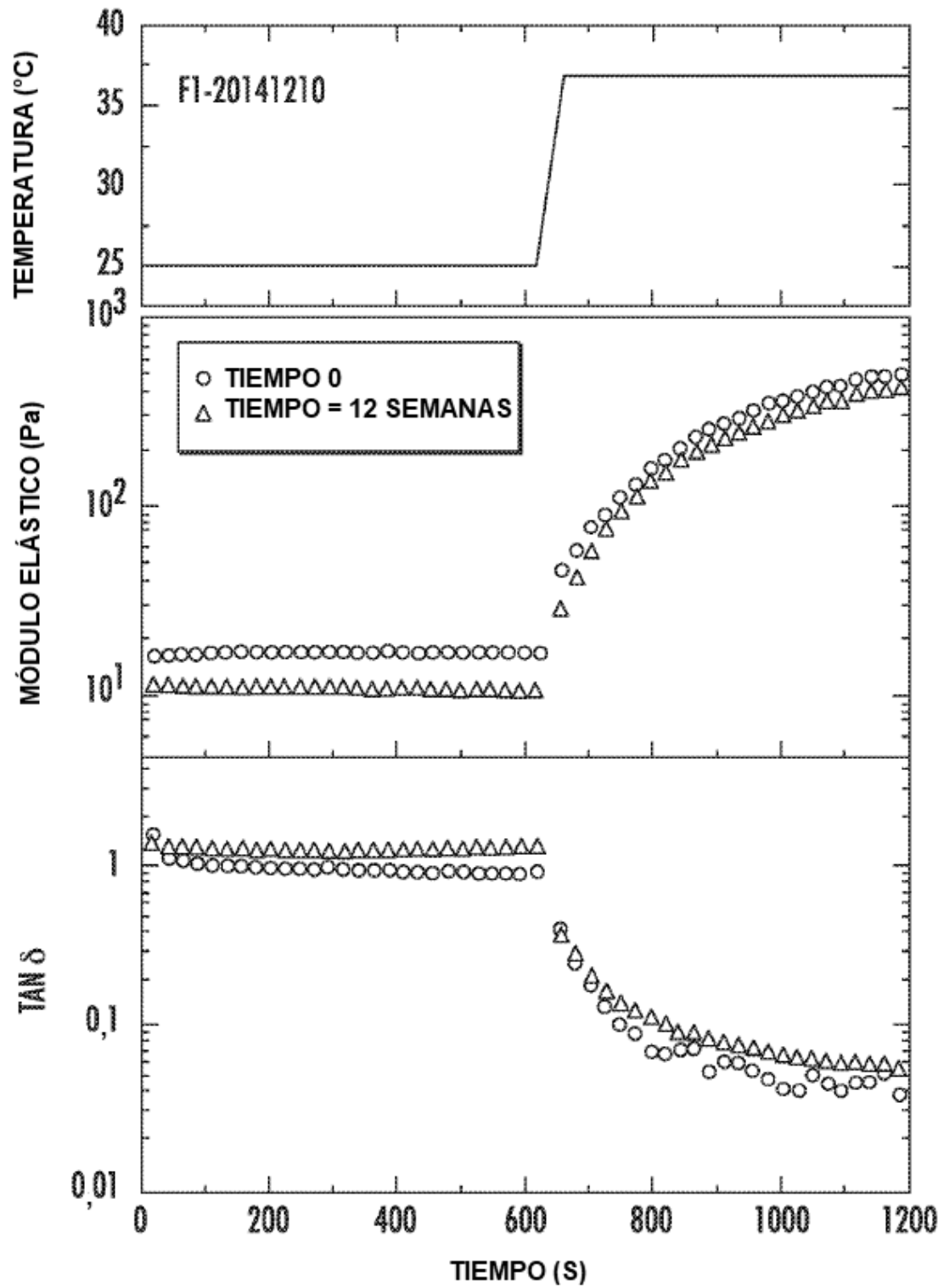
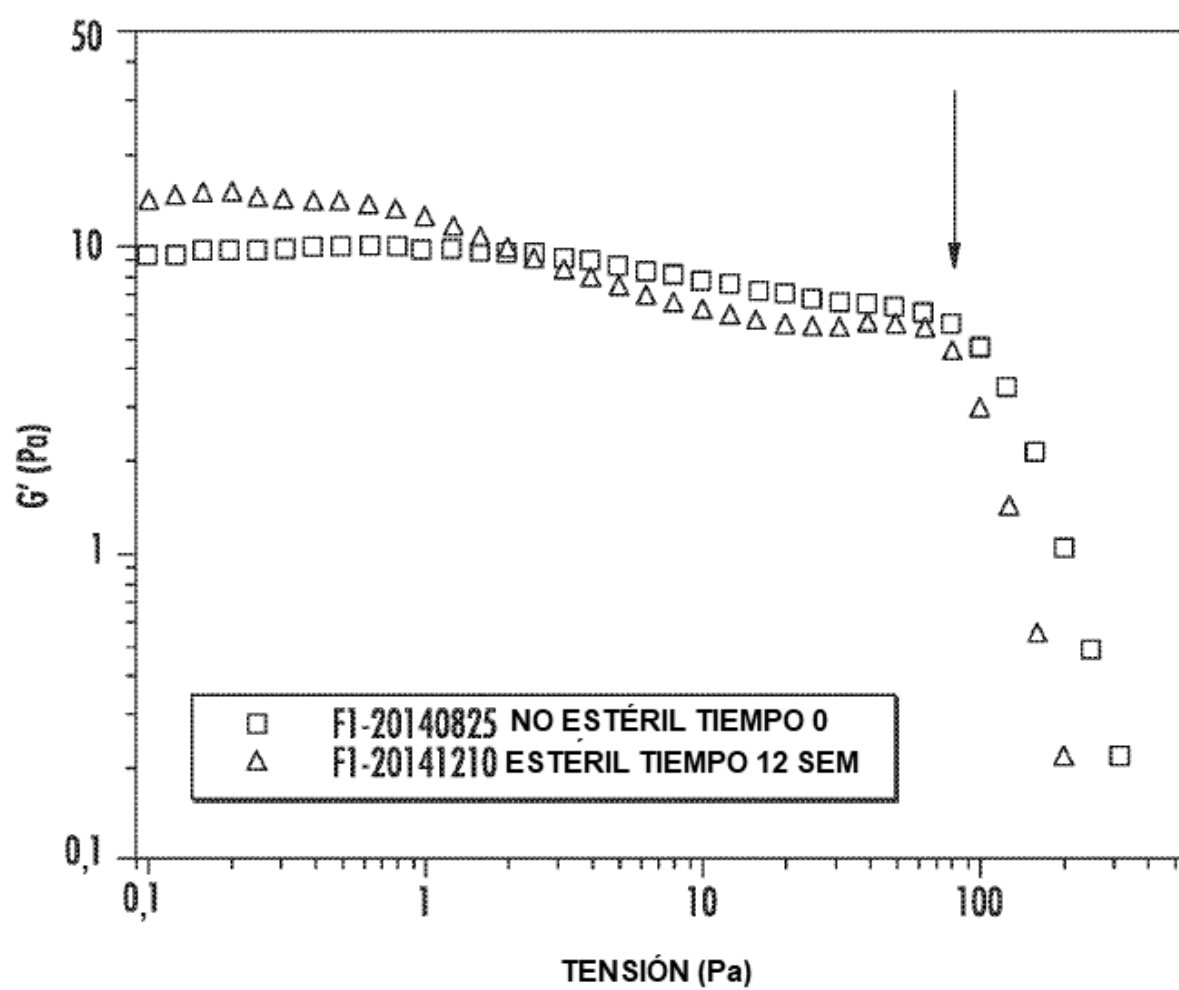
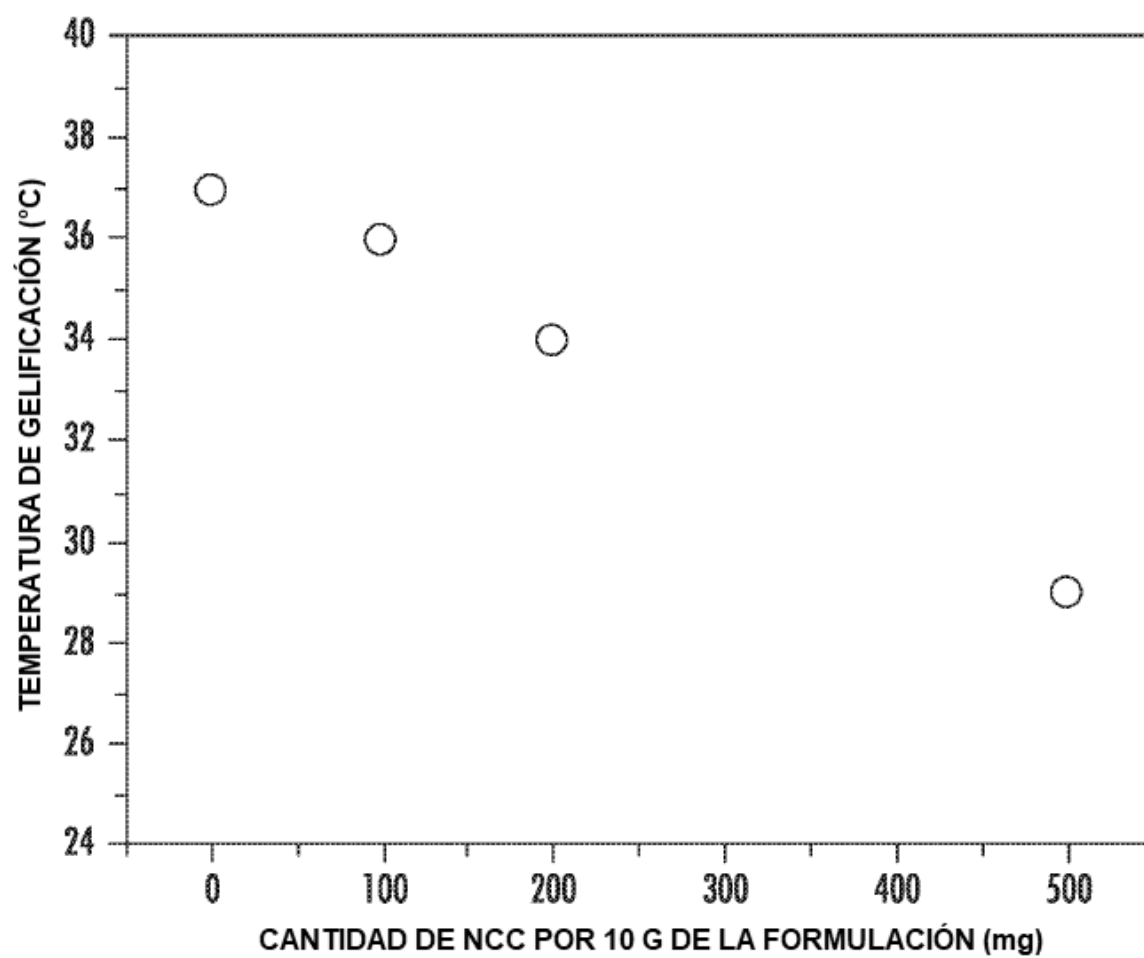
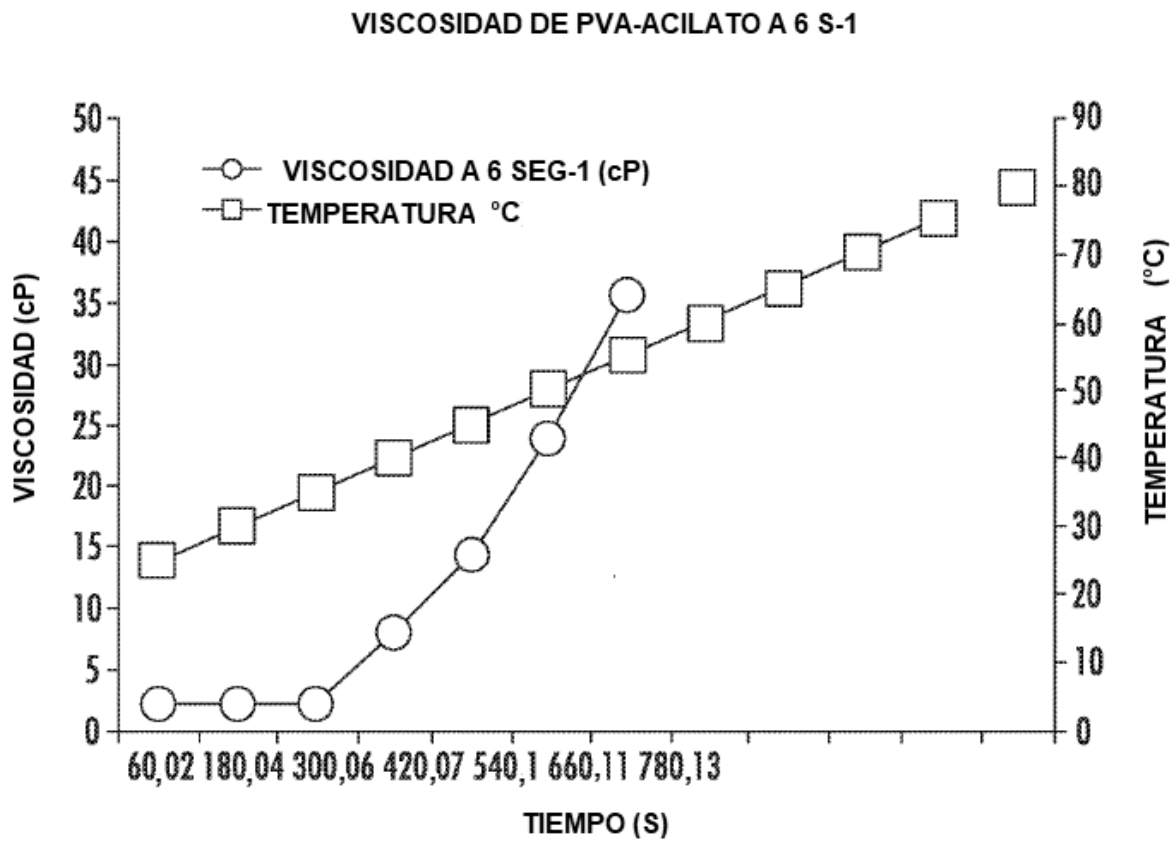


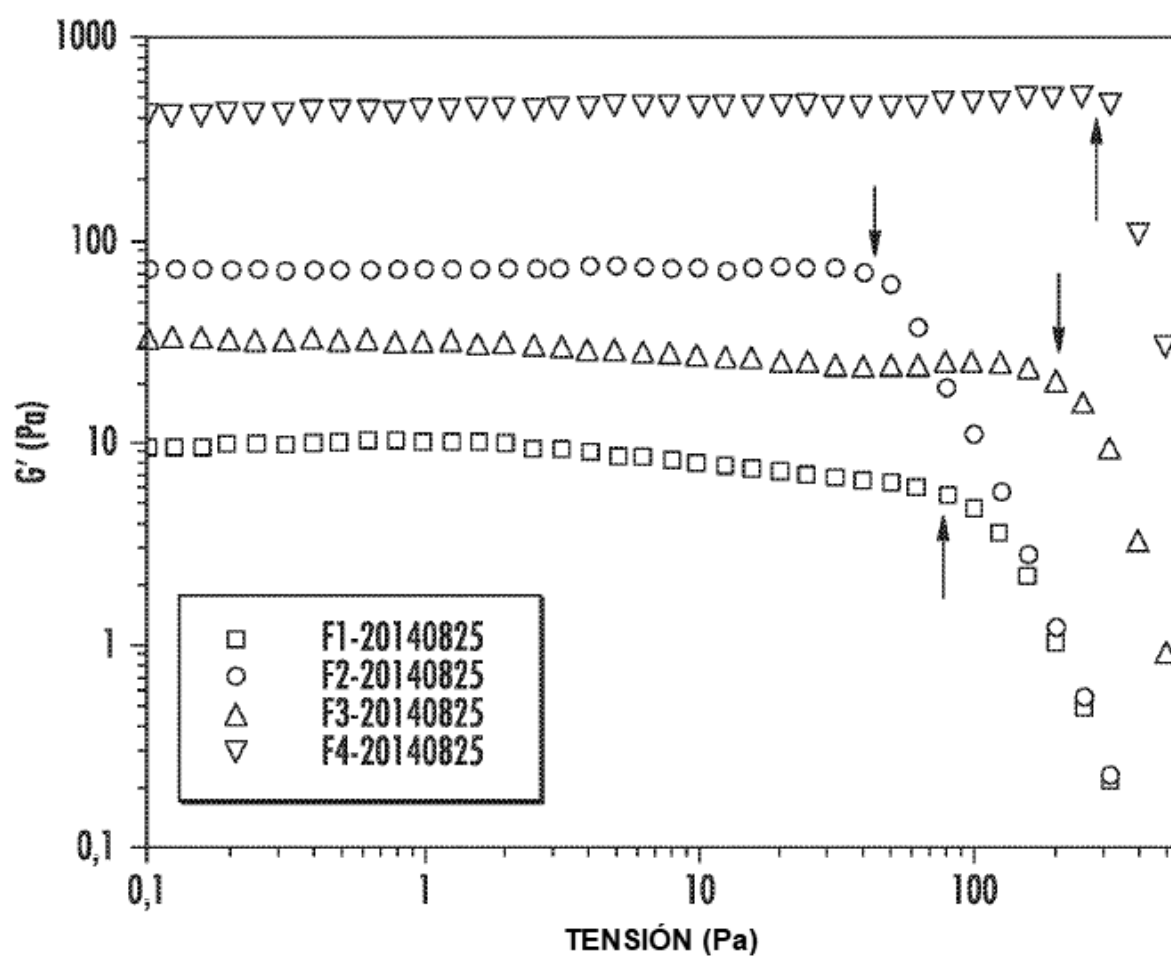
FIG. 1B

**FIG. 2**

**FIG. 3**

**FIG. 4**

**FIG. 5**

**FIG. 6**

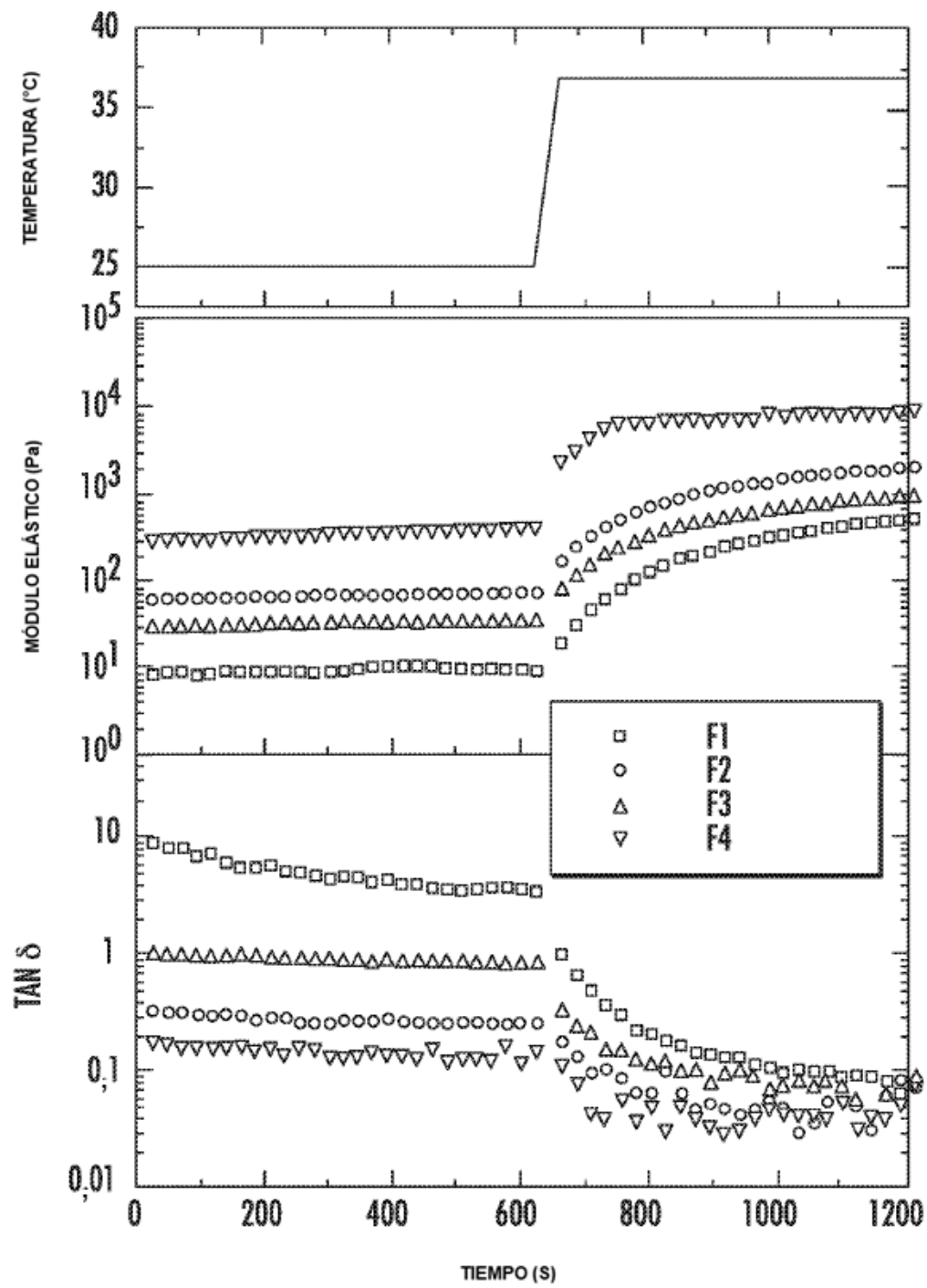
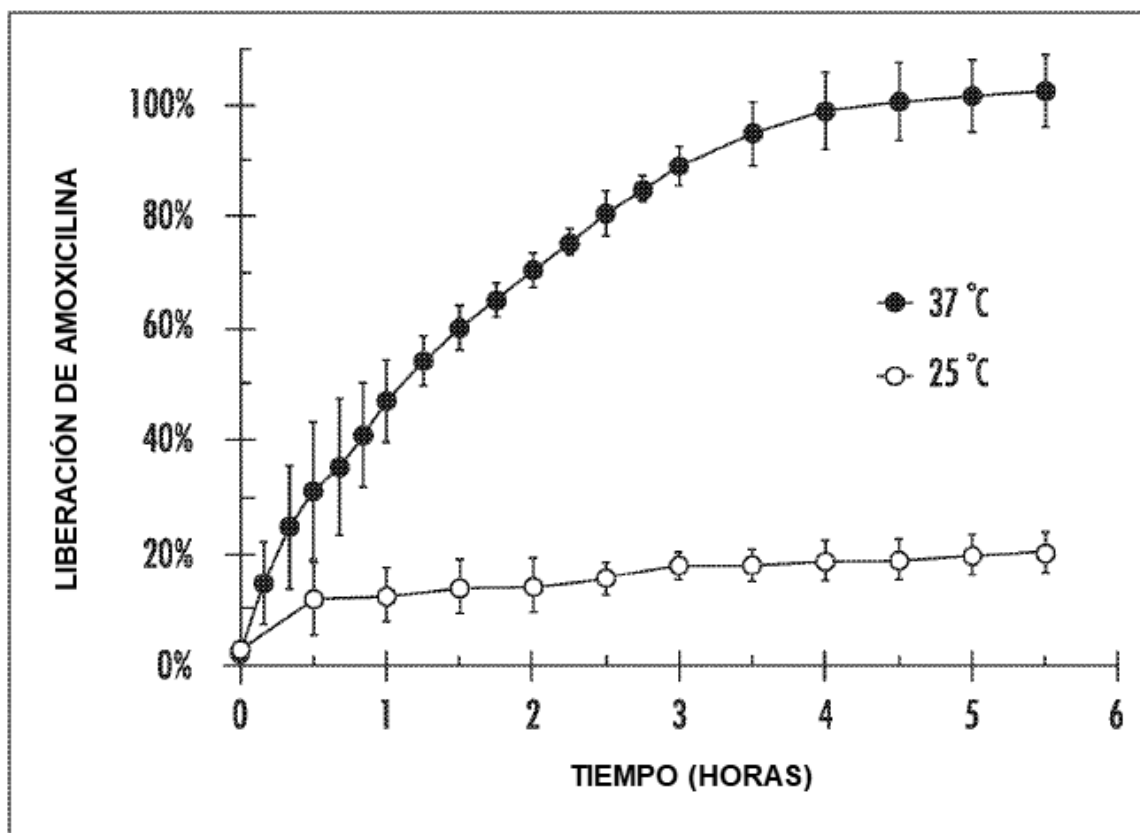


FIG. 7

**FIG. 8**