

---

**ESTUDIO DE PREFORMULACIÓN PARA EL DESARROLLO  
DE UN GEL A BASE DE POLÍMEROS  
CON CAPACIDAD MUCOADHESIVA PARA ENSAYOS  
DE ALELOPATÍA EN INVERTEBRADOS MARINOS**

**Preformulation Study For The Development  
Of A Polymer-Based Gel With Mucoadhesive Properties  
For Its Use In Allelopathy Assays  
In Marine Invertebrates**

JENNY PATRICIA ANDRADE F.<sup>1</sup>, Química Farmacéutica;  
CLAUDIA MARCELA GÓMEZ A.<sup>1</sup>, Química farmacéutica;  
HELBER DE J. BARBOSA B.<sup>1</sup>, Químico Farmacéutico, M.Sc.;  
LEONARDO CASTELLANOS H.<sup>2</sup>, Químico, Ph. D.; OSCAR E.  
OSORNO R.<sup>2</sup>, Químico, M.Sc.

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, edificio 450. Bogotá, Colombia. hdbarbosab@unal.edu.co.

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.

Presentado 20 de mayo de 2009, aceptado 11 de agosto de 2009, correcciones 17 de diciembre de 2009.

**RESUMEN**

La investigación se desarrolló con el fin de implementar una metodología que permitiera la realización de ensayos de interacciones alelopáticas entre corales y esponjas, minimizando la interacción física provocada por el uso de dispositivos que producen roce y efecto abrasivo sobre los pólipos del coral. Se llevó a cabo un estudio de preformulación utilizando polímeros con características mucoadhesivas sobre mucus que recubre los pólipos de coral, con el fin de obtener un gel, incorporando en las formulaciones un extracto de la esponja *Cliona delitrix*. Se caracterizaron propiedades como extensibilidad y adherencia, así como la capacidad bioadhesiva de las formulaciones propuestas, considerando su comportamiento reológico. Estas mostraron una buena estabilidad física frente a las condiciones del medio marino tanto *in vitro* como *in situ*. De igual manera, se diseñó un dispositivo que facilitó la aplicación del gel sobre la superficie de los corales por parte de los buzos en el arrecife coralino. Finalmente se estudió el comportamiento de liberación al medio acuoso simulado del gel con el extracto de la esponja objeto de estudio.

**Palabras clave:** polímeros mucoadhesivos, mucoadhesión, preformulación, gel, ecología química marina, alelopatía, esponja, coral.

## ABSTRACT

This study was carried out with the purpose of implementing a methodology to assess allelopathic interactions assays between corals and reef sponges reducing the physical interaction caused by the use of devices that involve abrasion and harm over the coral polyps. A preformulation study using polymers with mucoadhesive on the mucus that cover the coral polyps, with the purpose of develop a gel, incorporating an extract from *Cliona delitrix* into the formulations, was carried out a. The formulations obtaniend were characterized by properties such as extensibility, adherence and mucoadhesive capacity. These formulations showed great physical stability under prevalent marine conditions both *in vitro* and *in situ*. Additionally, a device was designed to facilitate smearing of the gel over the coral surfaces by divers in the coral reefs. Finally, the releasing behavior of the gel with the sponge's extract into the sea water conditions was studied.

**Key words:** mucoadhesive polymers, mucoadhesion, preformulation, gel, marine chemical ecology, allelopathy, sponges, corals.

## INTRODUCCIÓN

Las conformaciones arrecifales masivas que se ven hoy en día, son el producto de la actividad de los corales durante miles de años, creando ambientes diversos donde proliferan organismos como esponjas, algas, moluscos y peces entre otros (Bernkop-Schnurch y Steiniger, 2000). La gran cantidad de organismos marinos se traduce en una alta diversidad química y han proporcionado a la química de productos naturales una fuente rica en metabolitos secundarios; inclusive parecen ser más promisorios desde el punto de vista biomédico, a pesar de que actualmente hay muy pocos medicamentos en el mercado con principios activos de origen marino (Henrikson y Pawlik, 1995; Chaves, 2003).

La ecología química estudia interacciones de ataque, defensa y de respuesta comportamental de organismos mediadas químicamente, siendo más estudiadas hasta el momento aquellas que se dan en el medio terrestre en comparación a las del medio marino. Dichas interacciones pueden dividirse en dos grupos, las relaciones intraespecíficas (entre organismos de la misma especie) e interespecíficas o aleloquímicas (organismos de especies diferentes). Las interacciones aleloquímicas, involucran compuestos químicos, por medio de los cuales organismos de una especie afectan crecimiento, salud y comportamiento de organismos de otra especie (excluyendo sustancias usadas como alimento por la segunda especie). La interacción se denomina alelopática si se inhibe alguna función vital de un organismo por el otro. A las sustancias químicas que dan una ventaja adaptativa al organismo productor se les ha denominado alomonas y a las que dan ventaja al receptor, kairomonas (Carte, 1996; [globalcoral.org/coral\\_reefs.htm](http://globalcoral.org/coral_reefs.htm), 2005; Hagerstrom, 2003). En los arrecifes coralinos habita una amplia variedad de organismos que viven cerca unos de otros, interactuando, compitiendo por espacio, luz y alimento; esta competencia es un factor limitante, por lo que su éxito evolutivo implica que adapten mecanismos competitivos exitosos; Por ejemplo, los corales utilizan mecanismos como crecimiento rápido o digestión extracelular por la extrusión de filamentos mesentéricos, mientras que las esponjas por su parte, emplean mecanismos que involucran la alelopatía (Rodríguez et al.,

2000; Gerald *et al.*, 1986). Como en el caso de la esponja *Plakortis halichondroides*, que es capaz de colonizar y matar al coral *Agaricia lamacki*. La esponja mata por contacto directo e indirecto al coral y se sugiere que es debido a metabolitos químicamente activos producidos por la esponja (Rodríguez *et al.*, 2000). En trabajos desarrollados por Thacker *et al.*, 1998 y Pawlik, 1993, fue estudiado un metabolito producido por la esponja *Dysidea* sp. y su efecto sobre la esponja *Cacospongia* sp., encontrándose que tiene un efecto negativo marcado sobre la esponja. No hallándose más ejemplos en la literatura donde se haya identificado el metabolito responsable de la interacción alelopática.

En el mar caribe, las esponjas del género *Cliona* han venido monopolizando el sustrato arrecifal en algunas zonas coralinas durante las últimas tres décadas, la esponja al encontrarse con el tejido coralino vivo, lo socava y éste muere, con la consecuente reducción en la biodiversidad y el encanto de las zonas coralinas donde está sucediendo este fenómeno, por ejemplo en los arrecifes coralinos de San Andrés, Providencia y las islas del Rosario. El deterioro arrecifal podría tener graves consecuencias, tanto a nivel ambiental como económico, dado el importante papel que juegan los arrecifes y su fauna asociada en industrias tales como el turismo y la pesca, su importancia en la protección de las costas (contra el daño por erosiones, tormentas e inundaciones) y en el descubrimiento de nuevos compuestos con potencial actividad farmacológica (Porter y Targett, 1988; Kafedjiiski y Franzens, 2004).

En el grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia” se han llevado a cabo ensayos de ecología química para estudiar interacciones alelopáticas entre corales y esponjas, en los cuales el extracto crudo de las esponjas es incorporado dentro de geles firmes a base de Phytigel®, en una concentración volumétricamente equivalente a la que se encuentra en el organismo vivo. Los geles son depositados sobre cabezas de coral vivas para determinar si existe una zona de blanqueamiento en el coral o un efecto deletéreo (Pawlik *et al.*, 2007). Sin embargo, un problema que se presenta en estos ensayos es que no se puede separar en su totalidad los efectos químicos de los metabólicos dispersados en el gel, de los efectos físicos causados por el rozamiento o abrasión leve del gel contra la superficie del coral. Esto nos ha llevado a plantear una alternativa para contribuir a la solución del problema, haciendo estudios de preformulación para desarrollar geles con capacidad mucoadhesiva sobre la capa de mucus que recubre a los corales, de tal forma que con su aplicación se pueda minimizar el efecto físico y poder comprobar si compuestos químicos provenientes de las esponjas que son incorporados en los geles tienen un efecto alelopático sobre los corales usados en los ensayos. Esta investigación es un estudio pionero, ya que en la literatura científica no existe mayor información sobre estudios de alelopatía en organismos marinos.

Dentro del ámbito farmacéutico es muy común utilizar dispersiones de celulosas y otros polímeros naturales cuyo comportamiento es no newtoniano y específicamente de flujo seudoplástico, en donde la curva de consistencia se inicia en el origen o cerca de él, con ningún tramo recto y la curva ascendente y descendente coinciden. La forma farmacéutica desarrollada fue un gel a base de polímeros naturales que presentan flujo seudo-plástico, el cual puede definirse como un sistema coloidal compuesto por dos fases continuas interpenetradas, una sólida compuesta de partículas altamente asimétricas con una gran área superficial y otra líquida. La parte sólida está constituida generalmente por materiales poliméricos, estos materiales presentan cadenas largas y flexibles que se hinchan

en contacto con el medio formando redes tridimensionales. Para el caso de hidrogeles el hinchamiento es provocado por la entrada de agua en la estructura, la cual es debida al carácter hidrófilo de las cadenas por la presencia de grupos polares como -OH, -COOH, -CONHR y que da como resultado materiales blandos y elásticos con gran capacidad para retener agua en su interior sin disolverse. Los materiales poliméricos al colocarse en agua forman redes que pueden unirse mediante atracciones tales como fuerzas de van Der Waals, y puentes de hidrógeno denominándose geles físicos, o mediante enlaces fuertes como los covalentes llamándose entonces geles químicos. Existen entonces mallas entrecruzadas las cuales presentan nudos covalentes y redes no entrecruzadas con uniones de tipo físico no permanentes. Las redes entrecruzadas son estables, debido a que la entrada de agua llega hasta tal punto que no puede separar más las cadenas, lo cual se conoce como grado máximo de hinchamiento, mientras que las redes no entrecruzadas se hinchan sin límite y llegan a disolverse por la entrada progresiva de agua (Aerts, 1999; López-Victoria y Zea, 2005).

Los geles pueden sufrir fenómenos como el de sinéresis que se manifiesta como la salida de solvente a partir del gel por la contracción del mismo y es debida a cristalización o a la formación de nuevos puntos de contacto entre los segmentos del polímero, así mismo son afectados por la adición de sales, provocando una separación de fases llamada *salting-out* fenómeno que se da con mayor facilidad sobre polielectrolitos (Roldo *et al.*, 2004).

Dentro de los polímeros hidrófilos existen algunos que presentan propiedades de adherencia a superficies mucosas, es decir que son muco-adhesivos. La capacidad de adherencia que presentan se debe a la afinidad física y/o química que tienen por los componentes del mucus, principalmente por las mucinas. Las alternativas frente a materiales poliméricos mucoadhesivos se pueden clasificar en dos grupos, de acuerdo al mecanismo de mucoadhesión que estos tienen. El primero de ellos lo constituyen los polímeros adhesivos que forman enlaces del tipo puentes de hidrógeno e interacciones iónicas con la capa de mucus, los otros se refieren a aquellos materiales que forman enlaces covalentes con la capa de mucus y los cuales pueden tener también interacciones débiles, estos materiales muestran mejores propiedades mucoadhesivas.

Para los materiales pertenecientes al primer grupo existen características importantes que modifican su capacidad adhesiva como lo es la estructura química, especialmente el tipo de grupos funcionales del polímero, ya que dependiendo del pH al que se encuentren las moléculas de mucina, estas pueden estar en forma ionizada o no ionizada y de esta manera se establecerán interacciones de tipo atractivo o repulsivo con el polímero, presentándose diferentes resultados de adhesión. Polímeros con grupos hidroxilo, carboxilo, amino y sulfatos, suelen presentar buenos resultados de adherencia (Peppas y Sahlin, 1996).

En el segundo grupo se encuentran materiales poliméricos con la capacidad de formar enlaces covalentes con las moléculas de mucina, dentro de estos se encuentran los denominados tiómeros, que son polímeros que contienen dentro de su estructura grupos tiol (-SH), los cuales al entrar en contacto con los subdominios ricos en cisteína forman enlaces disulfuro, generando así una unión tipo covalente entre el polímero y la capa de mucus (Peppas y Huang, 2004; Hoegh-Guldberg, 1999; Scheuer, 1981).

La flexibilidad, la forma estructural y el peso molecular de las cadenas son parámetros relevantes al momento de la interpenetración de estas y la formación del entrampado, por esto se considera que las moléculas deben ser flexibles, lineales o con pocas ra-

mificaciones y no pueden ser demasiado largas porque van a limitar la difusión. La concentración del bioadhesivo es importante para el desarrollo de una unión fuerte entre el polímero y la capa mucosa, debido a que a altas concentraciones de adhesivo se forman redes tridimensionales muy entrelazadas que no dejan suficientes grupos disponibles para ejercer interacción con las moléculas del mucus, y a concentraciones bajas aunque las cadenas se interpenetren, no hay gran cantidad de moléculas por unidad de volumen para generar una interacción fuerte. Así mismo la fuerza adhesiva de un material puede ser incrementada utilizando promotores de adhesión que son cadenas poliméricas libres o atadas al hidrogel y ubicadas en la interfase polímero-mucus. También es necesario considerar una adecuada solubilidad del polímero adhesivo en el mucus para tener mejor respuesta (López-Victoria y Zea, 2005; Peppas y Sahlin, 1996).

La mucoadhesión es un proceso que involucra la unión de un material a una superficie cubierta de mucus. Estos mucus son secreciones viscosas y translúcidas, que se encuentran en constante renovación y están compuestos principalmente por agua, en un porcentaje mayor al 95%, también por glicoproteínas (mucinas) en cantidades no mayores al 5%, por sales inorgánicas aproximadamente en un 1%, carbohidratos y lípidos en porcentajes menores al 1%. Las mucinas representan cerca del 80% de los componentes orgánicos y son las responsables del aspecto viscoso del mucus. Para el caso de los organismos marinos, no existe mayor información sobre la composición química del mucus, pero se han reportado algunos estudios sobre mucus de corales duros y blandos, en los que se ha encontrado la presencia de aminoácidos dicarboxílicos en la fracción protética, y de monoacilglicéridos en la fracción lipídica (Roldo *et al.*, 2004; Hoegh-Guldberg, 1999; Scheuer, 1981). El proceso de mucoadhesión, como se representa en la figura 1, se da a través de varias etapas que se inician con el contacto directo del polímero y la capa de mucus, el cual da origen a una interfase que permite la interdifusión e interpenetración de las cadenas del polímero dentro de la capa mucosa formándose una gran área de contacto que finalmente da lugar a un enmarañamiento y formación de enlaces entre las cadenas de polímero y las moléculas de mucina (López-Victoria y Zea, 2005; Daumas *et al.*, 1981; Whittaker y Feeny, 1971). Para determinar la capacidad adhesiva de los polímeros se han usado dos métodos: unos que incluyen ensayos de tensión, y otros basados en ensayos con fuerzas de corte. En estos dos experimentos la fuerza es uniformemente distribuida sobre el material adhesivo, y se miden propiedades mecánicas (Thacker *et al.*, 1998; Engel y Pawlik, 2000; Sáenz *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2000).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### PARTE EXPERIMENTAL

**Equipos.** Espectrofotómetro (Unicam UV/VIS UV2), rotaevaporador (Buchi), viscosímetro (Brookfield modelo RVT), balanza digital (Sartorius), potenciómetro (Schott), equipos de extensibilidad y de adherencia (Laboratorio de Farmacotecnia, Universidad Nacional de Colombia).

**Materiales.** Methocel® A4M (metilcelulosa), Methocel® K100M (hidroxipropilmetylcelulosa), Cellosize® (hidroxietilcelulosa), goma tragacanto, goma guar, Carbopol® (copolímero del ácido acrílico y alil éteres de sacarosa), sal marina, soluciones buffer

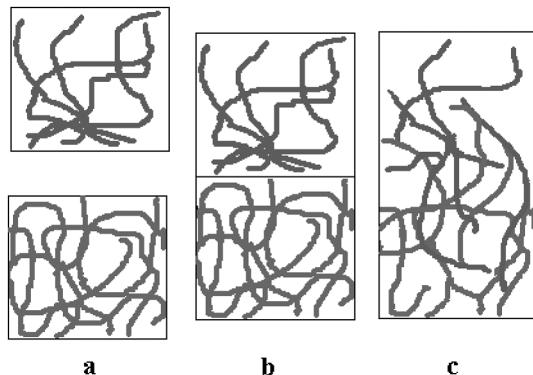


Figura 1. Representación esquemática de la interdifusión de las cadenas de polímero en el proceso de mucoadhesión a) capa de mucus y polímero antes del contacto b) capas de polímero y mucus en contacto c) las cadenas comienzan a difundir a partir de la interfase después de un período de contacto.

(pH 7,0-9,0), metilparabeno y propilparabeno (preservantes), Microtracer® azul y rojo (pigmentos), material animal (esponja *Cliona delitrix*), esqueletos de corales (*Montastrea cavernosa*, *Diploria sp.*, *Siderastrea siderea*).

#### METODOLOGÍA

El estudio de preformulación se desarrolló en tres fases: en la primera se seleccionaron los materiales poliméricos con capacidad mucoadhesiva potencialmente útiles y teniendo en cuenta las condiciones del medio (pH 7,9-8,3, salinidad promedio 3,5% p/v y temperatura 28 °C) al cual serían expuestas las formulaciones; posteriormente se realizaron ensayos preliminares para caracterizar propiedades y definir los parámetros de partida. En la segunda fase, se seleccionaron tres formulaciones, de acuerdo al diseño experimental planteado y en la fase tres se caracterizaron propiedades reológicas como viscosidad, extensibilidad y adherencia de las formulaciones propuestas. A estas también se les evaluó la estabilidad frente a diferentes pHs (utilizando cinco soluciones reguladoras), diferentes temperaturas y a tres valores de salinidad. Posteriormente, se evaluó la liberación del extracto incorporado en las formulaciones y se ensayaron dos formas de aplicación para las formulaciones propuestas tanto en *in vitro* como en *in situ*.

#### Fase i

**Selección de los polímeros.** Los materiales a utilizar se seleccionaron teniendo en cuenta características como la capacidad mucoadhesiva y la estabilidad frente a las condiciones del medio marino (iones, temperatura y pH) seleccionándose siete polímeros: Methocel® A4M, Methocel® K100M, Cellosize®, Goma tragacanto, goma guar, chitosan y ácido poliacrílico.

**Ensayos preliminares.** Se prepararon dispersiones en agua destilada de cada polímero y se ensayaron cinco diferentes proporciones para cada uno, luego a cada muestra se le determinó la extensibilidad por triplicado. El ensayo de extensibilidad consistió en colocar una cantidad de muestra utilizando un molde de teflón de 15 mm de diámetro y 4 mm de espesor sobre una placa de vidrio, y sobre esta colocar una segunda placa de vidrio, cuyo peso es de 440,2 g, dejando un tiempo de contacto de 1 minuto y observando el diámetro del halo formado. Posteriormente fueron colocados pesos de

411,1 g que corresponde al vástago metálico, se dejó un minuto y se realizó la lectura del diámetro correspondiente, sobre el vástago se incrementa pesos de 100 en 100 g de forma sucesiva y en intervalos de un minuto y se determinó cada vez el diámetro de la muestra utilizando la escala dispuesta en la placa de vidrio inferior (Fig. 2).

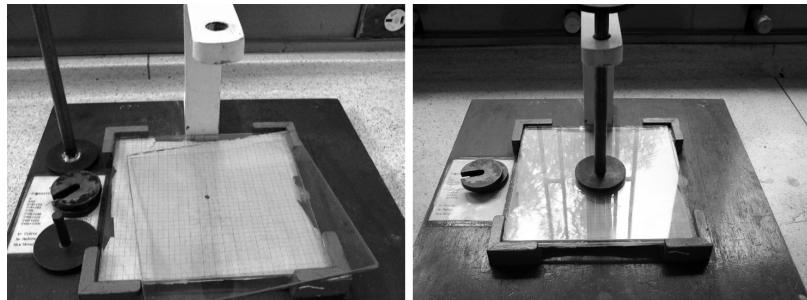


Figura 2. Equipo para la determinación de extensibilidad. A la izquierda se observan las dos placas de vidrio y las pesas que son colocadas sobre la placa superior para伸er la muestra y determinar el diámetro luego de cada peso aplicado. A la derecha se observa la forma como son colocadas las pesas.

De igual forma se observó para cada muestra la consistencia y la facilidad de aplicación. El ensayo de aplicación consistió en colocar 3 mL de muestra desde una jeringa sobre una capa de la dispersión de Carbopol® al 4% p/v ubicada en el fondo de un vaso de precipitados con 150 mL de solución de sal marina al 3,5% p/v, y observar si la muestra se adhería fácilmente a la capa de Carbopol® y se despegaba fácilmente de la jeringa, ponderando los resultados en una escala de 1 a 5. Posteriormente, se escogieron las dos dispersiones de cada polímero con las mejores características de aplicación y con valores de extensibilidad similares, las cuales fueron desafiadas en un ensayo de estabilidad física que consistió en colocar los geles (a los cuales se les incorporó el pigmento Microtracer® rojo) sobre laminillas de vidrio con forma de disco, utilizando un molde de teflón de 15 mm de diámetro y 4 mm de espesor. Estos discos fueron ubicados sobre laminillas de vidrio en el fondo de vasos de precipitados pequeños, y se adicionaron lentamente 40 mL de solución de sal marina (3,5% p/v y ajustada a pH 7,8), se llevaron a un baño termostatado a  $30 \pm 0,6$  °C durante 24 horas; se observaron manifestaciones de inestabilidad tales como la formación de hilos o la disminución de la cantidad de polímero colocada inicialmente; dichas observaciones se realizaron en intervalos de 60 minutos durante 6 horas, y una última lectura a las 24 horas, además se llevaron a cabo mediciones periódicas de pH durante el tiempo del ensayo.

#### Fase ii

**Ensayos de preformulación.** Se tomaron como punto de partida cuatro dispersiones de polímeros determinadas en la fase I: Methocel® A4M 4%p/v, Methocel® K100M 2,8%p/v, Cellosize® 3,2%p/v, y goma guar 1,6%p/v, a partir de las cuales se realizaron mezclas de tres componentes variando la proporción entre 0 y 100%, y manteniendo el cuarto componente (Methocel ® K100M 2,8%p/v) fijo en proporciones de 0%, 20% y 40% (Fig. 3). La composición de las muestras 1a-14a, 1b-14b y 1c-14c fue determinada al azar, a diferencia de las muestras 15a-25a, luego todas fueron sometidas al ensayo de estabilidad física durante 24 horas, siguiendo la misma metodología antes descrita (Tabla 1).

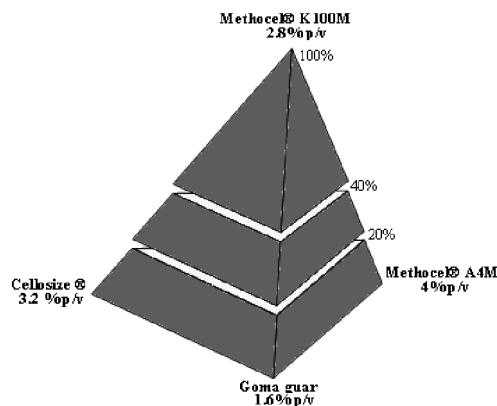


Figura 3. Pirámide de composición de las muestras ensayadas en la fase II.

| Muestra | Methocel® K100M |     |     | Methocel® K100M |    |     | Methocel® K100M |      |     |    |
|---------|-----------------|-----|-----|-----------------|----|-----|-----------------|------|-----|----|
|         | I               | II  | III | I               | II | III | I               | II   | III |    |
| 1 a     | 10              | 80  | 10  | 1 b             | 72 | 8   | 0               | 1 c  | 48  | 0  |
| 2 a     | 0               | 70  | 30  | 2 b             | 64 | 16  | 0               | 2 c  | 42  | 0  |
| 3 a     | 10              | 50  | 40  | 3 b             | 56 | 8   | 16              | 3 c  | 36  | 24 |
| 4 a     | 0               | 40  | 60  | 4 b             | 48 | 24  | 8               | 4 c  | 36  | 12 |
| 5 a     | 10              | 20  | 70  | 5 b             | 48 | 0   | 32              | 5 c  | 30  | 12 |
| 6 a     | 30              | 10  | 60  | 6 b             | 40 | 16  | 24              | 6 c  | 24  | 36 |
| 7 a     | 30              | 30  | 40  | 7 b             | 32 | 40  | 8               | 7 c  | 24  | 12 |
| 8 a     | 40              | 60  | 0   | 8 b             | 16 | 64  | 0               | 8 c  | 12  | 24 |
| 9 a     | 50              | 40  | 10  | 9 b             | 24 | 24  | 32              | 9 c  | 6   | 48 |
| 10 a    | 60              | 20  | 20  | 10 b            | 16 | 40  | 24              | 10 c | 6   | 30 |
| 11 a    | 70              | 30  | 0   | 11 b            | 16 | 16  | 48              | 11 c | 6   | 6  |
| 12 a    | 50              | 0   | 50  | 12 b            | 0  | 56  | 24              | 12 c | 0   | 18 |
| 13 a    | 70              | 0   | 30  | 13 b            | 0  | 40  | 40              | 13 c | 18  | 6  |
| 14 a    | 80              | 10  | 10  | 14 b            | 0  | 24  | 56              | 14 c | 24  | 24 |
| 15 a    | 100             | 0   | 0   | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 16 a    | 0               | 100 | 0   | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 17 a    | 0               | 0   | 100 | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 18 a    | 85              | 0   | 15  | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 19 a    | 50              | 20  | 30  | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 20 a    | 40              | 40  | 20  | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 21 a    | 30              | 55  | 15  | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 22 a    | 30              | 70  | 0   | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 23 a    | 30              | 40  | 30  | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 24 a    | 20              | 70  | 10  | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |
| 25 a    | 20              | 60  | 20  | -               | -  | -   | -               | -    | -   | -  |

Tabla 1. Composición de las muestras evaluadas en los ensayos de preformulación, en la fase II. Methocel® A4M 4%p/v (I), Cellosize ® 3,2 %p/v (II), Goma guar 1,6%p/v (III).

También fueron sometidas al ensayo de estabilidad física las muestras A-H, cuya

composición se describe en la tabla 2, de las cuales finalmente se seleccionaron las muestras A, C y E.

| Muestra | I (%) | II (%) | III (%) |
|---------|-------|--------|---------|
| A       | 100   | 0      | 0       |
| B       | 60    | 40     | 0       |
| C       | 60    | 30     | 10      |
| D       | 50    | 50     | 0       |
| E       | 50    | 40     | 10      |
| F       | 40    | 60     | 0       |
| G       | 40    | 50     | 10      |
| H       | 0     | 100    | 0       |

Tabla 2. Composición de las mezclas A-H ensayadas. I: Methocel® A4M 4%p/v II: Cellosize ® 3,2 %p/v III: goma guar 1,6%p/v. Las celdas sombreadas señalan las formulaciones seleccionadas para llevar a cabo la fase III.

### Fase iii

**Estabilidad física.** Se llevó a cabo un estudio de estabilidad física frente al pH para las tres formulaciones seleccionadas en la fase II, en el cual se colocaron muestras de las dispersiones A, C y E sobre laminillas de vidrio y fueron ubicadas en el fondo de vasos de precipitados con 40 mL de soluciones reguladoras de pH: 7,19, 7,78, 8,17, 8,76 y 9,20 a una temperatura de  $30,0 \pm 0,6$  °C También se evaluó la estabilidad física de las muestras frente a diferentes concentraciones de sal marina: 3,0%, 3,5% y 4,0% siguiendo la misma metodología descrita para el estudio frente al pH. Finalmente, se estudió la estabilidad física de los geles a cuatro temperaturas: 40 °C, 18 °C, 5 °C y a menos de 0 °C, para lo cual se colocaron muestras de A, C y E en frascos viales en cantidades entre 7 y 10 g, y se observó, cada 24 horas y durante ocho días, si había cambios en la coloración o en la fluidez.

**Estudio del comportamiento reológico de los geles.** El análisis reológico fue desarrollado por triplicado, en muestras de 500 mL de cada gel y usando un viscosímetro Brookfield RVT, vástago 7, incrementando la velocidad desde 0,5 hasta 100 rpm y luego diminuyendo desde 100 rpm hasta 0,5 rpm, provocando agitación al sistema por 2 minutos y dejando un periodo de reposo de 2 minutos. Todas las determinaciones se realizaron a 18 °C.

**Estudio de la liberación del extracto a partir del gel.** Se obtuvo la fracción acuosa (W) del extracto crudo de la esponja *Cliona delitrix* (Anexo D) y se determinó, teniendo en cuenta los datos reportados por A. Chávez 2003, el porcentaje de la fracción (W) que debería incorporarse a los geles para tener una concentración gravimétricamente equivalente a la encontrada en la esponja de forma natural, la cual es de 0,058 g de extracto acuoso/g de gel.

La determinación de la liberación del extracto a partir del gel se llevó a cabo para las muestras A, C y E: con extracto, con y sin película de aceite, y muestras blanco sin extracto y sin película de aceite, ensayadas en cantidades alrededor de 0,70 g depositadas sobre laminillas de vidrio y en forma de disco en el fondo de vasos de precipitados

a los que les fueron adicionados 150 mL de solución de sal marina 3,5% p/v regulada a pH 8,0 en un baño termostatado a  $30 \pm 0,6$  °C y con agitación manual cada 4 horas. Se tomaron alícuotas de 10 mL del medio a las 14, 20 y 24 horas y el volumen retirado fue reemplazado con un volumen equivalente de medio, y se refrigeraron inmediatamente. Posteriormente, se tomaron los espectros de absorción UV entre 225 nm y 350 nm para cada muestra.

**Estudio de la capacidad mucoadhesiva.** Para este ensayo se utilizó esófago bovino fresco, el cual fué cortado en forma de cuadrado 8 cm x 8 cm y fijado en la parte inferior del equipo de adherencia (Fig. 4). En la placa superior del equipo se colocaron 6 mL de cada formulación (A, C y E) utilizando una jeringa y se unieron las dos placas donde se permitió un tiempo de contacto de 5 minutos entre el gel y el tejido de esófago bovino. Pasado este tiempo, se colocó un peso de 400 g al sistema, de manera que la tensión en la cuerda fuese constante, hasta observar una separación de las dos capas, y poder determinar el tiempo transcurrido hasta la separación.

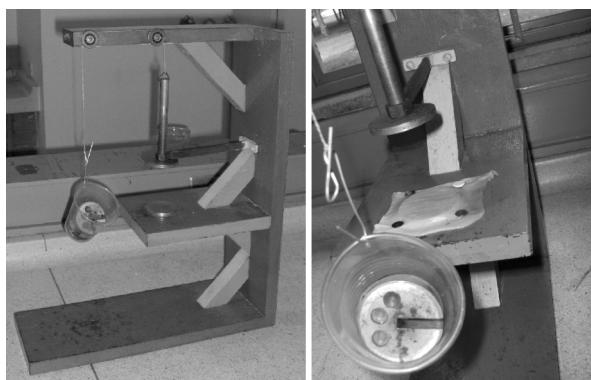


Figura 4. Izquierdo: equipo de adherencia; derecha: montaje con el tejido mucoso utilizado.

**Forma de aplicación de las formulaciones y ensayos en campo.** Se ensayaron dos formas de aplicación, en la primera las dispersiones de los polímeros fueron colocadas en jeringas, la prueba *in situ* se realizó sobre los corales *Montastraea cavernosa* y *Diploria strigosa* en los arrecifes de Punta Betín (Santa Marta, Colombia), ensayando las siguientes dispersiones de polímeros: Methocel® A4M 4%p/v, Methocel® K100M 2,8%p/v, Cellosize® 3,2%p/v. Se utilizaron tubos de PVC (1 pulgada) cortados y con un recubrimiento de cinta en la base para que no quedara espacio entre el tubo y el coral. Los tubos de PVC fueron puestos sobre el tejido coralino vivo y luego entre 20 y 40 mL de cada dispersión de polímero fueron colocados dentro de los tubos, con ayuda de jeringas plásticas de 60 mL, haciendo dos réplicas por cada muestra ensayada. En la segunda forma de aplicación se utilizó un dispositivo (Fig. 5) en el cual la dispersión de polímero fue colocada en un molde dentro de una jeringa y sobre el disco 1, tanto el molde como el disco 1 fueron previamente cubiertos con aceite mineral para evitar la adhesión del material al dispositivo y facilitar la expulsión. El disco 2 se colocó como se muestra en la figura 4 para evitar la pérdida de gel al introducir el dispositivo en el mar, a profundidades alrededor de 20 m, este disco no fue impregnado con aceite para permitir la

adhesión del polímero sobre el mucus de coral. Esta forma de aplicación se evaluó *in vitro* usando las formulaciones A, C y E sobre esqueletos calcáreos de *Montastrea cavernosa*, *Diploria* sp. y *Siderastrea siderea*, ubicados en el fondo de un acuario con solución de sal marina 3,5% p/v, para esto se depositó la muestra con el molde desde el dispositivo y luego de 5 minutos se retiró el molde, observando si la muestra permanecía adherida o no al coral durante 24 horas.

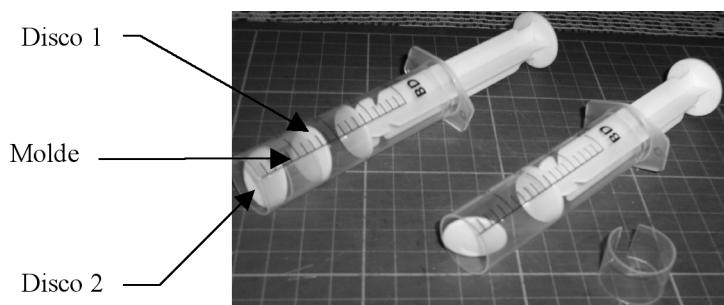


Figura 5. Dispositivo diseñado para la aplicación de las formulaciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### ENSAYOS PRELIMINARES

Con el objetivo de establecer las proporciones en que se prepararían las dispersiones de los cinco polímeros seleccionados (Methocel® A4M, Methocel® K100M, Cellosize®, goma tragacanto y goma guar), se realizaron los ensayos de aplicación, extensibilidad, y estabilidad física.

El ensayo de aplicación permitió hacer una selección previa de dos dispersiones de las cinco ensayadas para cada polímero, en los resultados se observó cómo para cada polímero existe un rango de proporciones de las dispersiones en el que se obtienen los mejores resultados de aplicación, es decir que no se encontró una relación entre una buena aplicación y el aumento o disminución de la cantidad de polímero: así, para Methocel® K100M y Cellosize®, las dispersiones entre el 2,4-2,8% p/v y 2,8-3,2% p/v respectivamente, presentaron excelentes características de aplicación, aún cuando difieren en la cantidad de polímero hidratado, lo cual se entiende teniendo en cuenta que son materiales poliméricos que poseen características diferentes. Con el ensayo de extensibilidad se observó como las dos dispersiones de cada polímero seleccionadas en el ensayo de aplicación presentaban valores de extensibilidad similares, lo cual a su vez implica una consistencia semejante.

Finalmente, con el ensayo de estabilidad se descartaron las dos dispersiones de goma tragacanto, dado que al colocarlas en el medio (salinidad 3,5% p/v, pH 8,0 y temperatura 30 °C) mostraron inestabilidad a las 2 horas de iniciado el ensayo, mientras que al menos una muestra de los demás polímeros fue estable en el medio y se mantuvo la forma inicial. Relacionando los resultados de aplicación con los del ensayo de estabilidad se encontró que las mejores dispersiones fueron: Methocel® A4M 4%p/v, Methocel® K100M 2,8%p/v, Cellosize® 3,2 %p/v, y goma guar 1,6%p/v.

**Ensayos de preformulación.** Las figuras 6A y B muestran los resultados de estabilidad física de las mezclas cuaternarias, donde los puntos verdes indican ausencia de hilos (bueno), los amarillos indican presencia de 1-2 hilos (regular) y los rojos indican presencia de mas de tres hilos (malo). Se observó en las mezclas cuaternarias, como las muestras que contenían Methocel® K100M 2,8% en alguna proporción no dieron buenas respuestas de estabilidad frente al medio, y que la respuesta empeoraban con el incremento de la proporción de este polímero. Por tanto, se decidió continuar el estudio realizando mezclas ternarias de Methocel® A4M 4%p/v, Cellosize ® 3,2 %p/v, y goma guar 1,6%p/v.

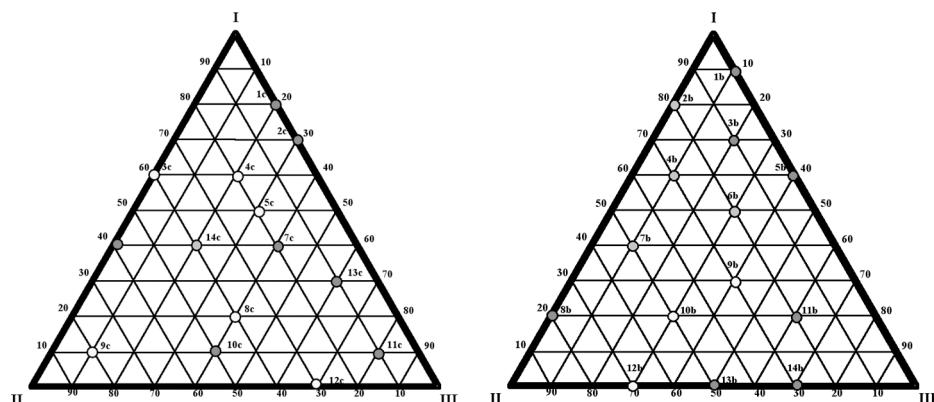


Figura 6A. Composiciones ensayadas en las mezclas cuaternarias de polímeros, con Methocel® K100M 2,8% en una proporción del 40% (Los vértice I, II y III corresponde cada uno a un polímero de estudio, manteniendo el cuarto constante). B. Composiciones ensayadas en las mezclas cuaternarias de polímeros, con Methocel® K100M 2,8% en una proporción del 20%. (Los vértice I, II y III corresponde cada uno a un polímero de estudio, manteniendo el cuarto constante).

Los resultados de estabilidad física para las muestra ternarias se muestran en la figura 7A, donde se encontró que las mejores respuestas tendían a ubicarse hacia el vértice superior del triángulo, en donde las proporciones de goma guar eran bajas y las de Methocel® A4M 4% eran mayores. Por tanto, se estudió el comportamiento de las muestras 18a hasta 25a (Tabla 2), con el fin de delimitar el área de las mejores respuestas. Posteriormente se decidió ensayar las muestras A-H cuya composición se encontraba dentro de la zona de las mejores respuestas que ya se había delimitado para establecer si dentro de la misma se observaban buenos resultados de estabilidad.

Se observó que todas las muestras fueron estables en el medio (Fig. 7B), por lo tanto se seleccionaron tres formulaciones de acuerdo a criterios como: costo, facilidad de aplicación y preparación. Aunque las mezclas que contenían goma guar requerían más tiempo para su elaboración dado que este polímero se hidrata más lentamente que los demás, era necesaria la presencia de este componente ya que mejoraba las características de aplicación de las formulaciones tal como se observó en los ensayos preliminares.

#### RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES

**Estabilidad frente al pH, temperatura y salinidad.** Las formulaciones mostraron ser estables a pH entre 7,2 y 8,2, mientras que a un pH mayor se observaron manifesta-

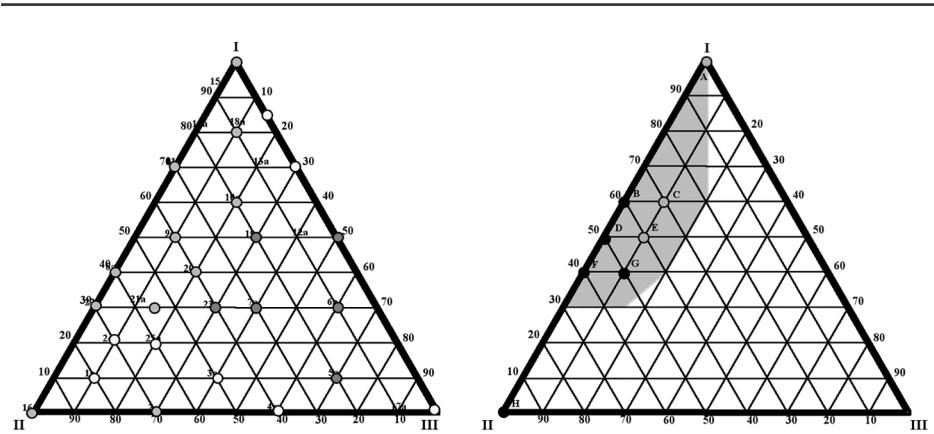


Figura 7A. Composiciones ensayadas en las mezclas ternarias de polímeros. B. Área delimitada de las mejores respuestas de estabilidad física para las mezclas ternarias.

ciones de inestabilidad tales como la disminución de la cantidad de muestra colocada inicialmente. Con respecto a la salinidad, se observó como la formulación C parece no ser afectada por el aumento en la concentración de sal marina en el medio (3,0-4,0 %p/v), mientras que las formulaciones A y E presentaron formación de hilos. El ensayo de estabilidad frente a la temperatura, sugiere que las formulaciones deben ser refrigeradas para que conserven sus propiedades iniciales ya que a  $T^{\circ}$  40 °C y bajo congelación, se obtienen muestras más opacas y fluídas que sugieren cambios significativos en las formulaciones.

**Propiedades reológicas y forma de aplicación de las formulaciones.** La formulación A describió un flujo no newtoniano pseudoplástico, tal como se esperaba según lo descrito en la literatura para este polímero. Las mezclas ternarias, es decir las formulaciones C y E, mostraron tener el mismo comportamiento reológico que presentó la formulación A, y así mismo las formulaciones C y E presentan valores de fluidez similares entre sí pero siempre menores a los que presentó la formulación A (Fig. 8). Con respecto a la viscosidad aparente, se encontró que las mezclas ternarias C y E presentaron valores similares (34600-97500 cps y 34240-93200 cps respectivamente), obtenidos para el rango de (100-20 rpm) mientras la formulación A presentó una menor viscosidad (22200-49700 cps).

La pseudoplasticidad de estas formulaciones facilita la aplicación de las muestras mediante una jeringa, ya que al ejercer una fuerza sobre las formulaciones se mejoran sus propiedades de flujo. Sin embargo, con los resultados de los ensayos en campo, se observó como a pesar de que las formulaciones presentaron una fácil aplicación desde la jeringa, no se obtuvieron buenos resultados de mucoadhesión, ya que el dispositivo usado para la aplicación (jeringa) no permitió lograr un tiempo de contacto prolongado (2-5 minutos) necesario para que se estableciera la interacción mucus-polímero y se diera el fenómeno de mucoadhesión.

Teniendo en cuenta lo anterior, se diseñó un segundo sistema de aplicación que permitía contener una cantidad determinada de muestra y con una forma definida, además de brindar una mayor superficie de contacto del gel con el mucus del coral. Con esta

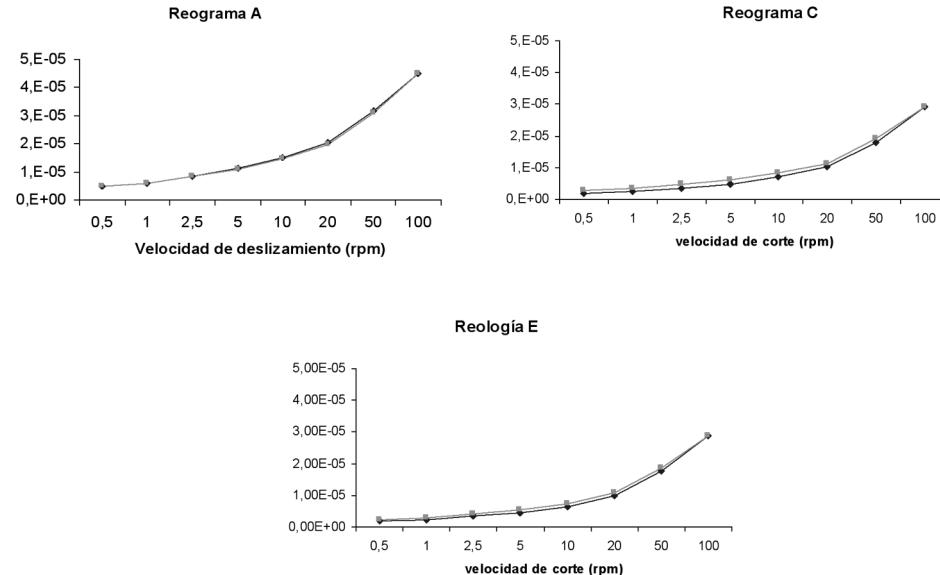


Figura 8. A. Reograma para la formulación. B. Reograma para la formulación C. C. Reograma para la formulación E.

forma de aplicación se observaron mejores resultados *in vitro* que cuando se usó la jeringa, adicionalmente se encontró más funcional dado que se deben que aplicar a profundidades de 20 o más metros dentro del mar. Se utilizó también aceite mineral para recubrir las partes en contacto con el dispositivo (exceptuando aquella en contacto con el disco 2) facilitando la expulsión desde el mismo, ya que de esta forma se evitaba adhesión de la muestra al molde. Usando este dispositivo, las formulaciones permanecieron adheridas a los corales por un tiempo mayor de 24 horas y con la forma dada inicialmente (Fig. 9).

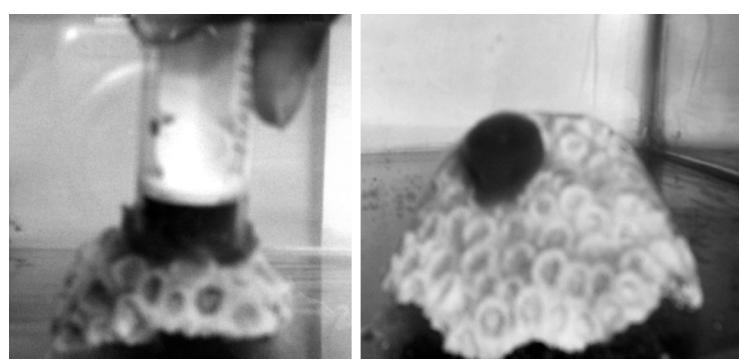


Figura 9. Ensayos *in vitro* de la aplicación de la formulación A sobre el coral *Siderastrea siderea*.

**Estudio de la capacidad mucoadhesiva.** Al comparar la formulación A con las formulaciones C y E, se encontró una mayor capacidad adhesiva para la formulación A que

para las mezclas ternarias, como se observa en la figura 10. Sin embargo, la viscosidad de esta dispersión es la menor de las tres ensayadas. Las formulaciones C y E presentaron un comportamiento adhesivo similar entre si y a su vez valores de viscosidad semejantes. Por esta razón creemos que existe una relación entre la capacidad adhesiva y la viscosidad donde existe un valor de viscosidad adecuado para el cual se presenta la mayor adhesividad. Los resultados se muestran a continuación.

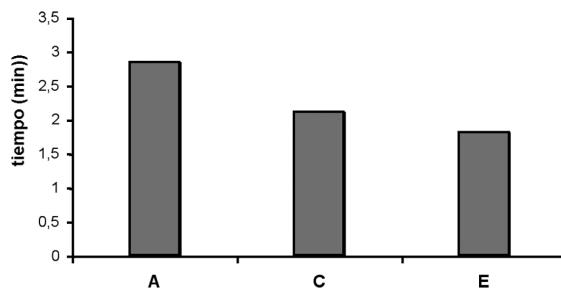


Figura 10. Resultados del ensayo de capacidad mucoadhesiva.

**Liberación del extracto a partir del gel.** En un trabajo previo se realizó la caracterización cromatográfica de la fracción acuosa del extracto de la esponja *Cliona delitrix* donde se determinó que la serotonina es el constituyente principal. Teniendo en cuenta esta información se fijó el rango de longitud de onda (225-350 nm) para identificar si había liberación de serotonina hacia la solución salina y detectarlo al UV. Los espectros de absorbancia para las muestras A, C y E presentaron dos máximos de absorción: uno a 256 nm y otro a 294 nm, y se determinó la absorbancia de las muestras a 256 nm. En las figuras 11B y C se observa como las formulaciones C y E muestran una cinética de liberación del extracto similar independientemente de la aplicación de una película de aceite en la superficie de muestra expuesta al medio salino. Se observó también que la liberación correspondía a compuestos presentes en el extracto acuoso y no proveniente del polímero, dado que no se detectó absorbancia en el rango de longitud de onda estudiado. Para la formulación A, como se observa en la figura 11A, parte de la matriz fue cedida al medio y parte del extracto acuoso fue liberado ya que se presenta una mayor absorbancia la formulación con extracto que la sin extracto.

## CONCLUSIONES

Los estudios de preformulación condujeron a la selección de las formulaciones A, C y E, a partir del diseño experimental empleado. Estas formulaciones resultaron ser estables físicamente, frente a las condiciones de pH 7,2-8,2, de salinidad entre 3,0 y 3,5% p/v, y de temperatura, cumpliéndose con el objetivo planteado. Las formulaciones del gel ensayadas presentaron una capacidad adhesiva alta, siendo A mayor que C y este a su vez mayor que E, en donde la viscosidad resultó estar relacionada con la mucoadhesión. Se encontró un comportamiento pseudoplástico para las formulaciones A, C y E. Se diseñó un nuevo dispositivo para la aplicación de los geles en campo,

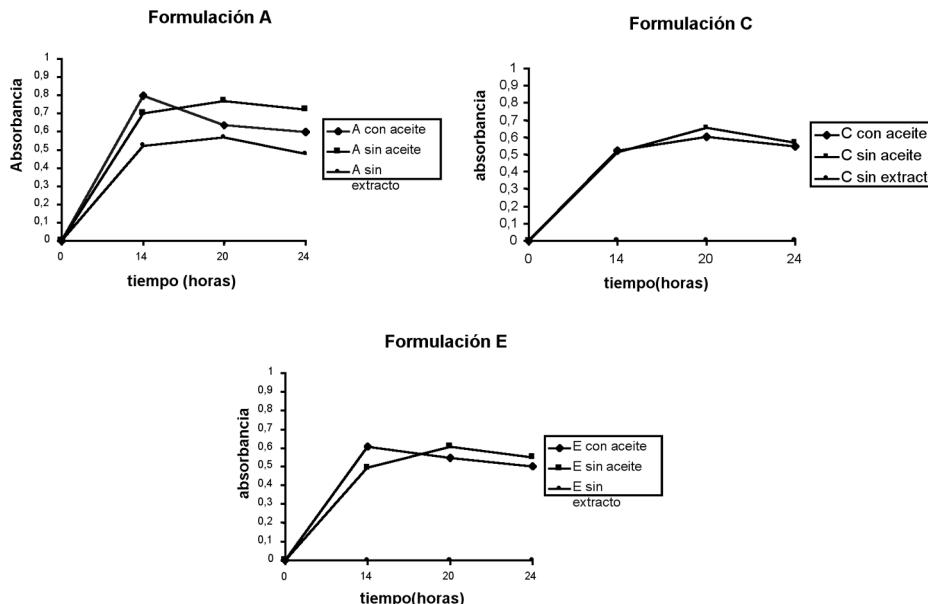


Figura 11. A. Comportamiento de liberación de la fracción acuosa del extracto de la esponja *Cliona delitrix* a partir de la formulación A (256 nm). B. Comportamiento de liberación de la fracción acuosa del extracto de la esponja *Cliona delitrix* a partir de la formulación C (256 nm). C. Comportamiento de liberación de la fracción acuosa del extracto de la esponja *Cliona delitrix* a partir de la formulación E (256 nm).

por parte de los buzos, que permitió tener un mayor tiempo de contacto entre las muestras y el mucus coralino y por lo tanto una mayor adherencia del gel.

Con el estudio de liberación se encontró que las formulaciones liberan al medio, compuestos presentes en el extracto de la esponja que fue incorporado en los geles, donde posiblemente se encuentra la serotonina. Siendo este trabajo pionero en dicha temática y que permite contribuir a la solución de un problema de los arrecifes coralinos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS bajo el proyecto “Estudio químico y de ecología química de las esponjas marinas *Cliona tenuis* y *Cliona delitrix* en su relación con corales en arrecifes colombianos”. Se desarrolló en las instalaciones del Departamento de Química, laboratorio de Productos Naturales marinos y en el laboratorio de Farmacotécnica del Departamento de Farmacia. Agradecemos a la profesora Carmenza Duque B. por sus valiosos aportes académicos.

## BIBLIOGRAFÍA

AERTS L. Sponge-coral interactions on Caribbean reefs [PhD thesis]. Amsterdam: University of Amsterdam; 1999. p. 135-140.

BERNKOP-SCHNURCH A, STEINIGER S. Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers. Int J Pharm. 2000;194:239.

- 
- CARTE B. Biochemical potential of marine natural products. Bioscience. 1996;46: 271.
- CHAVES A. Evaluación del posible papel ecológico de los extractos orgánicos crudos de las esponjas excavadoras *C. aprica* Pang, 1973, *C. caribbaea* Carter, 1882, *C. delitrix pang*, 1973 y *C. tenuis* Zea y Weil, sp [Tesis de grado]. Bogotá: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano; 2003. p. 36-38.
- DAUMAS R, GALOIS R, THOMASSIN B. Biochemical composition of soft and hard coral mucus on a new caledonian lagoonal reef. Proceedings of the Fourth international Coral Reef Symposium, Manila. 1981; Vol. 2 p. 59.
- ENGEL S, PAWLIK JR. Allelopathic activities of sponge extracts. Mar Ecol-Prog Ser. 2000;207:273.
- GERALD J B, TARGETT N, SCHULTE B. Chemical ecology of marine organisms: an overview. J Chem Ecol. 1986;12(5):951.
- HAGERSTROM H. Polymer gels as pharmaceutical dosage forms: rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for formulations intended for mucosal drug delivery [PhD thesis]. Uppsala: Uppsala University; 2003. p. 13-24.
- HENRIKSON AA, PAWLIK JP. A new antifouling assay method: results from the field experiments using extracts of four marine organisms. J Exp Mar Biol Ecol. 1995;194:157.
- HOEGH-GULDBERG O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. Mar Freshwater Res. 1999;50:839.
- HUANG Y, LEOBANDUNG P, AARON WF, PEPPAS N. Molecular aspects of muco- and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. J Control Release. 2000;65:63.
- KAFEDJIISKI K, FRANZENS L. Multifunctional polymeric excipients in no-invasive delivery of hydrophilic macromolecular drugs: the thiomer-technology. The drug delivery companies report Autumn/winter. 2004.
- LÓPEZ-VICTORIA M, ZEA S. Current trend of space occupation by encrusting excavating sponges on Colombian coral reefs. Mar Ecol. 2005;26:33.
- PAWLIK JR, STEINLERL TP, BEERS H, ILAN M. Chemical warfare on coral reefs; sponge metabolites differentially affect coral symbiosis *in situ*. Limnol Oceanogr. 2007;52:907-911.
- PAWLIK JR. Marine invertebrate chemical defences. Chem Rev. 1993;93(5):1911.
- PEPPAS N, HUANG Y. Nanoscale of mucoadhesive interactions. Adv Drug Delivery Rev. 2004;56:1675.
- PEPPAS N, SAHLIN J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. Biomaterials. 1996;17:1553.
- PORTER JW, TARGETT NM. Allelochemical interactions between sponges and corals. Biol Bull. 1998;175:230.
- RODRÍGUEZ IC, CEREZO A, SALEM II. Sistemas de Liberación Bioadhesivos. Ars Pharmaceutica. 2000;41:115.
- ROLDO M, HORNOF M, CALICETI P. Mucoadhesive thiolated chitosans as platforms for oral controlled drug delivery: synthesis and *in vitro* evaluation. Eur J Pharm Biopharm. 2004;57:115.

SÁENZ V, ESTIBALIZ H, ANGULO L. Liberación Controlada de Fármacos Hidrogeles. Rev Iberoam Polímeros. 2003;4:21.

SCHEUER PJ, editor. Marine Natural Products in Chemical and Biological Perspectives. Hawaii: Academic Press; 1981. p. 143-186.

THACKER RW, BECERRO MA, LUMBANG WA, PAUL VJ. Allelopathic interactions between sponges on tropical reefs. Ecology. 1998;79(5):1740.

WHITTAKER RH, FEENY PP. Allelochemistry: Chemical interactions between species. Science. 1971;171:757.