



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUATITLÁN**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

## **TÍTULO DEL PROYECTO:**

**“EVALUACIÓN PRE-CLÍNICA Y FARMACOCINÉTICA DE UNA NUEVA  
FORMULACIÓN DE INSULINA EN UN MODELO DE DIABETES  
EXPERIMENTAL EN RATAS WISTAR, PARA SU USO FINAL EN PERROS CON  
DIABETES MELLITUS TIPO I”**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**PRESENTA:**

**SARA MELISA ARCINIEGAS RUIZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

Dinorah Vargas Estrada

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA Y FARMACOLOGIA. FMVZ. UNAM.

**COMITÉ TUTOR:**

Roberto Díaz Torres

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN MULTIDISCIPLINARIA. Facultad de  
Estudios Superiores (FES) - Cuautitlán. UNAM.

Raquel López Arellano

LABORATORIO DE ENSAYOS FARMACEUTICOS. Facultad de Estudios  
Superiores (FES) - Cuautitlán. UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. AGOSTO DE 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer el apoyo financiero del PAPIIT (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica) *Nº IT202317* para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Agradezco al Dr. José Pedraza Chaverri del Departamento de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo en los procedimientos de electroforesis gel y su documentación. Gracias a la Dra. Xelhua Elihut Marcos Benitez y al Dr. Miguel Antonio Costas Basín, investigadores del Departamento de Química, por su apoyo en el análisis de la técnica DSC.

Quiero dar un agradecimiento especial a la Dra. Sara Caballero Chacón por su apoyo financiero y aporte intelectual al desarrollo de este trabajo.

Adicionalmente a la Dra. María Josefa Bernad Bernad y a su equipo de trabajo en el departamento de farmacia de la Facultad de Química de Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo con el préstamo de su laboratorio y equipos, así como se guía intelectual para desarrollar gran parte de este proyecto.

Agradezco a Bruno Solis y Daniel Hernández alumnos del Laboratorio de ensayos farmacéuticos (LEDEFAR) de FES-CUATITLAN, quienes me ayudaron en los procedimientos de validación del método analítico así como la implementación de la técnica para determinar el porcentaje de encapsulamiento de nuestros productos.

## RESUMEN

La diabetes es una enfermedad crónica metabólica que causa un aumento irregular glucosa sanguínea debido a la deficiencia relativa o absoluta de la hormona insulina por parte de las células beta del páncreas en los islotes de Langerhans. Esta deficiencia de insulina ha llevado a que el principal tratamiento sea la administración exógena de esta hormona por vía inyectable, sin embargo un control exitoso de los niveles de glucosa sanguínea requiere de múltiples inyecciones diarias y algunos efectos adversos en los sitios de aplicación. Esta falta de flexibilidad del tratamiento y las molestias causadas por las múltiples aplicaciones llevan a generar estrés y discomfort en los pacientes, lo que puede llevar a inadecuados tratamientos. Con el fin de mejorar el tratamiento para pacientes con esta condición se han hecho intentos por hacer desarrollos en ingeniería genética, dispositivos y rutas alternativas de administración. Se han evaluado múltiples vías de administración con diferentes resultados clínicos, sin embargo la vía oral resulta ser la más conveniente fisiológicamente, ya que la liberación por esta vía sería la más similar al comportamiento natural de la hormona. De modo que el objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un transportador nanométrico para administrar insulina por vía oral para reducir la degradación causada por el tracto gastrointestinal. Se realizaron múltiples preparados basados en liposomas flexibles con adición de PEG-2000 PE preparados por diferentes métodos de manufactura. Las características físicas y de estabilidad fueron determinadas para todos los preparados y los mejores preparados fueron evaluados *in-vitro* e *in-vivo* para determinar su liberación y efecto biológico.

Palabras clave: diabetes, glucosa, diabetes experimental, heating method, proteína, liposomas flexibles, transfersoma, liposoma, vesicular lipídica, nanopartícula, perfil de disolución.

## ABSTRACT

Diabetes is a chronic metabolic disease that causes an irregular increase in blood glucose due to the relative or absolute deficiency of insulin, hormone produced by the beta cells of the pancreas in the islets of Langerhans. The main treatment for this deficiency of insulin has been the exogenous administration of this hormone by injection. However, the successful control of blood glucose levels requires multiple daily injections and it could cause some adverse effects at the sites of application. This lack of flexibility in the treatment and the discomfort caused by the multiple applications lead to stress and discomfort in patients, it can generate an inadequate treatment. In order to improve treatment for patients with this condition, attempts have been made to develop genetic engineering, devices and alternative routes of administration. Multiple routes of administration with different clinical results have been evaluated, however the oral route turns out to be the most suitable physiologically; the release in this way would be the most similar to the natural behavior of the hormone. So the main objective of this work was to develop a nanometric transporter to administer insulin orally to reduce the degradation caused by the gastrointestinal tract. Multiple preparations based on flexible liposomes were made with the addition of PEG-2000 PE prepared by different manufacturing methods. The physical and the stability characteristics were determined for all the preparations and the best preparations were evaluated *in-vitro* and *in-vivo* to determine their release and biological effect.

Keywords: diabetes, glucose, experimental diabetes, heating method, protein, flexible liposomes, transfersomes, liposome, lipid vesicle, nanoparticles, entrapment efficiency, dissolution profile.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABC</b>	Área entre la curva de disolución del fármaco y su asíntota
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AIC</b>	Criterio de información de Akaike
<b>AUC</b>	Área bajo la curva
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>Da</b>	<u>Daltons</u>
<b>DE</b>	Eficacia de disolución
<b>DSC</b>	Calorimetría diferencial de Barrido
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (US)
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IPD</b>	Índice de polidispersión
<b>IR</b>	Espectroscopia de infrarrojo
<b>IUV</b>	Vesículas unilamelares de tamaño intermedio
<b>LDE</b>	Electroforesis laser Dopler
<b>LF</b>	Liposomas flexibles
<b>LUV</b>	Vesículas grandes unilamelares
<b>MDT</b>	Tiempo medio de disolución
<b>MLV</b>	Vesículas multilamelares
<b>MWCO</b>	Molecular weight cut-off
<b>PAGE</b>	Electroforesis gel de Poliacrilamida
<b>PBS</b>	Buffer de Fosfatos
<b>PCS</b>	Espectroscopía de Correlación Fotónica
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEG-2000 PE</b>	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000]
<b>PO</b>	Vía oral
<b>QELS</b>	Dispersión cuasi-elástica de luz
<b>SC</b>	Vía subcutánea
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>STZ</b>	Estreptozotocina

<b>SUV</b>	Vesículas unilamelares
<b>Tc</b>	Temperatura de transición de fase
<b>TD</b>	Vía transdérmica
<b>TGI</b>	Tracto gastrointestinal
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>ZP</b>	Potencial zeta

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....</b>	<b>17</b>
<b>2. MARCO TEORICO.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1. Diabetes Mellitus Canina.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2. Clasificación de la diabetes mellitus.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3. Manifestación clínica.....</b>	<b>29</b>
<b>2.4. Tratamiento.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4.1. Insulina.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.2. Fisiología de la insulina.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4.3. Tipos de insulina.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.3.1. Insulinas de origen animal.....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.3.2. La insulina humana.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4.3.3. Insulinas Análogas.....</b>	<b>34</b>
<b>2.5. Lípidos.....</b>	<b>36</b>
<b>2.5.1. Fosfolípidos.....</b>	<b>36</b>
<b>2.6. Liposomas.....</b>	<b>38</b>
<b>3. HIPOTESIS.....</b>	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>40</b>
<b>5. METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1. MATERIALES.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.1. Características físico-químicas de los componentes.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.1.1. Insulina.....</b>	<b>41</b>
<b>5.1.1.2. L-<math>\alpha</math>-fosfatidilcolina de Soya.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.1.3. Colato de Sodio.....</b>	<b>45</b>
<b>5.1.1.4. Colesterol.....</b>	<b>46</b>
<b>5.1.1.5. PEG2000 PE.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2. FASE DE PREPARACIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.1. Validación del método analítico.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.1.1. Preparación de la curva estándar.....</b>	<b>51</b>



5.2.1.2. <i>Espectroscopia UV de la curva estándar</i> .....	52
5.2.1.3. <i>Linealidad del Sistema</i> .....	53
5.2.1.4. <i>Precisión</i> .....	54
5.2.1.5. <i>Exactitud</i> .....	55
5.2.1.6. <i>Repetibilidad y Reproducibilidad</i> .....	55
5.2.1.7. <i>Selectividad</i> .....	56
5.2.1.8. <i>Robustez</i> .....	57
5.2.2. <b>Evaluación estructural de Insulina expuesta a diferentes temperaturas</b> .....	58
5.2.2.1. <i>Absorbancia</i> .....	58
5.2.2.2. <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i> .....	58
5.2.2.3. <i>Espectroscopia Infrarrojo</i> .....	60
5.2.2.4. <i>Calorimetría Diferencial de Barrido</i> .....	60
<b>5.3. FASE I DE FORMULACIÓN</b> .....	61
5.3.1. <b>Preparación de los liposomas</b> .....	61
5.3.1.1. <i>Técnica de rehidratación de película delgada</i> .....	61
5.3.1.2. <i>Técnica de calentamiento</i> .....	62
5.3.2. <b>Caracterización de los liposomas</b> .....	62
5.3.2.1. <i>Tamaño de los liposomas, índice de polidispersión y potencial zeta</i> .....	62
5.3.2.2. <i>Determinación del porcentaje de encapsulamiento de la Insulina</i> .....	65
5.3.2.2.1. <i>Separación de los liposomas</i> .....	65
<b>5.4. FASE II DE FORMULACIÓN</b> .....	66
5.4.1. <b>Preparación de los liposomas</b> .....	66
5.4.2. <b>Caracterización de los liposomas</b> .....	67
5.4.2.1. <i>Tamaño de los liposomas, índice de polidispersión y potencial zeta</i> .....	67
5.4.2.2. <i>Determinación del porcentaje de encapsulamiento de la Insulina</i> .....	67
<b>5.5. PRUEBAS DE ESTABILIDAD</b> .....	68
<b>5.6. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN IN-VITRO</b> .....	68

5.6.1.	Diálisis Inversa de dos etapas.....	68
5.6.2.	Espectrofotometria UV-vis.....	69
5.6.3.	Ajuste matemático a modelos de disolución.....	70
5.6.3.1.	<i>Métodos dependientes del modelo</i> .....	70
5.6.3.2.	<i>Métodos independientes del modelo</i> .....	71
5.7.	PRUEBAS IN-VIVO.....	72
5.7.1.	Animales (ratas wistar).....	72
5.7.2.	Inducción experimental de Diabetes Mellitus Tipo I.....	72
5.7.3.	Diseño experimental.....	73
5.7.4.	Determinación de la concentración de glucosa en sangre.	73
5.7.5.	Eutanasia de los animales.....	73
5.7.6.	Análisis estadístico.....	74
6.	RESULTADOS.....	75
6.1.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	75
6.1.1.	Espectroscopia UV de la curva estándar.....	75
6.1.2.	Linealidad del Sistema.....	75
6.1.3.	Precisión y exactitud.....	76
6.1.4.	Repetibilidad.....	77
6.1.5.	Reproducibilidad.....	78
6.1.6.	Selectividad.....	79
6.1.7.	Robustez.....	79
6.2.	EVALUACIÓN ESTRUCTURAL DE INSULINA EXPUESTA A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	80
6.2.1.	Absorbancia.....	80
6.2.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	81
6.2.3.	Espectroscopia Infrarrojo.....	82
6.2.4.	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	83
6.3.	CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES FASE I... 83	
6.3.1.	Tamaño de los liposomas.....	83
6.3.2.	Índice de Polidispersión.....	86
6.3.3.	Potencial Z.....	87
6.3.4.	Porcentaje de encapsulamiento.....	88

<b>6.4. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES DE FASE II.....</b>	<b>90</b>
6.4.1. Tamaño de los liposomas.....	90
6.4.2. Índice de Polidispersión.....	91
6.4.3. Potencial Z.....	92
6.4.4. Porcentaje de encapsulamiento.....	92
<b>6.5. ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>6.6. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN IN-VITRO.....</b>	<b>95</b>
<b>6.7. PRUEBAS IN VIVO.....</b>	<b>99</b>
6.7.1. Curva de Glucosa Basal.....	99
6.7.2. Vía de Administración oral.....	100
6.7.3. Vía de administración transdérmica.....	100
6.7.4. Vía de administración subcutánea.....	101
6.7.5. Liposomas flexibles vacíos.....	102
6.7.6. Efecto biológico de insulinas expuestas a diferentes temperaturas.....	103
<b>7. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
<b>7.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....</b>	<b>105</b>
7.1.1. Linealidad del sistema.....	105
7.1.2. Precisión y Exactitud.....	105
7.1.3. Repetibilidad y Reproducibilidad.....	105
7.1.4. Selectividad.....	106
7.1.5 Robustez.....	106
<b>7.2. EVALUACIÓN ESTRUCTURAL DE INSULINA EXPUESTA A     DIFERENTES TEMPERATURAS.....</b>	<b>106</b>
<b>7.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS FASE I y FASE II</b>	<b>109</b>
7.3.1. Tamaño de los Liposomas.....	109
7.3.2. Índice de Polidispersión.....	110
7.3.3. Potencial Z.....	111
7.3.4. Porcentaje de Encapsulación.....	111
<b>7.4. ESTABILIDAD DE LOS FORMULADOS.....</b>	<b>112</b>
<b>7.5. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN IN-VITRO.....</b>	<b>112</b>
<b>7.6. PRUEBAS IN-VIVO.....</b>	<b>115</b>

<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>123</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Sistemas preparados para la obtención de la curva de calibración.

**Tabla 2.** Niveles preparados para la evaluación de la precisión del sistema.

**Tabla 3.** Niveles preparados para la evaluación de la exactitud del sistema.

**Tabla 4.** Sistemas preparados para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad del método analítico.

**Tabla 5.** Sistemas preparados para la determinación de la robustez del método analítico en dos espectrofotómetros diferentes.

**Tabla 6.** Proporción de los componentes para la preparación de diferentes formulados de liposomas flexibles cargados de insulina.

**Tabla 7.** Proporción de PEG-2000 para el formulado de liposomas flexibles escogido de la fase I.

**Tabla 8.** Modelos matemáticos de disolución con sus respectivas ecuaciones de ajuste.

**Tabla 9.** Grupos experimentales de ratas wistar para el estudio de liposomas flexibles cargados con Insulina.

**Tabla 10.** Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado para la determinación de la curva de calibración para la linealidad del sistema.

**Tabla 11.** Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado para la determinación de la precisión y exactitud del sistema.

**Tabla 12.** Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado realizadas por el mismo analista en dos días completamente diferentes.

**Tabla 13.** Resultados globales para los dos días de análisis.

**Tabla 14.** Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado realizados por dos analistas diferentes en dos diferentes días.

**Tabla 15.** Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de muestras de Insulina con diferentes medios.

**Tabla 16.** Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado para la determinación de la curva de calibración para la linealidad del sistema de dos diferentes equipos de espectroscopia diferentes: Varian Cary 1E (Spectralab Analytical) y espectrofotometro SPECORD 210 (Analytik Jena, Alemania).

**Tabla 17.** Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de muestras de Insulina sometidas a diferentes temperaturas.

**Tabla 18.** Resultado de la citometria de las bandas de electroforesis obtenidas para las muestras de insulina expuestas a diferentes temperaturas y de los preparados LF3 y LF3-PEG3.

**Tabla 19.** Datos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de película delgada a las 24 horas de su fabricación.

**Tabla 20.** Datos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de calentamiento una vez terminada su fabricación.

**Tabla 21.** Datos comparativos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de película delgada y el método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación, donde se muestran los tamaños predominantes para cada uno de los preparados.

**Tabla 22.** Datos comparativos del Índice de Polidispersión (IPD) obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de película delgada y el método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación, donde se muestran el estimado para la distribución de tamaños de partículas para cada uno de los preparados.

**Tabla 23.** Datos comparativos de potencial Zeta obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de película delgada y método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación.

**Tabla 24.** Datos de porcentaje de encapsulamiento obtenidos por diferencia de mediciones espectrofotométricas del sobrenadante obtenido mediante

ultracentrifugación de las muestras y formulación completa para los preparados de liposomas flexibles elaborados mediante el método de rehidratación de película delgada y técnica de calentamiento.

**Tabla 25.** Datos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de calentamiento una vez realizada su fabricación.

**Tabla 26.** Datos comparativos del Índice de Polidispersión (IPD) obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles con PEG-2000 preparados mediante el método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación, donde se muestran el estimado para la distribución de tamaños de partículas para cada uno de los preparados.

**Tabla 27.** Datos de potencial Zeta obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de calentamiento posterior a su periodo de fabricación.

**Tabla 28.** Datos de porcentaje de encapsulamiento obtenidos por diferencia de mediciones espectrofotométricas del sobrenadante obtenido mediante ultracentrifugación de las muestras y formulación completa para los preparados de liposomas flexibles con adición de diferentes porcentajes de PEG-2000 PE elaborados mediante el método técnica de calentamiento.

**Tabla 29.** Datos de porcentaje de encapsulamiento obtenidos por diferencia de mediciones espectrofotométricas del sobrenadante obtenido mediante ultracentrifugación de las muestras y formulación completa para los preparados de liposomas flexibles con adición de diferentes porcentajes de PEG-2000 PE. <sup>a-b</sup> Las columnas con el mismo subíndice no muestran diferencias estadísticas significativas.

**Tabla 30.** Distribución de tamaño de de partícula y Potencial Z de las muestras de LF3 al día 1, 30 y 60 de almacenamiento a 4°C.

**Tabla 31.** Distribución de tamaño de de partícula y Potencial Z de las muestras de LF3-PEG3 al día 1, 30 y 60 de almacenamiento a 4°C.

**Tabla 32.** Valores farmacocinéticos obtenidos mediante el complemento de Excel DDSOLVER para los preparados LF3 y LF3-PEG3 en el medio de PBS.

**Tabla 33.** Valores farmacocinéticos obtenidos mediante el complemento de Excel DDSOLVER para los preparados LF3 y LF3-PEG3 en el medio de HCl.

**Tabla 34.** Valores de similitud ( $f_2$ ) y diferencia ( $f_1$ ) obtenidos mediante el complemento de Excel DDSOLVER para la comparación entre los preparados LF3 y LF3-PEG3.

**Tabla 35.** Ajuste matemático de algunos modelos de disolución para los preparados LF3 y LF3-PEG3, mediante el complemento de Excel DDSOLVER. En la tabla se resumen las variables obtenidas para cada uno de los modelos.

**Tabla 36.** Curvas de Glucosa obtenidas en los animales diabetizados experimentalmente y tratados con LF3 y LF3-PEG3 por diferentes vías (oral, subcutánea y transdérmica).

**Tabla 37.** Datos de Glucosa basal obtenidas en los animales sanos y sin tratamiento.

**Tabla 38.** Criterios de Aceptación para la linealidad de un sistema.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura química de la L- $\alpha$ -fosfatidilcolina

**Figura 2.** Estructura química del Colato de sodio

**Figura 3.** Estructura química del Colesterol

**Figura 4.** Estructura química del PEG-2000 PE

**Figura 5.** Procedimiento para la preparación de la curva estándar de insulina.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica metabólica que se caracteriza por una elevación anormal de la glucosa sanguínea que puede llevar a complicaciones crónicas de la micro y macro-vasculatura, incluyendo neuropatías, nefropatías, retinopatías y enfermedades cardíacas. No existe un reporte particular sobre la prevalencia de la diabetes canina en México, pero el número de pacientes diabéticos parece estar en aumento a nivel mundial. Hace aproximadamente treinta años, se diagnosticaba diabetes a 19 de cada 10000 perros que visitaban las clínicas veterinarias (Marmor et al., 1982; Guptill et al., 2003), pero para 1999, la prevalencia se había multiplicado por tres: la diabetes afectaba a 58 de cada 10000 perros (Guptill et al., 2003), para 2011 la presentación de la enfermedad aumentó en un 32% con respecto al 2006 (Bandfield Pet Hospital, 2011) y que el tiempo promedio de supervivencia de estos pacientes después de su diagnóstico es de aproximadamente dos años (Fall et al., 2007).

El tratamiento con insulina ha sido altamente específico y efectivo frente a esta enfermedad y lo que se busca es simular la secreción fisiológica de la insulina, la cual ocurre de manera continua, para mantener el nivel basal, y ocurre también de manera aguda, desencadenada por el aumento de la glicemia ocasionado por la ingesta de alimentos. Esto lleva a que en seres humanos se realice con éxito la terapia de insulina de la siguiente manera: usando una insulina de larga acción para mantener la glucemia basal y una insulina de acción rápida en el momento pre-prandial (Levin et al, 2011; Muñoz, 2014). Sin embargo, en perros es poco común que se utilice este tipo de terapia que simule esta secreción fisiológica de insulina (Melián y Pérez 2008; Greco, 2012), debido a la complejidad y la falta de flexibilidad de las pautas de insulina, el rechazo por parte de los propietarios ante la administración de múltiples dosis de insulina y el estrés que esto genera en el paciente. Tratamientos inadecuados llevan a que no se mantenga un control correcto de la enfermedad, así como una incongruente calidad de vida, llevando a reducir la expectativa de vida de estos pacientes.

Las insulinas de origen bovino y porcino fueron las primeras disponibles en el mercado. La secuencia de aminoácidos de estas se diferencia de la insulina humana por uno

(porcina) o tres (bovina) residuos de aminoácidos (Burge y Schade, 1997; Borgoño y Zinman, 2012). La adición de cantidades traza de zinc a estas insulinas resultó la producción de la primera insulina de corta acción (5-8 horas), (Scott, 1934). La duración se prolongó por primera vez de manera efectiva al adicionar protamina (Hagedorn et al., 1936). La adición de zinc a las insulinas con protamina comenzó a mostrar que se estabilizaba aún más la formulación y dio lugar a la insulina zinc protamina, la primera insulina que tuvo actividad extendida (Scott y Fisher, 1936). La insulina zinc protamina se mejoró con la adición de la protamina en proporciones estequiométricas, dando lugar a la insulina protamina neutral Hagedorn (NPH o isofánica), (Borgoño y Zinman, 2012).

Una segunda clase de insulinas de acción prolongada, las insulinas lentas, se desarrollaron por cristalización de insulina y zinc en tampón de acetato en ausencia de protamina (Hallas-Moller et al., 1957). Dos insulinas principales son el resultado de este proceso: la insulina semilenta y la insulina ultralenta (Hallas-Moller et al., 1957). Luego se desarrolló la insulina humana biosintética mediante tecnología de ADN recombinante usando *Escherichia coli* transfectada con fragmentos genéticos necesarios (Borgoño y Zinman, 2012; Burge y Schade, 1997).

Adicionalmente, se encuentran disponibles comercialmente cinco análogos de insulina: tres de acción rápida y dos de acción lenta. Los análogos rápidos son: lispro, aspartato y glulisina (Pillai y Panchagnula, 2001). Por otra parte, se encuentran los análogos lentos, los cuales son: detemir y glargina (Burge y Schade, 1997; Gilor y Graves, 2010), los cuales tienen una acción de aproximadamente 24 horas con una relativa concentración estable en seres humanos. En perros, la duración ha sido entre 18 y 24 horas (Gilor y Graves, 2010).

La terapia con insulina principalmente se ha basado en su administración por vía parenteral, la cual es una ruta exitosa, pero con ciertas limitantes también, tales como dolor, incomodidad, lipodistrofia en el sitio de aplicación e hiperinsulinemia periférica (Del Prato et al., 1994; Borgoño y Zinman, 2012). De modo que aparte de los grandes avances en dispositivos para que la aplicación de la insulina sea menos traumática y de los avances en estudios de ingeniería genética, que han llevado a desarrollar moléculas

modificadas de insulina, que ha permitido llegar a niveles de glucemia más cercanos a los normales con una menor prevalencia de hipoglucemia, también se ha dado gran importancia al estudio de rutas alternativas para la administración de insulina con los mismos fines, tales como la vía oral, bucal, nasal, rectal, pulmonar, ocular y transdérmicas (Owens et al, 2003; Peppas y Kavimandan, 2006; Lassmann-Vague y Racciah, 2006).

A continuación se describen algunos de los muchos intentos por desarrollar rutas más convenientes y cómodas para la administración de la insulina.

La cavidad nasal y la transpulmonar fueron consideradas debido a que poseen una alta absorción sistémica con respecto a otras rutas no invasivas, una amplia superficie, un delgado epitelio alveolar y actividad enzimática relativamente baja (Cefalu, 2004), pero existen dos factores que afectan la absorción, la depuración mucociliar y las enzimas proteolíticas (Owens et al., 2003). Se han realizado algunos estudios por esta vía en animales de laboratorio (Fernandez-Urrusuno et al., 1999; Simon et al., 2005; Mao et al., 2005; Goycoolea et al., 2009; Bhumkar et al., 2007; Stote et al. 2010; Zhang et al., 2001; Grenha et al., 2005; Zhang et al., 2009) y en general se obtuvieron reducciones variables de los niveles de glucosa, la mayoría con biodisponibilidad adecuada. Se incluyen una gran variedad de sistemas, como inhaladores presurizados, inhaladores de polvo seco, nebulizadores e inhaladores húmedos.

La vía transdérmica también ha sido considerada ya que ofrece la posibilidad de controlar la liberación del fármaco y se evitarían problemas como la degradación de la insulina. Sin embargo para optimizar la administración transdérmica se ha implicado la ruptura o la eliminación de la barrera lipídica de la piel por una variedad de métodos químicos, eléctricos, o físicos (Pinto Reis y Damgé, 2012; Owens et al, 2003). Un gran número de potenciadores de la absorción química han permitido la mejora limitada de absorción, pero con limitantes, como la irritación de la piel y la incapacidad para liberar moléculas grandes (Chen et al., 2006; Guo et al., 2000). Adicionalmente se ha involucrado tecnología avanzada como la iontoforesis, electroporación y sonoforesis (Kanikkannan et al., 1999; Lassmann-Vague y Racciah, 2006). Sin embargo, sólo por

esta vía han sido evaluados una serie de liposomas flexibles o transfersomas que han permitido el transporte de moléculas tanto de alto como de bajo peso molecular, y tienen la habilidad de deformarse para atravesar las membranas de manera intacta (Cevc et al., 1998; Cevc, 2003; Rajan et al., 2011). Entre estas moléculas se incluyó la insulina en algunos estudios, donde se observaron efectos terapéuticos sin causar alteraciones en la zona dérmica de aplicación (Cevc et al., 1998; Jadupati et al., 2012).

La vía rectal y la vaginal han sido consideradas porque evitan la degradación enzimática local de la insulina al entrar a circulación sistémica, a través del sistema linfático (Lassmann-Vague y Racciah, 2006), pero, la absorción y la biodisponibilidad es baja en seres humanos (4-10%), (Owens et al, 2003).

Un pequeño número de estudios también han evaluado la vía ocular (Bartlett et al., 1994; Morgan et al., 1996; Xuan et al., 2007), donde se han observado muchas reacciones locales. Lee y Yalkowsky (1999) utilizaron en conejos un dispositivo a base de una esponja de gelatina absorbible (Gelfoam®) con una eficiente absorción sistémica de la insulina. La desventaja es la baja absorción y las reacciones adversas locales graves (Owens et al, 2003).

Debido a que la mucosa bucal tiene una excelente accesibilidad, baja actividad enzimática y un área extensa de absorción con elevada vascularización también ha sido considerada como una ruta alternativa para la administración de insulina. Ishida et al., (1981) desarrolló un sistema de liberación mucoadhesivo en la mucosa bucal de perros beagle, ocasionando una salivación excesiva en los animales. También se ha desarrollado un aerosol bucal con efecto hipoglucemiante por 4 horas en ratas y conejos diabéticos (Xu et al., 2002; Modi et al., 2002; Cernea et al, 2005).

Pero, es la vía oral la que se considera como la más conveniente fisiológicamente, ya que la insulina absorbida por el intestino alcanza el hígado a través de la vena porta y puede inhibir directamente la glucosa hepática, ya que el efecto de la insulina en el hígado es vital para mantener la homeostasis de la glucosa (Peppas y Kavimandan, 2006), con la administración parenteral solo el 20% de la insulina administrada llega al

hígado. Sin embargo, la insulina por vía oral es inestable en el tracto gastrointestinal, se degrada por enzimas proteolíticas y no se absorbe bien en el intestino por el carácter hidrófilo y el gran tamaño de las moléculas (Spangler, 1990).

Para evitar la degradación de la insulina, se han desarrollado nanopartículas con polímeros naturales y sintéticos, con el fin de encapsular la insulina. Damgé et al., (1988) utilizó un polímero coloidal biodegradable, en nanocápsulas que redujeron los niveles de glucosa sanguínea en ratas diabéticas y evitaron la degradación de la insulina, además facilitaron su absorción intestinal. Radwan (2001), Cournarie et al., (2002), Rawdan y Aboul-Eneir (2002), Mesiha et al., (2005), Pinto Reis et al., (2006), Cui et al., (2006 y 2007) y Damgé et al., (2007) realizaron mezclas de polímeros y se logró mejorar la biodisponibilidad. Se han utilizado polímeros naturales con diferentes técnicas y diferentes mezclas con aumentos en la biodisponibilidad de la insulina en ratas diabéticas, pero tiempos de liberación muy variables (Sarmiento et al. 2007; Pinto Reis et al., 2007; Reis et al., 2008; Pan et al., 2002; Cheng y Lim, 2004).

Se han trabajado también formulaciones de insulina por vía oral basadas en nanopartículas lipídicas o liposomas, ya que estas tienen varias ventajas sobre otros sistemas debido a que presentan muy poca o ninguna toxicidad, son sistemas biodegradables. Se han reportado reducciones variables en la glucosa de los sujetos experimentales de acuerdo a las diferentes características de las formulaciones, su composición lipídica, la ausencia o presencia de surfactante, el tamaño, la carga de la superficie y el estado físico de los fosfolípidos usados (Dalgé, 1991; Carino, 1999; Choudhari et al., 1994; Kisel et al., 2001). Sin embargo se ha notado que los liposomas por sí solos son más susceptibles a la degradación enzimática y a la disolución por sales biliares por lo cual se han probado técnicas de polimerización, recubrimientos con algunos polímeros e incorporación de algunas sustancias químicas.

Los liposomas para el transporte de insulina se han utilizado como un medio para administrar la insulina directamente al hígado a partir de un sitio de la inyección periférica, mejorar la absorción de la insulina administrada por vía oral y prolongar la acción de la insulina (Arouri et al., 2012). Aunque la literatura científica no está repleta

de ejemplos de la administración de insulina a través de liposomas, se han realizado algunos estudios sobre este tema que comentaré más adelante. Sin embargo, para poder entender el fundamento de porqué se consideran útiles los liposomas para la administración de la Insulina hay que tener en cuenta algunos eventos fisiológicos del organismo.

Se debe tener en consideración el hecho de que el drenaje normal del páncreas endocrino está en la vena porta y que el hígado comprende el mayor sitio de depuración para la insulina (remoción de ~ 50 % en un solo paso), lo que conduce a que el hígado este expuesto a concentraciones mucho más altas de insulina que los tejidos periféricos (Spangler, 1990). Por ende, la inyección subcutánea de insulina resulta en una condición no fisiológica, debido que los tejidos periféricos se exponen a concentraciones más altas de insulina que el hígado.

La hiperglucemia en ayunas que experimentan los diabéticos tipo I y tipo II es una consecuencia de la tasa basal de la producción de glucosa hepática (GH) superior a la tasa basal de la utilización de glucosa extrahepática (GEH). La tasa de producción de GH se rige en parte por la insulina, por lo que la insulina sirve como un potente inhibidor de la producción de glucosa hepática. En los diabéticos tipo I, la excesiva producción de GH es una consecuencia de la secreción insuficiente de insulina. En pacientes diabéticos tipo II, la excesiva producción de glucosa hepática resulta de falta de sensibilidad hepática a la acción de la insulina. La utilización de glucosa en estado de ayuno es principalmente un proceso independiente de la insulina que abarca la captación de glucosa por el sistema nervioso central (50 %) y tejidos esplácnicos (25 %). Sólo una fracción (25 %) de la utilización de glucosa en ayunas es el resultado de la captación insulino - dependiente de la glucosa por la grasa y el músculo (DeFronzo et al., 1983; Spangler, 1990, 2006). Por lo tanto, la hiperglucemia en ayuno en individuos diabéticos tanto tipo I como tipo II no es una consecuencia de la utilización de glucosa periférica alterada sino que es el resultado de una “insulinización” hepática inadecuada, lo que resulta en que la tasa de producción glucosa hepática supere a la tasa de utilización de glucosa periférica (Spangler, 1990, 2006.).

Varios estudios han establecido el valor de “insulinización” hepática adecuada en el manejo de la diabetes mellitus. Goriya et al. (1980) comparó los efectos de la administración de insulina portal frente a la administración periférica en perros diabéticos pancreatectomizados. Los resultados de los estudios indicaron que los perros diabéticos tratados a través de la infusión de insulina intraportal requieren 20% menos insulina para lograr el control a largo plazo de la glucemia que los perros tratados a través de la infusión de insulina periférica (Spangler 2006).

Stevenson y Alberti (1980) encontraron que la administración intraportal de insulina para normalizar la producción de glucosa hepática requiere de una dosis mucho más baja que la insulina periférica. Determinaron que el reciclaje de glucosa podría ser normalizado a través de la insulina intraportal, pero se encontró que la tasa de reciclaje es significativamente menor durante las infusiones de insulina periféricas, presumiblemente debido al efecto de la insulina en los tejidos periféricos. Estos estudios ilustran la necesidad de mantener una insulinización hepática adecuada en los individuos diabéticos sin incurrir hiperinsulinemia periférica (Spangler, 1990).

Spangler et al., (1986) encapsuló la insulina en unos liposomas con afinidad hacia el hígado y realizó sus pruebas en perros diabéticos, estos estudios demuestran claramente que la insulina encapsulada en vesículas lipídicas y específica a los hepatocitos puede insulinizar selectivamente el hígado de los perros diabéticos. Esto se evidencia por la capacidad de estos liposomas para inducir la captación de glucosa hepática en ausencia de cualquier cambio significativo en la tasa de glucosa extrahepática. Las tasas de utilización de la glucosa hepática y extrahepática eran idénticas a las observadas con la insulina intraportal. Estudios similares se realizaron con seres humanos, donde se concluyó que la administración de la insulina en liposomas es mucho más efectiva que la administración de insulina de manera intraportal y la razón de esto es que los liposomas no sólo llevan a la insulina directamente al hígado, sino que también actúan como escudo en la interacción de la insulina con los tejidos periféricos (Ferrannini et al., 1980). Estos estudios tienen el gran limitante de que fueron probados por vía intravenosa en la vena hepática de los sujetos de estudio, lo cual no es práctico ni cómodo para los pacientes diabéticos. Por esta razón se comenzó a probar la



encapsulación de la insulina en liposomas para administración por vía oral y se probaron en ratas y perros con diabetes inducida experimentalmente (Patel y Ryman, 1976; Dapergolas y Gregoriadis, 1976; Patel et al., 1982), en estos estudios en general no se pudo obtener una reducción significativa de la glucosa, pero si aumentaron los niveles de insulina inmunoreactiva circulante, pero cuando estos liposomas fueron administrados directamente en el duodeno, se observó una reducción significativa de la glucemia de estos animales. Se probó esta misma aplicación de liposomas de insulina por vía subcutánea y se mostró que el tiempo de liberación de la insulina aumentó (Spangler et al., 1986).

Zhang et al. (2005) realizó una modificación en la lecitina que agregó a los liposomas ya que previamente se había reportado que ésta genera bioadhesión a los tejidos, encapsuló en ellos insulina y la administró por vía oral, sin embargo en este caso no se consiguió una buena biodisponibilidad.

Iwanaga et al., (1997) comenzó a utilizar liposomas recubiertos con polímeros con los cuales consiguió la reducción de los niveles de glucosa por periodos no muy largos en ratas. Park et al., (2007; 2011), introdujo la insulina en unos liposomas catiónicos y algunos se adicionaron con un polímero, estos últimos mostraron mejor encapsulamiento y mostraron *in-vitro* mejores tiempos de liberación. Estos estudios han mostrado que los liposomas adicionados con un polímero han mostrado estabilidad *in-vitro* (Blume y Cevc, 1990) así como en circulación sanguínea (Gabizon y Martin, 1997), lo cual contribuye a la liberación sostenida de los fármacos que se encapsulan. En 2014, Zhang y colaboradores reportaron que la adición de fosfolípidos conjugados con biotina a los liposomas, generan buenos resultados en la liberación de la insulina por vía oral. Çilek et al., (2005) probó realizar una emulsión para la administración oral de insulina con liposomas, Katayama et al., (2003) realizó unos liposomas dobles y Goto et al., (2006) unos liposomas fusogénicos consiguiendo en todas una baja biodisponibilidad. Katsuma et al., (2005) probó unos liposomas con afinidad por el colón en perros, obteniendo una biodisponibilidad mínima. Kisel et al., (2001) realizó diferentes mezclas de lípidos en la formación de los liposomas encontrando

hiperinsulinemia con todos los preparados pero sin mayor correlación con los niveles de glucemia en ratas.

De esta manera, y considerando lo anterior en este estudio se trabajó en el desarrollo de una forma de liberación modificada de insulina mediante su inclusión en liposomas flexibles, ya que estos han mostrado que protegen los fármacos de la degradación y mejoran la absorción a través de las mucosas gastrointestinales, además realizó la inclusión de polímeros a estos, ya que con esto se han mostrado mejoras en el tiempo de liberación, mejoras en la estabilidad y en la eficiencia de encapsulación así como evasión de respuesta inmunológica (Blume y Cevc, 1990; Spangler, 1990; Simões et. al., 2004; Park et. al, 2011). Sin embargo la eficiencia de encapsulamiento puede llegar a variar de acuerdo a algunos factores de la composición y el proceso de fabricación, no obstante se muestran relativamente buenas eficiencias de encapsulación, considerando que los liposomas fueron obtenidos mediante el método de rehidratación de película delgada en los siguientes casos, 82,5% (Zhang et. al., 2005), 70% (Kisel et. al., 2001), 61% (Degim et. al., 2004). Sin embargo, Park y colaboradores (2011) realizaron un estudio de eficiencia de encapsulamiento de insulina todos con el método de fabricación previamente nombrado, únicamente cambiando los agentes rehidratantes, donde se obtuvo la mejor eficiencia usando sacarosa al 10%, obteniendo encapsulamiento de 74%, mientras que usando PBS se obtuvo de 50%.

Adicionalmente, los liposomas llamados ultraflexibles o transfersomas han mostrado que tienen la habilidad de deformarse para atravesar las membranas de manera intacta y que el transporte de insulina se ha mostrado adecuados efectos terapéuticos sin causar alteraciones en la zona de aplicación (Cevc et al., 1998; Cerv, 2003; Jadupati et al., 2012). Sin embargo, no han sido probados por ninguna otra vía distinta a la dérmica, considerando sus características deformables y los efectos hallados con insulina, consideramos que el efecto flexible de estos debe ser útil por cualquier otra membrana biológica, de modo que nuestro objetivo es evaluar este tipo de liposomas por vías alternas, transportando insulina, con el fin de reducir la degradación que ocurre por vías como la oral y así mismo disminuir el traumatismo en la aplicación.

Obtener rutas alternativas de insulina puede llegar a ser muy útil en el tratamiento de la diabetes mellitus en todas las especies. Sin embargo hay que considerar las ventajas y desventajas que trae consigo cada ruta de administración y de este modo seguir desarrollando nuevos o mejorados métodos para optimizar el uso de la insulina en estos pacientes. A pesar de la gran cantidad de investigación que se ha realizado en este campo y las formulaciones que se han realizado, la gran mayoría se han evaluado con pruebas *in-vitro* y solo en algunos casos se han usado animales de laboratorio. Además, los pocos estudios que se han realizado en seres humanos se han realizado con insulinas de corta e intermedia acción, considerando muy poco las insulinas de larga acción (Dangé et al., 2008; Heinemann, 2011; Iyer et al., 2010). Adicionalmente hay que considerar que la insulina no es tóxica, pero todos los compuestos químicos y excipientes que se emplean pueden llegar a serlo, por eso deben considerarse formulaciones que sean seguras y efectivas en los pacientes, sobre todo a largo plazo, ya que son medicaciones que suelen ser administradas de por vida.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1. Diabetes Mellitus Canina**

La diabetes Mellitus es una enfermedad que se caracteriza por una deficiencia relativa o absoluta de insulina por parte de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. La insulina es necesaria para transportar glucosa a las células del organismo, donde es transformada en energía a través de la glicolisis o almacenada como glucógeno. La falta de insulina lleva a que se acumule la glucosa en la sangre, lo que causa hiperglucemia (Cathpole et al., 2008; Feldman y Nelson, 2000).

### **2.2. Clasificación de la diabetes mellitus**

No existe una clasificación única y particular para la diabetes canina, por ende su clasificación se basa en la clasificación que existe para la diabetes humana (Catchpole et al., 2008):

#### *Diabetes Mellitus Tipo I o Insulino dependiente:*

Comúnmente es una enfermedad de inicio juvenil asociada a deficiencia de insulina usualmente resultante de una destrucción autoinmune de las células beta del páncreas. Estos pacientes pueden llegar a desarrollar cetoacidosis y requieren de terapia con insulina para el control de su hiperglucemia.

#### *Diabetes Mellitus Tipo II o no dependiente de insulina:*

Este tipo de diabetes se inicia usualmente en la edad adulta y es causada por una combinación de deficiente secreción de insulina y una reducida sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos. Esta alteración es usualmente asociada a obesidad e inactividad física. La hiperglicemia en estos pacientes usualmente puede modificarse con dieta e hipoglucemiantes orales.

#### *Diabetes Gestacional*

#### *Diabetes de otros orígenes específicos:*

- Defectos genéticos de la función de las células beta
- Defectos genéticos en la acción de la insulina

- Enfermedades de páncreas exocrino
- Otras enfermedades endócrinas
- Diabetes inducida por fármacos o químicos
- Infecciones
- Diabetes inmunomediada

Sin embargo esta clasificación no es del todo útil en perros diabéticos, ya que todos los perros requieren tratamiento con insulina. De modo que se ha hecho una propuesta de clasificación en caninos en base a las causas subyacentes de la hiperglicemia, donde se considera una diabetes por deficiencia de Insulina, que ocurre por falta de producción de insulina por parte de páncreas (deficiencia absoluta de la Insulina) y diabetes causada por resistencia a la insulina, que ocurre por una inadecuada función de la insulina sobre los tejidos (deficiencia relativa de la Insulina), (Imamura et al., 1988; Greco, 2012; Catchpole et al., 2005 y 2008).

*Diabetes causada por deficiencia de Insulina (deficiencia absoluta de insulina):*

En perros se caracteriza por una pérdida progresiva de las células beta del páncreas. La etiología de la deficiencia/destrucción de las células beta del páncreas en perros diabéticos, es desconocida aun, pero se sugieren que están involucrados algunos procesos, tales como:

- Hipoplasia congénita de células beta.
- Pérdida de células beta asociada a enfermedades de páncreas exocrino (ej: pancreatitis).
- Destrucción inmuno-mediada de células beta.
- Procesos idiopáticos.

*Diabetes causada por resistencia a la insulina (deficiencia relativa a la insulina):*

Usualmente ocurre por antagonismo de la insulina con otras hormonas del organismo, los perros con este tipo de diabetes pueden llegar a desarrollar diabetes por deficiencia de insulina como consecuencia de pérdida de células beta asociado a hiperglicemia

incontrolada. Los procesos involucrados en la diabetes por resistencia a la insulina incluyen:

- Diabetes gestacional / Diestro
- Secundaria a otras endocrinopatías
  - Hiperadrenocorticismo
  - Acromegalia
  - Hipotiroidismo
  - Feocromocitoma
- Desordenes nutricionales
  - Obesidad
- Iatrogenia
  - Glucocorticoides sintéticos
  - Progestágenos sintéticos

En términos generales, la diabetes se clasifica de acuerdo a los mecanismos fisiopatológicos que afectan las células beta, en tipo I o insulino dependiente y tipo II o no dependiente de insulina, recordando que la tipo I es una combinación de predisposición genética y destrucción inmunológica de las células beta, con insuficiencia gradual y luego definitiva de insulina, mientras que la tipo II se caracteriza por resistencia a la insulina y células beta disfuncionales.

### **2.3. Manifestación clínica**

Suele presentarse en perros de mediana edad (5-12 años). Existe una predisposición genética en algunas razas de perros como samoyedos, algunos terriers (Cairn, tibetano, yorkshire, west highland white), poodles, schnauzers, labrador retriever, dash hounds (Catchpole et al., 2008; Hoenig, 2002)

También se sugiere que la presentación es más frecuente en hembras enteras que en machos, se ha estimado que las hembras representan el 70% de los casos. La diabetes en las hembras enteras se asocia con la fase dominante de progesterona del diestro (Greco, 2012; Catchpole et al., 2005).

La deficiencia de insulina tiene como consecuencia una alteración del metabolismo de los carbohidratos, de las grasas y de las proteínas. El metabolismo glucídico anormal se traduce en una hiperglucemia y una glucosuria y es el responsable de la poliuria-polidipsia y de la formación de las cataratas que se observan en los perros diabéticos. La hiperlipidemia, la producción de cetonas y las alteraciones hepáticas observadas en estos perros son consecuencia de las alteraciones en el metabolismo de las grasas. La reducción de la utilización de la glucosa, los aminoácidos y los ácidos grasos tiene numerosas y variadas consecuencias: letargia, pérdida de peso, menor estimulación del centro de la saciedad, consumición muscular, mala calidad del pelaje y disminución de las defensas, características, todas ellas, típicas de los perros diabéticos que no están en tratamiento (Greco, 2012; Catchpole et al., 2005; Feldman y Nelson, 2000).

Si la diabetes no se controla puede llevar a la acumulación de cuerpos cetónicos lo que puede llevar a una acidosis metabólica y causar depresión, anorexia, vómito, deshidratación y en algunos casos resultar en muerte por severa hipovolemia y colapso circulatorio.

#### **2.4. Tratamiento**

Una vez determinada la enfermedad, el tratamiento principalmente tiene como objetivo el control de los signos clínicos, prevenir las complicaciones como las cataratas, las retinopatías, la neuropatía, la cetoacidosis entre otras y mantener las concentraciones de glucosa en sangre lo más estables posibles. El tratamiento principal para tratar a los perros diabéticos consta de una adecuada insulino terapia, pero se debe complementar con una adecuada nutrición, ejercicio y adecuada información del propietario (Feldman y Nelson, 2000).

En el tratamiento con la insulina existen dos periodos importantes, el periodo de estabilización y el periodo de mantenimiento, en la primera fase se controla la respuesta a la insulina y se ajusta la dosis y la dieta hasta que se consiga un nivel de glucemia aceptable, la segunda fase la dosis de la insulina y de la dieta no suelen modificarse,

pero se debe mantener un control de la glicemia de manera periodica (Greco, 2012; Catchpole, 2008).

#### **2.4.1. Insulina**

La insulina se implementó como tratamiento para la diabetes en los seres humanos desde 1922 (Best, 1956). A partir de 1989, aproximadamente el 40 % de los 8 millones de estadounidenses diagnosticados con diabetes recibían insulina como un parte de su terapia (Massey et al., 1989). La terapia con insulina tiene como objetivo reemplazar la hormona de manera que se reproduzca la secreción de insulina lo más similar posible a la fisiológica y de ese modo conseguir la restauración de las concentraciones normales de glucosa en la sangre, suprimir la cetogénesis y mantener la salud de los pacientes afectados con diabetes (Borgoño y Zinman, 2012; Pillai y Panchagnula, 2001). Aunque estos objetivos se han mantenido relativamente constantes a lo largo de los años, los principios y la práctica de la terapia con insulina se han ido mejorando continuamente a medida que se han obtenido conocimientos sobre su actividad farmacológica y sus efectos celulares, así como ha aumentado la disponibilidad de nuevas formulaciones farmacéuticas de insulina.

#### **2.4.2. Fisiología de la insulina**

La insulina es secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas. Llega al hígado a través de la circulación portal y luego se extiende al resto del cuerpo y alcanza sus otros órganos diana, principalmente el músculo esquelético y tejido adiposo. La síntesis y secreción de insulina se estimulan predominantemente por los aumentos en las concentraciones de glucosa en la sangre, pero el grado en el que las células beta responden a la glucosa es modificado por muchos otros factores, incluyendo nutrientes, hormonas y estimulación nerviosa (Ahren y Taborsky, 2002; Burge y Schade, 1997; Borgoño y Zinman, 2012).

La secreción de insulina endógena se puede dividir en dos fases: la fase basal, en el que la insulina es secretada continuamente a una velocidad relativamente constante, y la fase de bolo, en el que la insulina se secreta en respuesta a nutrientes. El papel principal de la



secreción de insulina basal es para limitar la lipólisis y la producción hepática de glucosa en estado de ayuno (Owens y Bolli, 2008; Pillai y Panchagnula, 2001).

La insulina postprandial suprime principalmente la producción de glucosa hepática y estimula la utilización de glucosa por el músculo, evitando así la hiperglucemia después de las comidas. La concentración de glucosa en sangre postprandial también está determinada en gran medida por otros factores tales como el hidrato de carbono, grasa y el contenido de proteína de la comida, el tiempo de tránsito gastrointestinal y los efectos de glucagón. En materia de salud, la secreción de insulina se ajusta constantemente para trabajar en conjunto con estos otros factores para mantener la normoglucemia (Owens y Bolli, 2008; Burge y Schade, 1997).

### **2.4.3. Tipos de insulina**

#### ***2.4.3.1. Insulinas de origen animal***

Las insulinas de origen bovino o porcino fueron las únicas disponibles en el mercado durante los primeros cincuenta años de la era de la insulina. La secuencia de aminoácidos de las insulinas de origen animal se diferencia de la de la insulina humana por uno (porcina) o tres (bovina) residuos de aminoácidos. Sin embargo, estas insulinas son absorbidas adecuadamente en la circulación sistémica humana tras la inyección subcutánea y llegan a proporcionar un control razonable de la glucosa plasmática (Burge y Schade, 1997; Borgoño y Zinman, 2012).

Sin embargo a pesar del gran éxito de dichas insulinas, existen algunas limitaciones, estas incluyen reacciones alérgicas a las impurezas presentes en las formulaciones o la propia molécula de la insulina, la inducción de niveles clínicamente significativos de gamma globulina que pueden alterar la actividad de la insulina inyectada, la variabilidad en las características de absorción de diversas preparaciones comerciales y la inducción de una reacción cutánea con lipoatrofia (Chance et al., 1976; Davidson y Debra, 1978; Teuscher, 1974).

Las primera insulinas preparadas comercialmente de origen porcino y bovino eran soluciones amorfas producidos mediante una combinación de extracción de alcohol y

precipitación de ácido (Banting et al., 1922) La adición de cantidades traza de zinc para este proceso resultó en la formación de cristales de insulina y la producción de la primera insulina de corta acción (5-8 horas), por lo cual, se requiere una dosificación más frecuente (Scott, 1934).

La duración de la aplicación de la insulina por vía subcutánea se prolongó por primera vez de manera efectiva al adicionar protamina a los complejos de insulina, una proteína básica obtenida de peces (Hagedorn et al., 1936). El complejo protamina - insulina es poco soluble a un pH fisiológico y por lo tanto se absorbe lentamente desde el tejido subcutáneo. La adición de zinc a las insulinas con protamina comenzó a mostrar que se estabilizaba aún más la formulación y dio lugar a la insulina zinc protamina, la primera insulina que tuvo actividad extendida. (Scott y Fisher, 1936). La Insulina zinc protamina se mejoró mediante la adición de la protamina en proporciones estequiométricas, dando lugar a la insulina protamina neutral Hagedorn (NPH o isofánica). La insulina NPH tiene un pico de acción a las 6 a 10 horas y una acción que puede llegar a durar hasta 24 horas (Krayenbuhl y Rosenbery, 1946)

Una segunda clase de insulinas de acción prolongada, las insulinas lentas, se desarrollaron en la década de 1950 por cristalización de insulina y zinc en tampón de acetato en ausencia de protamina (Hallas-Moller et al., 1957). Estos complejos cristalinos se disuelven poco en los fluidos corporales humanos y por lo tanto exhiben una duración prolongada después de la inyección subcutánea. Dos insulinas principales son el resultado de este proceso: la insulina semilenta que es un precipitado amorfo que tiene un pico y una duración de la acción ligeramente más larga que el de la insulina regular; y la insulina ultralenta que es una insulina cristalina que muestra mayor estabilidad, un pico más bajo y una duración más larga de acción que las otras insulinas disponibles en ese entonces. Comercialmente, la insulina lenta tiene un tiempo de acción muy similar a la NPH, y es en realidad una mezcla de 70 % ultralenta y 30 % semilenta (Hallas-Moller et al., 1957).

#### **2.4.3.2. La insulina humana**

La insulina humana biosintética se empezó a comercializar a principios de 1980 como resultado del perfeccionamiento de las técnicas microbiológicas. La producción de la primera insulina humana mediante tecnología de ADN recombinante implicaba la producción por separado de las cadenas A y B de la molécula de insulina por *Escherichia coli* transfectadas con los fragmentos genéticos necesarios, seguido por la posterior combinación bioquímica de las dos cadenas de la insulina para producirla intacta. En esta insulina un residuo de alanina en la posición B29 de la insulina de cerdo fue reemplazado con un residuo de treonina para producir esta insulina que se denomina insulina semisintética humana (Borgoño y Zinman, 2012; Burge y Schade, 1997).

La insulina humana biosintética se produce actualmente por medio de *E. coli* transfectadas con ADNc para toda la molécula de proinsulina. Después de la transcripción y traslación, la proinsulina resultante se purifica y posteriormente es tratada de manera enzimáticamente para producir insulina humana y C-péptido. Este proceso permite el plegado después de la traducción natural del péptido y se asegura que la estructura tridimensional apropiada está presente en la molécula de insulina. La insulina humana biosintética también se produce usando un gen de la proinsulina no humano insertado en el genoma de la levadura del pan, con la modificación post-traduccional del péptido resultante para producir la insulina humana (Burge y Schade, 1997, Pillai y Panchagnula, 2001; Borgoño y Zinman, 2012).

#### **2.4.3.3. Insulinas Análogas**

En la actualidad se encuentran disponibles comercialmente cinco análogos de insulina: tres de acción rápida y dos de acción lenta. Los análogos rápidos son: lispro, aspartato y glulisina (Pillai y Panchagnula, 2001).

La insulina lispro fue aprobada por la FDA en 1998, se invirtió el orden de dos aminoácidos en la cadena beta de la insulina. La prolina pasó a la posición 29 y la lisina a la 28, invirtiendo su orden natural (Griffin et al., 2001; Pillai y Panchagnula, 2001)

La insulina aspartato comenzó a comercializarse en 1999, tiene como particularidad la inserción de un ácido aspártico cargado negativamente en la posición 28 de la cadena beta (Home et al., 2000).

En la insulina glulisina, la asparragina fue sustituida por lisina en la posición 3 de la cadena beta y la lisina por ácido glutámico en la posición 29 de la misma cadena (Ampudia-Blasco et al., 2005).

Sin embargo no hay disponibles reportes donde se realice tratamiento crónico de la diabetes en perros con estas insulinas, pero si se han utilizado con éxito para el manejo de la cetoacidosis (Matsuo et al., 2003; Sears et al., 2009; 2012).

Por otra parte, se encuentran los análogos lentos, los cuales son: detemir y glargina. En la insulina detemir la unión de ácido mirístico al aminoácido lisina en la posición B29 confiere una mayor estabilidad a la forma hexamérica, lo que contribuye a retardar su absorción (Burge y Schade, 1997; Gilor y Graves, 2010).

Además, esta cadena lateral facilita la unión a la albúmina plasmática enlenteciendo su disociación a la forma libre, que es la biológicamente activa (Arranz et al., 2004). La insulina detemir inhibe la glucosa hepática de manera más efectiva que otras insulinas, la lipogénesis del tejido adiposo se disminuye y la ganancia de peso es mínima. En Humanos tiene una duración aproximada de 20 horas (Heise y Pieber, 2007; Gilor y Graves, 2010).

La insulina glargina resulta de la sustitución de asparragina por glicina en la posición B21 y de la adición de dos residuos de arginina en el extremo C terminal de la cadena beta de la molécula (Gilor y Graves, 2010; Heise y Pieber, 2007; Mori et al., 2008).

Esta insulina en seres humanos ha tenido una acción de aproximadamente 24 horas con una relativa concentración estable. En perros, la duración de esta insulina fue similar, tuvo acción entre 18 y 24 horas (Heise y Pieber, 2007; Mori et al., 2008).

## 2.5. Lípidos

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas que se caracterizan por la presencia de una o varias cadenas hidrocarbonadas (en algún caso formando ciclos fusionados), que presentan uno o varios grupos polares en un extremo de la molécula. Comúnmente son hidrofóbos, insolubles en agua y liposolubles, solubles en disolventes (Small, 1896; (Mckee y Mckee, 2009).

Los lípidos cumplen funciones biológicas diversas, principalmente, almacenamiento de energía, ser componente de las membranas celulares y moléculas de señalización, entre otras. Los lípidos, en función de su reactividad con las bases fuertes, acorde al contenido de ácidos grasos dentro de su estructura, se clasifican en saponificables y no saponificable. Los lípidos saponificables pueden ser simples o complejos, los primeros son los ácidos grasos, acilglicéridos y céridos, mientras que los complejos incluyen los fosfolípidos y los glucolípidos, estos lípidos saponificables contienen cadenas largas de ácido carboxílico, son ácidos grasos que esterifican una molécula ya sea el glicerol o la esfingosina. Los no saponificables se dividen en terpenos, esteroides y prostaglandinas (Mckee y Mckee, 2009; Arg Argüeso Armesto R, Díaz Díaz JL, Díaz Peromingo JA, Rodríguez González A, Castro Mao M, Diz-Lois F. Lípidos, colesterol y lipoproteínas. Galicia Clin 2011; 72 (Supl. 1): S7-S17eso et al., 2011).

### 2.5.1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son los componentes estructurales más importantes de las membranas. Los fosfolípidos son ésteres de glicerol con ácidos grasos ( $R-COOH$ , donde R es una cadena hidrocarbonada muy variada) en los que una molécula de glicerol sin carga, se une a dos ácidos grasos (1,2- diacilglicerol) y a un grupo fosfato. Existen dos tipos de fosfolípidos: los fosfoglicéridos y las esfingomielinas. Los fosfoglicéridos son moléculas que contienen glicerol, ácidos grasos, fosfato y un alcohol. Las esfingomielinas se diferencian de los fosfoglicéridos en que contienen esfingosina en lugar de glicerol (Mckee y Mckee, 2009).

La gran mayoría de fosfolípidos son agentes emulsionantes y agentes superficiales activos. Los fosfolípidos son muy adecuados para estas funciones debido a que, al ser sales de ácidos grasos, son moléculas anfipáticas. El dominio hidrófobo está formado en gran parte por las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos; el dominio hidrófilo, que se denomina grupo de cabeza polar, contiene fosfato y otros grupos cargados o polares. Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas cuya parte hidrófoba (repele al agua) está constituida por las cadenas hidrocarbonadas de carácter neutro y el componente hidrófilo (afín al agua) es la cabeza del fosfolípido que posee carga eléctrica (Argüeso et al., 2011).

Los fosfolípidos, al igual que todas las moléculas de carácter anfifílico pueden clasificarse según la cabeza polar como aniónicos (cabeza polar negativa), catiónicos (cabeza polar positiva), zwitteriónicos y no iónicos (cabeza polar sin carga), (Meyer y Richter, 1998; Mckee y Mckee, 2009). La longitud y grado de insaturación (enlaces dobles existentes en las cadenas) presente en la cadena hidrocarbonada es un factor importante. Estos dos parámetros van a marcar la flexibilidad de la membrana.

Cuando los fosfolípidos se suspenden en agua, se reagrupan de manera espontánea en estructuras ordenadas que al formarse provocan que los grupos hidrófobos de los fosfolípidos queden dirigidos hacia el interior. Al mismo tiempo, los grupos de cabeza hidrófilos se orientan de forma tal, que quedan expuestos al agua. Cuando hay moléculas de fosfolípidos en una concentración suficiente, forman capas bimoleculares. Esta propiedad de los fosfolípidos (y de otras moléculas lipídicas anfipáticas) es la base de la estructura de las membranas (Small, 1896; Mckee y Mckee, 2009).

Desde el punto de vista del comportamiento térmico los fosfolípidos pueden encontrarse en forma gel (alta temperatura) o en forma cristalina (baja temperatura). La temperatura que marca el paso de una fase a otra se denomina temperatura de transición,  $T_m$ , y es característica de cada lípido puesto que depende directamente del tamaño de las cadenas, presencia de insaturaciones y de la naturaleza de la cabeza polar (Meyer y Richter, 1998).

## 2.6. Liposomas

Los liposomas se descubrieron en 1961 (Bangham, 1961) quienes observaron que algunos lípidos forman estructuras membranosas cuando están en disolución acuosa. Estas estructuras vesiculares altamente organizadas están constituidas por lamelas o bicapas lipídicas concéntricas que encierran un interior acuoso (Bangham 1968; Simon, 1986). Para su elaboración se utilizan fosfolípidos con o sin la incorporación de colesterol, tocoferol, sondas fluorescentes u otros materiales, introducidos en la bicapa lipídica con el fin de dotar a las vesículas de alguna propiedad particular como puede ser carga superficial, reducir la permeabilidad de la membrana o incrementar la estabilidad de los lípidos en la bicapa (Bangham 1968). En los años 70, se inició el estudio sobre el potencial que presentan estos como sistemas de liberación de fármacos o de otras moléculas bioactivas (Vemuri, 1995). Los liposomas son capaces de incorporar a su estructura moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas y también las de carácter anfifílico. Además algunas de sus propiedades físicas como carga superficial, tamaño, permeabilidad y rigidez de la pared, o su capacidad de carga son fácilmente modulables debido a la amplia variedad de fosfolípidos que existen. Por último, si se utilizan lípidos funcionalizados, se pueden unir anticuerpos (Gregoriadis 1992, 1995) u otros ligandos a la superficie del liposoma, lo que les convierte en sistemas que pueden acceder con mayor facilidad a determinados tejidos, por ejemplo tumores (Lian, 2001).

### **3. HIPOTESIS**

1. “Si se usan liposomas como transportadores de Insulina se disminuye la degradación de esta al ser administrada por vía oral y si además se agrega un tensoactivo entonces mejorará su absorción gastrointestinal y aumentará su biodisponibilidad”
2. “Si se agrega un polímero conjugado como PEG a los liposomas flexibles, se aumentará su tiempo de residencia en el organismo con respecto a las liposomas sin PEG”



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Diseñar y evaluar un transportador de insulina basado en liposomas flexibles mediante pruebas pre-clínicas en un modelo experimental de diabetes Mellitus en ratas Wistar, dirigido al tratamiento de diabetes mellitus tipo I en perros.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Realizar la validación del método analítico para la cuantificación de insulina mediante el uso de espectrofotometría UV.
2. Desarrollar un transportador de insulina basado en un sistema lipídico para administración de insulina por vía oral.
3. Caracterización física de los liposomas flexibles con y sin inclusión de insulina.
4. Evaluar y caracterizar físicamente los liposomas flexibles con y sin adición del polímero PEG-2000 PE.
5. Determinar el efecto terapéutico de los liposomas flexibles con y sin polímero en ratas Wistar con diabetes mellitus experimental.

## 5. METODOLOGIA

Para el diseño y pruebas pre-clínicas de los preparados liposomales se consideran las siguientes fases de trabajo:

### FASE I:

- Validación del método analítico: espectroscopia UV-vis.
- Determinación del método de preparación de los formulados, comparando un método de preparación muy tradicional (rehidratación de película delgada) vs. un método de preparación relativamente nuevo y rápido (método de calentamiento).
- Caracterización de diferentes preparados de liposomas flexibles con diferentes proporciones de materiales.

### FASE II:

- Adición de diferentes concentraciones del polímero PEG-2000 PE al preparado obtenido en la Fase I.
- Caracterización de diferentes preparados de liposomas flexibles con diferentes concentraciones del polímero PEG-2000 PE.
- Evaluación de características físicas de liposomas con adición de PEG y sin PEG durante un proceso de almacenamiento de varios meses en refrigeración para evaluar la estabilidad de los productos.
- Debido a que la insulina fue sometida a altas temperaturas en el proceso de fabricación, la insulina fue expuesta a diferentes temperaturas y se realizaron pruebas de espectroscopia de Infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y Electroforesis gel para determinar su estructura.
- Las insulinas expuestas a diferentes temperaturas fueron administradas por vía subcutánea a animales con diabetes experimental y se obtuvieron sus valores de glucosa sanguínea para evaluar su actividad biológica.

### FASE III:

- El mejor preparado de la fase I y el mejor de la Fase II fueron sometidos a pruebas de liberación *in-vitro* mediante la técnica de dos fases de diálisis inversa en pH 1.3 y en pH 7.4.
- Los preparados obtenidos y la insulina comercial fueron administradas por vía oral, transdérmica y subcutánea en animales con diabetes experimental y se obtuvieron sus valores de glucosa sanguínea.

## 5.1. MATERIALES

Componentes para transfersomas/liposomas flexibles:

- Insulina Recombinante Humana (Pisa Agropecuaria, México)
- L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de Soya (Sigma Aldrich, México)
- Colato de Sodio (Sigma Aldrich, México)
- Colesterol (Sigma Aldrich, México)
- 18:0 PEG-2000 PE (Avanti Polar Lipids, Alabama, USA)

Solventes y agentes hidratantes:

- Sacarosa > 99,5% (Sigma Aldrich, México)
- Metanol (ACS Fermont, México)
- Alcohol Etílico absoluto 99,9% (J.T. Baker, México)
- Cloroformo (ACS Fermont, México)

### 5.1.1. Características físico-químicas de los componentes

#### 5.1.1.1. *Insulina*

Origen: Extraído de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas del cerdo o del bovino y purificado mediante cristalización. También puede ser biosintetizada por medio de tecnología de ADN recombinante usando *Escherichia coli* o semisintetizada por modificación enzimática de material porcino.

Estructura química:

Peso Molecular: 6000 gramos/mol

Contiene dos cadenas, A y B de aminoácidos, unidas entre sí mediante dos puentes disulfuro. La insulina es sintetizada de una única cadena precursora llamada Proinsulina. En la conversión de la proinsulina humana a insulina, cuatro aminoácidos básicos y el péptido C son removidos por proteólisis. La insulina resultante es una molécula de dos cadenas. La cadena A o la acídica contiene glicina como residuo de amino terminal y la cadena B o básica consiste en 30 aminoácidos con fenilalanina en el punto terminal. Una molécula de preproinsulina aún más grande ha sido identificado como un precursor de la proinsulina (Powers y D'Alessio, 2011)

La Insulina puede existir como dímero, monómero o hexámero. Dos moléculas de  $Zn^{2+}$  son coordinadas en el hexámero almacenadas como gránulos en la célula beta.

La forma activa de la hormona es el monómero.

La hormona porcina es más similar a la del hombre y difiere solo por la sustitución de un residuo de alanina por una treonina en la terminal carboxil de la cadena B. La insulina bovina difiere por tres aminoácidos y es más antigénica que la insulina porcina.

Propiedades físicas:

Apariencia: Polvo cristalino blanco o casi blanco.

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua. Prácticamente insoluble en alcohol, cloroformo y éter. Soluble en solución diluida de ácidos minerales y con la degradación en soluciones de álcali hidróxido.

Producto comercial usado: Insulex® R

Laboratorio Fabricante: PISA S.A de C.V.

Concentración: 100 UI/mL

Almacenamiento: 2-8°C, no congelar, proteger de la luz.

Tipo de efecto: Rápido

Inicio de efecto: 20 - 30 minutos después de ser aplicada

Máximo efecto: 1- 3 Horas

Fin de efecto: 6 - 8 Horas

Las insulinas de acción rápida no poseen ningún tipo de aditivo ni retardante, por cual son puras y transparentes (Chan et al., 1981).

#### 5.1.1.2. *L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de Soya*

Está constituido por un esqueleto de glicerol que presenta el grupo hidroxilo (en posición 3) esterificado por el ácido fosfórico, el cual, a su vez se une a la colina formando la cabeza polar de la molécula y, los otros dos grupos hidroxilo (en posición 1 y 2) esterificados por ácidos grasos cuyas cadenas hidrocarbonadas constituyen la zona apolar de los fosfolípidos y le dan nombre (Figura 1). La carga negativa del fosfato a pH fisiológico se neutraliza con la carga positiva del amonio de la colina constituyendo la fosfatidilcolina (PC) un zwitterion que confiere carga neutra a la bicapa lipídica. Dichos fosfolípidos se caracterizan por su origen (PC de soya, huevo, sintético) y la temperatura de transición de fase ( $T_c$ ) que determina a que temperatura la membrana pasa de un estado gel (rígido), a un estado cristal líquido (fluido), (New, 1990; Brandl, 2001). Dicho parámetro es especialmente relevante en estudios como el nuestro ya que condiciona la permeabilidad de la bicapa liposómica al paso del o de los principios activos en función de la temperatura.

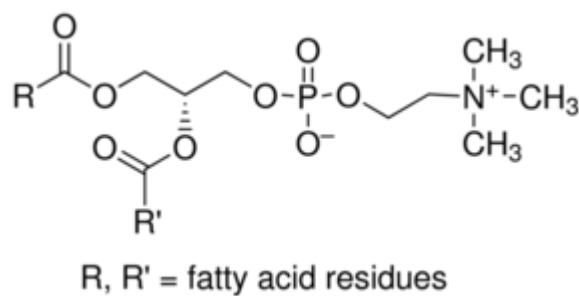


Figura 1. Estructura química de la *L- $\alpha$ -fosfatidilcolina*

Producto Comercial: *L- $\alpha$ - Fosfatidilcolina de soya*, Tipo IV-S,  $\geq 30\%$  (enzimática)

Laboratorio: Sigma Aldrich

Sinónimos: 1,2-Diacyl-*sn*-glicero-3-fosfocolina, 3-*sn*-fosfatidilcolina, *L- $\alpha$ -Lecitina*,

Azolectina, PC

CAS Number: 8002-43-5

Fuente biológica: Soya

Apariencia: Cerosa, forma sólida y color amarillo a naranja.

Temperatura de almacenamiento: -20°C

Solubilidad: Cloroformo soluble 100 mg/mL

Pureza: >30% (enzimático)

En esta molécula, el grupo glicerol queda unido en la posición 3 a la cabeza polar (fosfocolina), y en la posición 1 y 2 a ácidos grasos saturados en un porcentaje de un 13% de ácido palmítico (C16:0), 4% de ácido esteárico (C18:0), 10% de ácido oleico (C18:1), 64% de ácido linoleico (C18:2) y 6% de ácido linolenico (C18:3), con presencia de otros ácidos grasos en menor proporción. Presenta una Tc semejante a la Tc de 54,5 °C de la DSPC (1,2 – Diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina), (Simon et al., 1995).

Acción bioquímica/fisiológica: Es el fosfolípido estructural de mayor presencia en el cerebro, abarcando aproximadamente el 15% de los lípidos totales, localizada principalmente en la materia gris.

La fosfatidilcolina es la principal membrana fosfolipídica en las células eucariotas, son un componente estructural de dichas membranas. También es útil como reserva para una serie de mensajeros lipídicos y como fuente para un gran número de lípidos bioactivos tales como, lisofosfatidilcolina, ácido fosfatídico, diacilglicerol, factor activador de plaquetas y ácido araquidónico (Pubchem, 2017).

### ***5.1.1.3. Colato de Sodio***

Es un ácido biliar derivado del colesterol, formado por 24 átomos de carbono dihidroxilados o trihidroxilados, se caracteriza por tener en el C17 una cadena alifática ramificada de 5 átomos de carbono, con la que adquiere una estructura básica de anillo pentanoperhidro fenantreno con un grupo carboxilo terminal (Figura 2), (Voet y Voet, 2006).

CAS Number 206986-87-0

PubChem ID: 24892390

Sinónimos: 3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -Trihidroxi-5 $\beta$ -colan-24-oic sal de ácido de sodio, ácido colalico sal de ácido de sodio.

Origen Biológico: Bilis ovina

Apariencia: Polvo Blanco

Pureza: >99% (HPLC)

Peso molecular: 430.55 (base anhidro)

Formula empírica: C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>5</sub> · xH<sub>2</sub>O

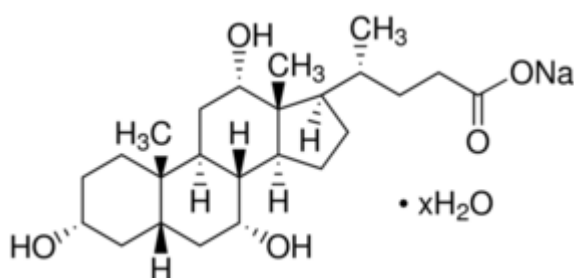


Figura2. Estructura química del Colato de sodio

Aplicación: Detergente no desnaturizado usado para extracción de proteínas de membrana.

El colato de sodio hidrato ha sido usado en el estudios para evaluar el efecto de formulaciones fosfolipidicas y surfactantes en la liberación dérmica de fármacos hidrofílicos en liposomas elásticos. También ha sido usado en el estudio de vesículas elásticas deformables, transfersomas y liberación de fármacos por vía transdermal.

El colato de sodio hidrato es un bio-surfactante aniónico que ha sido usado como reactivo reductor en soluciones acuosas (Pubchem, 2017).

#### 5.1.1.4. *Colesterol*

El colesterol es un lípido esteroide, formado por una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, constituida por cuatro carbociclos condensados o fundidos, denominados A, B, C y D, que presentan varias sustituciones: dos radicales metilo en las posiciones C-10 y C-13, una cadena alifática en la posición C-17, un grupo hidroxilo en la posición C-3 y una insaturación entre los carbonos C-5 y C-6. En la molécula de colesterol se puede distinguir una cabeza polar constituida por el grupo

hidroxilo y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos (Figura 3). Así, el colesterol es una molécula tan hidrófoba que la solubilidad de colesterol libre en agua es muy baja y, al igual que los otros lípidos, es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo (Voet y Voet, 2006).

Sinónimos: 3 $\beta$ -Hydroxy-5-colesteno, 5-Colesteno-3 $\beta$ -o

CAS Number 57-88-5

PubChem ID 24893094

Apariencia: Polvo Blanco

Formula Molecular: C<sub>27</sub>H<sub>46</sub>O

Peso Molecular: 386.7

Punto de Fusión: 147 to 150°C.

Rotación específica:  $[\alpha]_{25d} = -34$  to  $-38^\circ$  (25 g/100 ml dioxano)

Pureza:  $\geq 99\%$

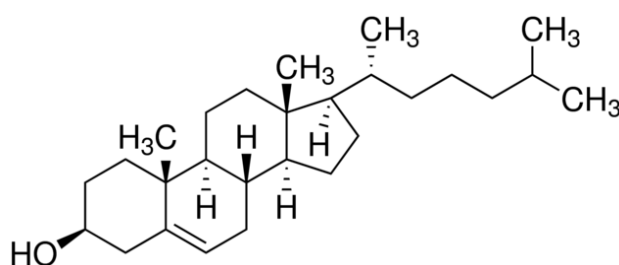


Figura3. Estructura química del Colesterol

Acción bioquímica y fisiológica: el colesterol es el principal componente de las membranas biológicas, aproximadamente se encuentra en un 25% del total de lípidos en el cerebro.

El colesterol es un lípido que constituye aproximadamente el 20-25% de los componentes estructurales de las membranas celulares. Ayuda con la fluidez y permeabilidad de la membrana, por lo que es permeable al agua pero no a los iones y protones. El colesterol también regula las funciones de los transportadores y proteínas de señalización presentes en la membrana plasmática. Los principales sitios de la síntesis de colesterol son el intestino delgado y el hígado (Smith, 1991).



El monohidrato de colesterol en alcohol produce una solución clara, incolora y amarillo pálido. También es soluble en acetona, dioxano, acetato de etilo, benceno, éter de petróleo, aceites, grasas, y en soluciones acuosas de sales biliares. Las soluciones deben ser protegidas de la luz (Pubchem, 2017).

Aplicación: El colesterol se ha utilizado para preparar complejos estimulantes del sistema inmune y así mejorar las respuestas celulares y humorales. Fue incorporado en la alimentación animal para estudiar el efecto de la dieta rica en colesterol (Pubchem, 2017).

#### **5.1.1.5. PEG-2000 PE**

El polietilenglicol (PEG), es un poliéter, su nombre generalmente aparece asociado a un número que hace referencia a la masa molecular del polímero u oligómero con el que viene conjugado; de modo que, el PEG con una masa molecular media de unos 2000 Da, se denomina PEG 2000. Su estructura química puede representarse como HO-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>n</sub>-H (Figura 4).

El polietilenglicol se produce por la interacción de óxido de etileno con agua, etilenglicol u oligómeros de etilenglicol. La reacción está catalizada por catalizadores ácidos o básicos. La longitud de la cadena de polímero depende de la proporción de reactantes. Dependiendo del tipo de catalizador, el mecanismo de polimerización puede ser catiónico o aniónico, es preferible el mecanismo aniónico porque conduce a la obtención de PEG con menor polidispersidad. El polietilenglicol de alto peso molecular se sintetiza por polimerización en suspensión. Para preparar polietilenglicol de bajo peso molecular se usan catalizadores alcalinos

Nombre completo: 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (sal amonio).

Los lípidos modificados con PEG se añaden frecuentemente a vesículas de fosfolípidos utilizados para la administración de fármacos para proporcionar un revestimiento estérico en la superficie de la membrana para dificultar la limpieza de las partículas por

el sistema reticuloendotelial (RES). Esto prolonga la vida media plasmática en circulación del fármaco. La vida media en plasma del fármaco puede ocurrir desde varias horas a días, dependiendo del tamaño del PEG y ácidos grasos unidos al ancla lipídica (Allen et al., 1991; Sigma Aldrich, 2017).

Formula Molecular:  $C_{133}H_{267}N_2O_{55}P$

Composición: C 56.94%, H 9.59%, N 1.00%, O 31.37%, P 1.10%

Pureza: >99%

Estabilidad: 1 año

Almacenamiento:  $-20^{\circ}C$

CAS Number: 474922-77-5

Peso Molecular: 2805.497

Masa exacta: 2803.789

Temperatura de transición:  $12.8^{\circ}C$  (en micelas)

Sinónimos: DSPE-mPEG(2000)

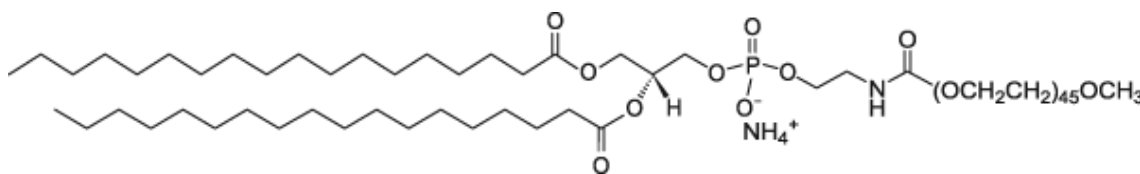


Figura4. Estructura química del PEG-2000 PE

Apariencia: Solución clara incolora

Punto de fusión/punto de congelamiento:  $-63^{\circ}C$  ( $-81^{\circ}F$ )

Punto de ebullición inicial y rango de ebullición:  $60.5 - 61.5^{\circ}C$  ( $140.9 - 142.7^{\circ}F$ ) a una presión de 1,013 hPa (760 mmHg)

Presión de vapor: 213 hPa (160 mmHg) at  $20^{\circ}C$  ( $68^{\circ}F$ )

Densidad en vapor: 4.1

Densidad relativa: 1.480 g/cm<sup>3</sup>

Coefficiente de partición: n-octanol/agua: log Pow 1.97

Tensión de superficie: 27.1 mN/m at  $20^{\circ}C$  ( $68^{\circ}F$ )

Materiales incompatibles: Agentes oxidantes fuertes, bases fuertes, magnesio, óxidos de sodio / sodio, litio

Una característica común de PEG es que parece ser soluble en agua. Es soluble también en muchos disolventes orgánicos incluyendo hidrocarburos aromáticos (no alifáticos).

PEG es soluble en agua, metanol, etanol, acetonitrilo, benceno y diclorometano, y es insoluble en éter dietílico y hexano. Se usa junto a las moléculas hidrofóbicas para producir tensoactivos no iónicos (Allen et al., 1991; Winger et al., 2009).

## **5.2. FASE DE PREPARACIÓN**

### **5.2.1. Validación del método analítico**

Para asegurar la confiabilidad y seguridad, los métodos analíticos se someten a un proceso de validación. La validación de métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros que se aplican de acuerdo con la categoría a la que pertenezcan. Existen básicamente cuatro aproximaciones a la validación: validación retrospectiva, validación prospectiva, validación concurrente y revalidación (Hernández y Solis, 2011).

A partir del criterio de que no existe un modelo único para validar y de que existe una gran variedad de métodos analíticos. La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, que se aplican de acuerdo con algunas de las siguientes categorías a la que pertenezca (CNQFB, 2002):

Categoría I: Método analítico para la cuantificación de los componentes mayoritarios o principales de fármacos a granel o principios activos (incluyendo conservadores) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: Métodos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado. Estos métodos incluyen ensayos cuantitativos o pruebas límite.

Categoría III: Métodos analíticos para la determinación de características de desempeño (disolución, medicamentos de liberación modificada, etc.).

Categoría IV: Pruebas de identificación.

En este caso cuantificamos principios activos, de modo que este método analítico pertenece a la categoría I, por ende se requieren determinar los siguientes parámetros: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad y reproducibilidad. Adicionalmente se evaluó la robustez del sistema (ICH, 1995).

#### **5.2.1.1. Preparación de la curva estándar**

Se utilizaron varios medios para solubilizar la sustancia de referencia, Insulina. Una vez preparadas todas las soluciones se utilizaron para realizar los barridos espectrales. Los medios usados fueron una solución buffer de fosfatos (PBS), a un pH de 7.4, el cual se obtuvo mediante la adición de una solución 0.1 N de HCl o una solución 0.1 N de NaOH y una solución de Sacarosa al 10%. Las soluciones que se utilizaron para los barridos tuvieron una concentración de 4 UI/mL (Figura 5).

Se prepararon de la siguiente manera:



**Figura 5. Procedimiento para la preparación de la curva estándar de insulina.**

### 5.2.1.2. Espectroscopia UV de la curva estándar

La longitud de onda en el cual la sustancia ha obtenido la absorción máxima se conoce como  $\lambda_{\max}$ , este valor se ha obtenido de acuerdo a un barrido espectrofotométrico realizado al principio activo, en un intervalo de longitudes de onda de 200 – 400 nm. La curva de calibración se realizó usando esta longitud de onda basada en la ley de Lambert-Beer (Ingle y Crouch, 1988; Parnis y Olham, 2013), donde una curva de calibración es usada para determinar la concentración del analito. La absorción máxima ( $\lambda_{\max}$ ) obtenida fue 269 nm, donde la absorbancia fue de 1.356.

La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración. En espectroscopia el término luz no sólo se aplica a la forma visible de radiación electromagnética, sino también a las formas UV e IR, que son invisibles. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 195-400 nm) y el visible (400-780 nm), (Tsuchiya y Urakami, 1997)

La cantidad de absorbancia es proporcional a la concentración de absorbente, por ende se puede determinar la concentración de una muestra basado en la cantidad de luz absorbida. La Ley de Lambert-Beer expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log I/I_0 = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración –a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas-; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución –a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará-; y por último, depende de  $\varepsilon$ , una constante de proporcionalidad -denominada coeficiente de extinción- que es específica de cada cromóforo. Como A es adimensional, las dimensiones de  $\varepsilon$  dependen de las de c y l. La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras

que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en M, con lo que las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser  $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ . Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar (o un submúltiplo apropiado), se denomina coeficiente de extinción molar ( $\epsilon_M$ ). Cuando, por desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M, por ejemplo  $g \cdot L^{-1}$ , las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser distintas, por ejemplo  $g^{-1} \cdot L \cdot cm^{-1}$ , y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico ( $\epsilon_s$ ), (Tsuchiya Y Urakami, 1997)

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de c altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc.

### 5.2.1.3. Linealidad del Sistema

Para evaluar linealidad del sistema, se debe preparar una curva de calibración con al menos 5 niveles de concentración por triplicado, preparadas a partir de una solución estándar (ICH, 1995; CNQFB, 2002).

Para la medición de este parámetro se propusieron cinco sistemas con diferentes concentraciones (Tabla 1). Los sistemas se prepararon a partir de una solución de 20 UI/mL que se obtuvo colocando 10 mL de Insulina en un matraz aforado de 50 mL, se aforó la muestra con PBS. A partir de esta se obtuvieron 5 diluciones diferentes para obtener 5 niveles para la curva de calibración. Todos los sistemas se prepararon por triplicado de la siguiente manera:

Sistema	Concentración (UI/mL)	Alícuota (mL)	Volumen de aforo con PBS (mL)
1	0.8 UI/mL	1 mL	25 mL
2	1,6 UI/mL	2 mL	25 mL
3	2,4 UI/mL	3 mL	25 mL
4	3,2 UI/mL	4 mL	25 mL
5	4,8 UI/mL	6 mL	25 mL

Tabla 1. Sistemas preparados para la obtención de la curva de calibración.

Los parámetros estadísticos que deben considerarse para determinar si el sistema es lineal, son: coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la pendiente ( $m$ ), la ordenada al origen ( $b$ ) y el coeficiente de variación global.

Todos los sistemas fueron medidos espectrofotométricamente a 269 nm para obtener los valores de su absorbancia.

#### **5.2.1.4. Precisión**

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto de referencia.

La precisión del sistema debe ser evaluada con el coeficiente de variación del factor de respuesta obtenido de los datos de linealidad, este factor debe ser menor o igual al 2 %. La precisión del método debe ser evaluada realizando la determinación de la concentración de tres diferentes muestras, con seis ensayos cada una (CNQFB, 2002; Hernández y Solís, 2005).

Para evaluar la precisión se prepararon tres niveles a partir de una solución estándar (Tabla 2). Los sistemas se prepararon a partir de una solución de 20 UI/mL que se obtuvo colocando 10 mL de Insulina en un matraz aforado de 50 mL, se aforó la muestra con PBS. A partir de esta se obtuvieron 3 diluciones diferentes para obtener los tres niveles requeridos para evaluar este parámetro. Todos los sistemas se prepararon por sextuplicado de la siguiente manera:

<b>Sistema</b>	<b>Concentración (UI/mL)</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>Volumen de aforo con PBS (mL)</b>
<b>1</b>	0.8 UI/mL	1 mL	25 mL
<b>2</b>	2,4 UI/mL	3 mL	25 mL
<b>3</b>	4,8 UI/mL	6 mL	25 mL

**Tabla 2. Niveles preparados para la evaluación de la precisión del sistema.**

Todos los sistemas fueron medidos espectrofotométricamente a 269 nm para obtener los valores de su absorbancia.

### 5.2.1.5. *Exactitud*

La exactitud es el grado de concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. La exactitud del método debe ser evaluada realizando la determinación de la concentración de tres diferentes muestras, con seis ensayos cada una. A diferencia de la precisión que describe la magnitud de los errores aleatorios, la exactitud establece la magnitud de los errores sistemáticos, en general, se requiere que el valor medido no difiera significativamente del valor de referencia (ICH, 1995; CNQFB, 2002).

Para evaluar la exactitud se prepararon tres niveles a partir de una solución estándar (Tabla 3). Los sistemas se prepararon a partir de una solución de 20 UI/mL que se obtuvo colocando 10 mL de Insulina en un matraz aforado de 50 mL, se aforó la muestra con PBS. A partir de esta se obtuvieron 3 diluciones diferentes para obtener los tres niveles requeridos para evaluar este parámetro. Todos los sistemas se prepararon por sextuplicado de la siguiente manera:

<b>Sistema</b>	<b>Concentración (UI/mL)</b>	<b>Alícuota (mL)</b>	<b>Volumen de aforo con PBS (mL)</b>
<b>1</b>	0.8 UI/mL	1 mL	25 mL
<b>2</b>	2,4 UI/mL	3 mL	25 mL
<b>3</b>	4,8 UI/mL	6 mL	25 mL

**Tabla 3. Niveles preparados para la evaluación de la exactitud del sistema.**

Todos los sistemas fueron medidos espectrofotométricamente a 269 nm para obtener los valores de su absorbancia.

### 5.2.1.6. *Repetibilidad y Reproducibilidad*

La repetibilidad entre días es la precisión de un método analítico, expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes (diferentes días) realizadas por un sólo analista, usando los mismos instrumentos y método.

La reproducibilidad es la precisión de un método analítico, expresada para la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de análisis (diferentes analistas, instrumentos, laboratorios, etc.).



Para determinar la repetibilidad y la reproducibilidad se debe evaluar el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como los días (repetibilidad), los analistas o los instrumentos (reproducibilidad). Debe analizarse una muestra homogénea del producto, por lo menos por triplicado para probar cada condición (ICH, 1994; CNQFB, 2002)

Para evaluar estos parámetros se prepararon tres niveles a partir de una solución estándar (Tabla 4). Los sistemas se prepararon a partir de una solución de 20 UI/mL que se obtuvo colocando 10 mL de Insulina en un matraz aforado de 50 mL, se aforó la muestra con PBS. A partir de esta se obtuvieron 3 diluciones diferentes para obtener los tres niveles requeridos para evaluar este parámetro. Todos los sistemas se prepararon por sextuplicado de la siguiente manera:

<b>Sistema</b>	<b>Concentración (UI/mL)</b>	<b>Alicuota (mL)</b>	<b>Volumen de aforo con PBS (mL)</b>
<b>1</b>	0.8 UI/mL	1 mL	25 mL
<b>2</b>	2,4 UI/mL	3 mL	25 mL
<b>3</b>	4,8 UI/mL	6 mL	25 mL

**Tabla 4. Sistemas preparados para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad del método analítico.**

La evaluación de la repetibilidad se realizó en dos días diferentes, todos los sistemas fueron preparados bajo las mismas condiciones y medidos por el mismo analista espectrofotométricamente a 269 nm para obtener los valores de su absorbancia. Para determinar la reproducibilidad los sistemas fueron preparados condiciones y medidos en espectrofotometría por distinto analista y en diferentes días.

#### **5.2.1.7. Selectividad**

Es la capacidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra (Hernández y Solis, 2005).

Para obtener estos datos se realizaron mediciones de insulina + PBS, insulina + sacarosa al 10%, insulina + fosfatidilcolina e insulina + acetonitrilo, todas las muestras se prepararon a una concentración de 20 UI/mL.

### 5.2.1.8. Robustez

La robustez es una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal. En este sentido el objetivo de la prueba de robustez es optimizar el método analítico desarrollado o implementado por el laboratorio, y describir bajo qué condiciones analíticas (incluidas sus tolerancias), se pueden obtener a través de éstos resultados confiables (ICH, 1994)

En este caso se evaluó que diferencia existe entre la medición de las mismas muestras en diferentes equipos de espectrofotometría. Los equipos evaluados fueron Varian Cary 1E (Spectralab Analytical) y espectrofotómetro SPECORD 210 (Analytik Jena, Alemania). El primero ubicado en las instalaciones de Campo 4, Facultad de Estudios Superiores FES – Cuautitlán y el segundo ubicado en el departamento de Farmacología y Fisiología veterinaria de Ciudad Universitaria UNAM, ciudad de México.

Para evaluar este parámetro se prepararon cinco sistemas con diferentes concentraciones (Tabla 5). Los sistemas se prepararon a partir de una solución de 20 UI/mL que se obtuvo colocando 10 mL de Insulina en un matraz aforado de 50 mL, se aforó la muestra con PBS. A partir de esta se obtuvieron 5 diluciones diferentes para obtener 5 niveles para la curva de calibración. Todos los sistemas se prepararon por triplicado de la siguiente manera:

Sistema	Concentración (UI/mL)	Alícuota (mL)	Volumen de aforo con PBS (mL)
1	0.8 UI/mL	1 mL	25 mL
2	1,6 UI/mL	2 mL	25 mL
3	2,4 UI/mL	3 mL	25 mL
4	3,2 UI/mL	4 mL	25 mL
5	4,8 UI/mL	6 mL	25 mL

Tabla 5. Sistemas preparados para la determinación de la robustez del método analítico en dos espectrofotómetros diferentes.

Los parámetros estadísticos que deben considerarse para determinar si el sistema es lineal, son: coeficiente de correlación ( $r$ ), el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), la pendiente ( $m$ ), la ordenada al origen ( $b$ ) y el coeficiente de variación global.

Todos los sistemas fueron medidos espectrofotométricamente a 269 nm para obtener los valores de su absorbancia en ambos equipos de espectrofotometría por el mismo operador y el mismo día.

### **5.2.2. Evaluación estructural de Insulina expuesta a diferentes temperaturas**

Debido a que en los procesos de preparación de los liposomas flexibles se somete al principio activo a diferentes temperaturas, se evalúa el efecto de altas temperaturas sobre la estructura y función de la insulina, y por ende, la detección del analito en el método analítico. Para evaluar esto, se expone la insulina a 60°C y 100°C durante cuatro horas continuas. Estas muestras junto con la mantenida a 4°C, fueron usadas para su evaluación en Electroforesis gel, espectroscopia de infrarrojo y calorimetría diferencial de barrido.

#### **5.2.2.1. Absorbancia**

Se obtienen las absorbancias en espectroscopia UV para una muestra de insulina a 4°C, una muestra de insulina mantenida en temperatura ambiente (18°C aproximadamente) durante 60 minutos y una muestra de Insulina a 70°C durante 60 minutos. Todas las muestras fueron preparadas a una concentración de 4UI/mL de insulina.

#### **5.2.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

La integridad de la insulina se estimó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Enduro Power Supplies, Labnet International INC) y se visualizaron los geles y se evaluaron densitométricamente los niveles de proteína usando el software Quantity One Program 4.2 (Bio-rad Laboratories).

Los estudios de integridad se llevaron a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y sin gel desnaturalizado (7,5%) y la documentación de gel se hizo mediante citometría según Tippavajhala y Yamsani (2012).

Se prepararon las siguientes soluciones para llevar a cabo la electroforesis según los autores anteriores: solución de acrilamida al 30%, tampón de gel de separación (clorhidrato de Tris 1,5 M de pH 8,8), solución de persulfato de amonio (APS)

(iniciador), tampón de electrodo, solución tampón de carga de muestra, solución de decoloración y gel de resolución (7,5% de acrilamida).

Solución de acrilamida al 30%:

- Acrilamide: 29.2 g
- Bis-acrilamide: 0.8 g

Ambos son disueltos en agua destilada y almacenados a 40°C.

Tampón de Gel de separación (1.5 M Clorhidrato de Tris a pH8.8)

- Clorhidrato de Tris: 23.64 g
- Agua destilada 75ml

El pH fue ajustado a 8.8 usando una solución de hidróxido de sodio.

Solución de persulfato de amonio (APS)

- Persulfato de amonio (APS): 0.437 g fue disuelto en 3.1 mL de agua destilada.

Tampón de Electrodo:

- Base libre de Tris: 3.02 g
- Glicina: 18.8 g

Ambos disueltos en 1 litro de agua destilada.

Solución tampón de carga de muestra

- Clorhidrato de Tris 1M (pH 6.8): 2.5 mL
- Glicerol: 2 mL
- Azul de Bromofenol: 1 mL
- Agua Destilada: 4.5 mL

Solución de tinción:

- Azul brillante de Coomassie: 0.25 g

Disuelto en 45 mL de Metanol y 10 mL de una solución de ácido acético glacial.

Solución de decoloración: Agua destilada, 300ml.

#### Gel revelador (7.5% Acrilamide)

- Solución de acrilamida al 30%
- Clorhidrato de Tris 1.5M (pH-8.8): 2.5 ml
- Agua destilada: 5mL
- Tetrametil etileno diamina: 10 $\mu$ l
- Solución de persulfato de amonio: 100 $\mu$ l

Los geles necesitan alrededor de 20 minutos para solidificar. Así que dentro de este tiempo la solución se vertió entre las placas de vidrio y se introdujo el peine para fabricar los pocillos. Los pocillos se cargaron a continuación con las muestras que contenían 1  $\mu$ l de solución de fármaco y 25  $\mu$ l de tampón de carga de muestra. A continuación, las placas de vidrio que contenían el gel cargado se colocaron en el sistema de electroforesis y se aplicó un potencial eléctrico de 100 V de la DC. Se tardó alrededor de 30 minutos para el funcionamiento de las bandas de insulina en el gel. Las bandas de la insulina así separadas por la electroforesis se cuantificaron mediante el software Quantity One Program 4.2 (Bio-rad Laboratories).

Las muestras evaluadas en este método fueron: Insulina recombinante Humana, Insulina expuesta a 60°C y expuesta a 100°C.

#### **5.2.2.3. Espectroscopia Infrarrojo**

La espectroscopia de infrarrojo (Espectrómetro FTIR Perkin-Elmer RX-I modelo, utilizando el pote de bromuro de potasio) se utilizó para el análisis de la estructura secundaria de las de insulinas expuestas a diferentes temperaturas. Las insulinas se liofilizaron previamente (Liofilizadora, FreeZone Series, LABCONCO) a esta evaluación luego de su exposición a 4°C, 60°C y 100°C.

#### **5.2.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido**

La recolección de datos se realizó utilizando un microcalorímetro de exploración diferencial VP-DSC (MicroCal Incorporated, LLC, Northampton, MA). Los termogramas de insulina se realizaron por triplicado con tampón de fosfato 7 mM de 20

a 100°C a una velocidad de barrido de 1°C / min. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando Origin 7.0 (OriginLab, Northampton, MA).

### 5.3. FASE I DE FORMULACIÓN

Se realizan cinco preparaciones de liposomas flexibles (LF) con diferentes proporciones de lípidos y surfactante, con el fin de obtener un preparado con adecuadas características. Todos los formulados se prepararon a una concentración de 10 mM; las proporciones de la composición se encuentran resumidas en la tabla 6. El preparado con mejor estabilidad y porcentaje de encapsulamiento es considerado para la siguiente fase (fase II), donde se adicionará un polímero en su estructura.

Materiales	COMPOSICIÓN (%)			
	Insulina Recombinante humana	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de Soya	Colato de Sodio	Colesterol
Preparado LF1	15UI/mL	94%	6%	---
LF2	15 UI/mL	94%	6%	3:2(CHOL)
LF3	15UI/mL	88%	12%	---
LF4	15 UI/mL	85%	15%	---
LF5	15UI/mL	79%	21%	---

**Tabla 6. Proporción de los componentes para la preparación de diferentes formulados de liposomas flexibles cargados de insulina.**

#### 5.3.1. Preparación de los liposomas

Los liposomas flexibles de la fase I fueron preparados mediante dos técnicas: la técnica de rehidratación de película delgada y luego extrusión (Bangham et al., 1965; Beaulac et al., 1999; Marier et al., 2002; Park et al., 2010; Zhang, 2017) y mediante la técnica de calentamiento (Mozafari, 2005; 2010).

##### 5.3.1.1. Técnica de rehidratación de película delgada

Se utiliza sacarosa 10% como agente rehidratante, ya que se han reportado las mejores encapsulaciones de esta manera (Park et. al., 2011), además ha sido reportada como eficiente en la reducción del tamaño de las partículas (Vandana and Sahoo, 2009).

Se prepara una solución con la cantidad de fosfatidilcolina correspondiente (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de soya, tipo IV-S > 30%, Sigma Aldrich, México) con 10 mL de etanol (Fermont, México), se mezcla hasta obtener homogeneidad, luego se adiciona el colato

de Sodio (Hidrato de colato de sodio de bilis ovina > 99%, Sigma Aldrich, México) y se continua mezclando hasta que se solubilice. Posteriormente se agregan 20 mL de una mezcla 1:1 de metanol:cloroformo (Fermont, México). Luego se elimina la fase orgánica por rotaevaporación (Rotavapor Büchi 461) a 40 °C y se seca al vacío durante 8 horas a 500 mmHg (Bomba de vacío Rocker 300), de ahí se obtiene un film delgado de fosfolípidos que se hidrata con 50 mL de una solución de sacarosa al 10% junto con la Insulina (7,5 mL), la hidratación se realiza en el rotavapor a una temperatura de 40 °C y 500 mmHg de presión de vacío durante 1 hora. Finalizado este tiempo se lleva la dispersión a un baño María (Civeq HH-2) a 40°C durante dos horas, luego se mantiene a temperatura ambiente durante una hora más para permitir la dilatación completa de la película lipídica y obtener una suspensión vesicular.

Se envasa esta dispersión en un frasco ámbar y se coloca en un sonificador ultrasónico (Elmasonic S 30 H, Elma) a temperatura ambiente durante 3 minutos.

#### ***5.3.1.2. Técnica de calentamiento***

En un matraz de bola se coloca toda la solución hidratante (Sacarosa al 10%) junto con el principio activo (Insulina Recombinante Humana) en aTGIación constante en un baño María a 60°C durante 40 minutos. Una vez se alcanzan los 60°C se agregan los demás componentes, los fosfolípidos, a cada uno de los matraces, se homogenizan e inmediatamente se deben colocar en una atmosfera de nitrógeno, donde se alcance 1 Bar durante 1 minuto, esto se realiza para sacar el aire y evitar que se oxiden los fosfolípidos. Nuevamente se colocan los matraces en Baño María a 60°C y se mantienen en aTGIación constante a 750 rpm durante 40 minutos. Una vez transcurrido dicho periodo de tiempo deben llevarse a una temperatura de 25°C (Mozafari et al, 2007; Mozafari 2010).

#### **5.3.2. Caracterización de los liposomas**

##### ***5.3.2.1. Tamaño de los liposomas, índice de polidispersión y potencial zeta***

Se empleó el método de espectroscopia de correlación de fotones (Zetasizer, Nano Sizer, MALVERN) para la distribución de tamaño de los liposomas y el índice de polidispersión de las muestras. En este mismo equipo en la modalidad de potencial zeta,

mediante el método de difracción laser Doppler, se realizó la medición de la carga de superficie para cada una de las muestras (Muller et. al., 2000; Guo et. al., 2003). Se utilizó una celda tipo Folder con una cantidad suficiente que genere contacto con los electrodos.

El método de dispersión de luz dinámica, también conocido como dispersión cuasi-elástica de luz (QELS) o Espectroscopía de Correlación Fotónica (PCS) permite obtener información dinámica sobre las partículas que se mueven al azar (movimiento Browniano). La luz dispersada por una disolución polimérica o coloidal contiene información sobre la estructura, interacciones y dinámica de las macromoléculas o coloides. Es por eso que la dispersión de luz es una de las técnicas más ampliamente empleadas para la caracterización de polímeros y coloides en disolución (Gittings y Saville, 1998)

Esto fue evaluado en el laboratorio de investigación y 003 de tecnología farmacéutica del edificio FF de la unidad de posgrados de la facultad de química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unido a la partícula dispersada. La importancia del potencial zeta es: que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión (Clogston et al., 2011). Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeños, un alto potencial zeta le confiere estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación. Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera a la repulsión y se forman flóculos, en lugar de dispersión. Por lo tanto, los coloides de alto potencial zeta se estabilizan eléctricamente, mientras que, los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular o flocular. También la estabilidad de las dispersiones depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal y las fuerzas de atracción de van der Waals (Batalla et al., 2014).



Para medir el potencial zeta se utilizó la técnica de Electroforesis Laser Doppler (LDE), basada en el principio básico del efecto Doppler (Doppler, 1843), que supone la variación de frecuencia de cualquier tipo de onda emitida o recibida por una partícula en movimiento. Esta técnica implica la utilización de un par de haces láser coherentes procedentes de una única fuente y enfocados, mediante unos espejos, hacia un punto concreto de la célula de medida en la cual se cruzan, iluminando las partículas que pasan. Este punto está localizado sobre la capa estacionaria, en el cual el efecto de la electroósmosis es nulo y, por tanto, la velocidad de las partículas se debe únicamente a su velocidad electroforética. Además, en este punto se generan franjas de interferencia de Young, de espaciado conocido, con las que interactúan las partículas dispersando luz, cuya intensidad fluctúa con una frecuencia que está relacionada con la velocidad de las partículas. La luz dispersada se recoge mediante un detector enfocado hacia el punto de cruce de los haces, el cual alimenta un correlador digital que determina la función de autocorrelación, a partir del cual se obtiene la movilidad electroforética de las partículas (Gittings y Saville, 1998).

De acuerdo con su tamaño y lamellaridad, los liposomas a su vez se clasifican en vesículas multilamerales, unilamelares, grandes unilamelares y unilamelares de tamaño intermedio, cuyas propiedades características los hacen adecuados para distintas aplicaciones. Las vesículas multilamelares (MLV), cuyo tamaño oscila entre 0,5  $\mu\text{m}$  y 5  $\mu\text{m}$ , consisten en varias lamelas concéntricas entre las cuales se encuentran los volúmenes acuosos. Son apropiadas para la incorporación de material lipídico no sólo por estar constituidas por varias capas de fase lipídica, sino porque liberan de manera gradual y sostenida el material, ya que sus membranas concéntricas pueden ser lentamente degradadas en el sitio blanco. Las vesículas unilamelares (SUV) son aquellos liposomas en el límite inferior de tamaño posible (30-40 nm). Este tipo de vesícula presenta anomalías en el empaquetamiento de lípidos por su alta curvatura, siendo especialmente susceptibles a la transferencia y degradación en presencia de moléculas biológicas. Las vesículas grandes unilamelares (LUV) tienen un tamaño de 1000 nm, mientras que las vesículas unilamelares de tamaño intermedio (IUV) alcanzan alrededor de 100 nm (Navarro et al., 2008).

### ***5.3.2.2. Determinación del porcentaje de encapsulamiento de la Insulina***

La eficiencia de encapsulación se expresa como una relación entre la concentración de insulina dentro de los liposomas (Cantidad de insulina por peso de los lípidos) y el total de la concentración de insulina en todo el sistema.

El porcentaje de encapsulamiento se reporta como la cantidad de insulina en los liposomas comparada con el total de insulina en la concentración lipídica (Li et. al., 2009; Gillet et. al., 2009).

La determinación de insulina se realizó mediante el método de espectroscopia UV-visible basado en Royatvand et al., 2013, se utilizó un espectrofotometro SPECORD 210 (Analytik Jena, Alemania).

#### ***5.3.2.2.1. Separación de los liposomas***

Se realizaron varias pruebas de separación por medio de tres métodos, centrifugación, ultrafiltración y ultracentrifugación.

Para la centrifugación se utilizó una microcentrifuga (Legend Micro 21, Thermo scientific), se utilizan tubos de microtainer de capacidad de 1.5 mL, colocando 1.2 mL de glicerol y 0.3 mL del preparado de liposomas. Se centrifugó a 10000 rpm durante 30 minutos. Para la ultrafiltración se utilizan membranas tubulares con capacidad de 500  $\mu$ L dentro de tubos de microtainer y se centrifugó a 14000 rpm durante 40 minutos. Sin embargo luego de varias mediciones espectrofotométricas se determinó que estos métodos no realizan la separación adecuada de los sistemas.

Para la Ultracentrifugación se utiliza una Ultracentrifuga (Beckman Coulter, modelo XL-100K) y se utilizan tubos de policarbonato (Bekman, Quick-seal) con 2 gramos de glicerol y 2 mL de cada preparado de insulina. Se realizan diferentes pruebas de velocidad y tiempo, donde se obtiene una óptima separación de fases luego de 80 minutos de centrifugación a 25000 revoluciones por minuto (rpm). Una vez obtenidas las fases se toman 500  $\mu$ L del sobrenadante y se agregan 2 mL de acetonitrilo, lo cual se centrifuga por 5 minutos en una centrifuga a 3000 rpm. Adicionalmente se toman 500

$\mu$ L de la formulación completa junto con 4 mL de acetonitrilo y se llevan a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, para obtener la sedimentación de los fosfolípidos y que no exista interferencia en la medición. Luego de comparar los tres métodos de separación se concluye que la separación adecuada se realiza por medio de este último método, descartando los otros dos métodos nombrados.

## 5.4. FASE II DE FORMULACIÓN

Con el fin de generar un recubrimiento que genere protección contra la degradación de insulina y un alargamiento de la vida media, se adiciona al preparado obtenido en la fase I diferentes concentraciones de PEG-2000 PE (Ogawa M., et al., 2015; Zhao T., et al., 2015; Oberoi H., et al., 2016; Rajamanickam Vijayakumar, M. et al, 2016). Todos los formulados se prepararon a una concentración de 10 mM y las proporciones de los componentes se muestran en la tabla 7:

COMPOSICIÓN (%)				
Materiales	Insulina Recombinante humana	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de Soya	Colato de Sodio	18:0 PEG-2000 PE
Preparado				
LF3-PEG1	15UI/mL	88%	12%	+1%
LF3-PEG2	15 UI/mL	88%	12%	+5%
LF3-PEG3	15UI/mL	88%	12%	+10%
LF3-PEG4	15 UI/mL	88%	12%	+12,5%
LF3-PEG5	15 UI/mL	88%	12%	+15%

Tabla 7. Proporción de PEG-2000 PE para el formulado de liposomas flexibles escogido de la fase I.

### 5.4.1. Preparación de los liposomas

Debido a que las mejores características físicas fueron obtenidas en los liposomas preparados mediante la técnica de calentamiento. Todos los preparados fueron fabricados mediante este método.

Se realiza una solución de fosfatidilcolina (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de soya, tipo IV-S > 30%, Sigma Aldrich, México), colato de Sodio (Hidrato de colato de sodio de bilis ovina > 99%, Sigma Aldrich, México), 50 mL de Sacarosa al 10% y 7,5 mL de Insulina Recombinante Humana (Pisa Agropecuaria, México).

En un matraz de bola se coloca la solución hidratante (Sacarosa al 10%) junto con el principio activo (Insulina Recombinante Humana) en aTGIación constante en un baño María a 60°C. Una vez se alcanzan los 60°C se agregan los demás componentes, los fosfolípidos, a cada uno de los matraces, se homogenizan e inmediatamente se deben colocar en una atmosfera de nitrógeno, donde se alcance 1 Bar durante 1 minuto. Nuevamente se colocan los matraces en Baño María a 60°C y se mantienen en aTGIación constante a 750 rpm durante 40 minutos. Una vez transcurrido dicho periodo de tiempo deben llevarse a una temperatura de 25°C.

#### **5.4.2. Caracterización de los liposomas**

##### ***5.4.2.1. Tamaño de los liposomas, índice de polidispersión y potencial zeta***

Se empleó el método de espectroscopia de correlación de fotones (Zetasizer, Nano Sizer, MALVERN) para la distribución de tamaño de los liposomas y el índice de polidispersión de las muestras. En este mismo equipo en la modalidad de potencial zeta, mediante el método de difracción laser Doppler, se realizó la medición de la carga de superficie para cada una de las muestras (Muller et. al., 2000; Guo et. al., 2003). Se utilizó una celda tipo Folder con una cantidad suficiente que genere contacto con los electrodos.

##### ***5.4.2.2. Determinación del porcentaje de encapsulamiento de la Insulina***

La determinación de insulina se realizó mediante el método de espectroscopia UV-visible basado en Royatvand et al., 2013, se utilizó un espectrofotometro SPECORD 210 (Analytik Jena, Alemania). Se hizo mediante una relación entre la cantidad de insulina encontrada en los preparados finales y la cantidad de insulina no encapsulada (la cual se obtuvo mediante la técnica de separación de Ultracentrifugación).

Para la Ultracentrifugación se utiliza una Ultracentrifuga (Beckman Coulter, modelo XL-100K) y se utilizan tubos de policarbonato (Bekman, Quick-seal) con 2 gramos de glicerol y 2 mL de cada preparado de insulina. Se centrifugan a 25000 revoluciones por minuto (rpm) durante 80 minutos. Una vez obtenidas las fases se toman 500 µL del sobrenadante y se agregan 2 mL de acetonitrilo, lo cual se centrifuga por 5 minutos en una centrifuga a 3000 rpm. Adicionalmente se toman 500 µL de la formulación

completa junto con 4 mL de acetonitrilo y se llevan a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos, para obtener la sedimentación de los fosfolípidos y que no exista interferencia en la medición.

## **5.5. PRUEBAS DE ESTABILIDAD**

El estudio de la estabilidad de los liposomas es necesario ya que las propiedades físicas y químicas del suministro pueden cambiar durante el almacenamiento, y los liposomas pueden aglutinar y fundirse, dando como resultado una fuga del fármaco. Se realizaron estas pruebas solo para los mejores preparados obtenidos de cada fase. Los liposomas flexibles convencionales (LF3) y los modificados con PEG (LF3-PEG3) se almacenaron a 4°C durante 60 días, y se determinaron los cambios en el potencial Z y el tamaño de partícula en los días 1, 30 y 60.

## **5.6. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN *IN-VITRO***

### **5.6.1. Diálisis Inversa de dos etapas**

Se utiliza el método denominado Diálisis Inversa (Xu, et al., 2012), con la colaboración del Alumno Christopher Medina. Este método ha sido recientemente desarrollado con dos etapas para el ensayo de liberación *in-vitro* de liposomas. La primera etapa de la prueba es imitar la circulación de liposomas en el cuerpo, mientras que la segunda etapa es imitar el proceso de liberación de fármaco en el blanco.

Para fines prácticos del presente escrito, la solución dentro de los tubos de diálisis es referida como “solución interna” y la solución fuera de los tubos de diálisis es referida como “solución externa”. El experimento fue realizado por triplicado para los preparados liposomales. Se usaron tubos de diálisis de éster celulosa con MWCO de 100 kD (Biotech ce Trial Kit, SprecraPor Dialysis Membrane).

Cada tubo de diálisis fue llenado con 1 mL de PBS (Phosphate buffered saline, GoldBio, USA), luego fue introducido en un vaso de precipitado con 70 mL de este

mismo medio de liberación, este sistema se mantuvo en aTGIación constante a 150 rpm y a una temperatura de 37° C (Incubadora – ATGIadora Biocotek modelo SI-45, China). Los preparados liposomales fueron agregados a la solución externa. A intervalos de 1 hora, 1 mL de muestra fue tomado del interior de los tubos de diálisis para estimar la cantidad de insulina liberada. Para emular las características de liberación *in-vivo* de los liposomas, se realizó esta prueba en dos etapas:

Etapa 1: Fueron agregados a la solución externa, 0.4 ml de liposomas. A las horas 1, 2, 3 y 4, se tomó 1 mL de muestra del interior de los tubos de diálisis para determinar la concentración de la insulina. Después de cada toma de muestra, se adicionó un mL de medio al interior del tubo de diálisis.

Etapa 2: A la hora 4, 10 mL del buffer PBS que contenía 4% (v/v) de Triton X-100 (IBI scientific) fueron añadidos a la solución externa para obtener 80 mL de solución con 0.5% (v/v) de Triton X-100. A las horas 5, 6, 7, 8, 9 y 10, se tomó 1 mL de muestra del interior de los tubos de diálisis para determinar la concentración de la insulina. Después de cada toma de muestra, se adicionó 1 mL de medio al interior del tubo de diálisis.

### **5.6.2. Espectrofotometría UV-vis**

Para determinar la cantidad de Insulina en cada una de las muestras obtenidas del método de disolución de diálisis Inversa, se realizó mediante el uso de un espectrofotometro UV-vis (Ocean Optics Inc, detector Ocean Optics Inc. SAD 500 Serial A/D, cámara DT 1000 CE. Analytical Instrument System Inc.)

Se realizó un barrido espectrofotométrico a la insulina, en un intervalo de longitudes de onda de 200 – 400 nm. La longitud de onda máxima ( $\lambda_{\max}$ ) obtenida fue de 269 nm.

Para la elaboración de la curva de calibración se realizaron diferentes disoluciones de insulina a partir de una suspensión inyectable de concentración 100 UI/mL. Las concentraciones de las soluciones fueron 7.2, 3.6, 1.8, 0.9, 0.45 y 0.225 UI/mL. Las lecturas de las muestras se analizaron en un espectrofotómetro de UV-Vis a una longitud de onda de 269 nm.

### 5.6.3. Ajuste matemático a modelos de disolución

#### 5.6.3.1. Métodos dependientes del modelo

Los valores que se obtienen del estudio de disolución se pueden analizar cuantitativamente mediante el uso de diferentes fórmulas matemáticas. Esto incluye diferentes métodos de comparación estadística (multivariados en la mayoría de los casos) que requieren ajustar las curvas de disolución a ecuaciones o modelos que los representan. La tabla 8 presenta los modelos matemáticos no lineales probados para ajustar los datos experimentales.

MODELOS MATEMÁTICOS DE DISOLUCIÓN	
Order Zero	$F=k_0*t$
Korsmeyer-Peppas	$F=kKP*t^n$
Weibull	$F=100*{1-Exp[-((t-T_i)^\beta)/\alpha]}$
Hopfenberg	$F=100*[1-(1-kHB*t)^\alpha]$
Peppas-Sahlin	$F=k_1*t^m+k_2*t^{(2*m)}$
Gompertz	$F=100*Exp\{-\alpha*Exp[-\beta*\log(t)]\}$
Logistic	$F=100*Exp[\alpha+\beta*\log(t)]/\{1+Exp[\alpha+\beta*\log(t)]\}$
Probit	$F=100*\Phi[\alpha+\beta*\log(t)]$

Tabla 8. Modelos matemáticos de disolución con sus respectivas ecuaciones de ajuste.

Se han postulado varios modelos matemáticos para ajustar el porcentaje de datos disueltos en función del tiempo (Berry y Likar, 2007, Costa y Souza Lobo, 2001). Sin embargo, no existe un modelo universal que se ajuste a todos los perfiles de disolución y no existen criterios establecidos para seleccionar el modelo matemático adecuado (Shah y Deshpande 2014). Para determinar el modelo cinético de liberación de fármaco adecuado y la ecuación que mejor se ajusta, los datos promedio obtenidos para cada producto se ajustaron con el complemento estadístico de Microsoft Excel DDSOLVER (Zhang et al, 2010).

Los valores obtenidos para cada modelo se evaluaron con el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el AIC (Criterio de información de Akaike). El AIC se usa ampliamente como un criterio para seleccionar modelos matemáticos que se ajustan mejor a un conjunto particular de datos (Yamaoka et al., 1978). El mejor modelo sería el que tenga el mayor coeficiente de determinación. El mejor modelo es el que exhibe el valor de  $R^2$  más cercano a 1 y el que tiene el valor de AIC más bajo (Burnham y Anderson, 2004). El  $R^2$  y el AIC obtenidos permitieron un primer descarte de algunas

de las ecuaciones analizadas. Para decidir entre los restantes, se determinó si el modelo era aplicable a los datos de disolución de todos los productos analizados (Shah y Deshpande 2014).

### **5.6.3.2. Métodos independientes del modelo**

Para la determinación de la equivalencia de los datos de disolución, los documentos de orientación de la FDA (FDA-CDER, 1997) recomiendan enfoques como el del modelo independiente basado en el cálculo de los factores de diferencia ( $f_1$ ) y similitud ( $f_2$ ), que se aplica actualmente (Moore y Flanner, 1996). La principal ventaja de las ecuaciones  $f_1$  y  $f_2$  es que proporcionan una forma simple de comparar los datos. Estos se calcularon para todos los posibles pares de productos. El valor de  $f_2$  se calculó con los puntos del perfil de disolución hasta el momento en que el producto que actúa como referencia en dicha comparación se disolvió en un 85% o más.

Desde un punto de vista estadístico, este método parece ser menos discriminatorio que otros métodos, como el ANOVA y los métodos dependientes del modelo. De acuerdo con la guía de la FDA (FDA-CDER, 1997), los perfiles se consideraron similares si el valor de  $f_2$  es mayor o igual a 50 y  $f_1$  menor de 15.

$f_1$  y  $f_2$  se obtuvieron con el complemento estadístico de Microsoft Excel DDSOLVER (Zhang et al, 2010), basado en las ecuaciones 1 y 2. En ambas ecuaciones, R y T representan las mediciones de disolución en puntos de tiempo P de la referencia y la prueba, respectivamente.

La ecuación 1 describe cómo calcular  $f_2$ , mientras que  $f_1$  se muestra en la ecuación 2.

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[ 1 + (1/n) * \sum_{t=t_1}^{t_n} (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} * 100 \right\} \quad (1)$$

$$f_1 = 100 * \left[ \frac{\sum_{t=t_1}^{t_n} (R_t - T_t)}{\sum_{t=t_1}^{t_n} R_t} \right] \quad (2)$$



En otro método independiente del modelo, se usó DDSolver para calcular los valores del área bajo la curva (AUC), de acuerdo con el método de trapezoides, área entre la curva de disolución del fármaco y su asíntota (ABC), tiempo medio de disolución (MDT) y la eficacia de disolución (DE). Después de obtener esos valores para cada formulación, se compararon estadísticamente calculando la prueba ANOVA (Ruiz y Volonté, 2014).

## **5.7.PRUEBAS *IN-VIVO***

### **5.7.1. Animales (ratas wistar)**

Se usaron 73 ratas Wistar machos, adultos, albinas y sanas, de peso entre 350 a 500 gramos, proporcionadas por el Bioterio de FES-Itztacala. Las ratas se mantuvieron en la unidad de constatación de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se mantuvieron en ambiente controlado, temperatura de  $22^{\circ} \pm 3$  y humedad relativa de  $50\% \pm 5$ . Las ratas se indujeron con diabetes mellitus tipo I mediante el uso de estreptozotocina (Sigma-Aldrich). Las ratas se mantuvieron con alimento DIET y libre acceso al agua. El estudio fue aprobado por SICUAE (Subcomité de Investigación, cuidado y uso de animales experimentales) de la Universidad Nacional Autónoma de México acorde a la Ley Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### **5.7.2. Inducción experimental de Diabetes Mellitus Tipo I**

La diabetes experimental fue inducida en ratas sanas por medio de la administración intraperitoneal de estreptozotocina, se utilizó una dosis de 55 mg/Kg de peso del animal (Rakieten et al.,1963; West et al., 1996; Elsner et al., 2000). Luego de 24 horas de la administración de estreptozotocina se inició el monitoreo de la glucosa a través de toma de muestras sanguíneas de la vena coccígea por medio del uso de un glucómetro (Accu-Chek bG) y tiras reactivas de oxidasa-peroxidasa (Trinder, 1969); se les consideró como diabéticos cuando obtuvieron concentraciones mayores de 250 mg/dl (Mansouri et al., 2011).

### 5.7.3. Diseño experimental

Para la evaluación de los preparados obtenidos, las ratas se distribuyeron de forma aleatoria en once grupos que se encuentran resumidos en la Tabla 9. Adicionalmente se evaluaron los efectos de los liposomas sin carga en un grupo de animales, solo para demostrar que los liposomas per se no presentan efecto sobre los niveles de glucosa ni insulina.

Tto Grupo	STZ	Insulina Rápida Acción (IRA)			LF3 + IRA			LF3-PEG3 + IRA		
		SC	PO	TD	SC	PO	TD	SC	PO	TD
1 (n=8)	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2 (n=6)	✓	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3 (n=6)	✓	✓	---	---	---	---	---	---	---	---
4 (n=6)	✓	---	✓	---	---	---	---	---	---	---
5 (n=6)	✓	---	---	✓	---	---	---	---	---	---
6 (n=6)	✓	---	---	---	✓	---	---	---	---	---
7 (n=6)	✓	---	---	---	---	✓	---	---	---	---
8 (n=6)	✓	---	---	---	---	---	✓	---	---	---
9 (n=6)	✓	---	---	---	---	---	---	✓	---	---
10 (n=6)	✓	---	---	---	---	---	---	---	✓	---
11 (n=6)	✓	---	---	---	---	---	---	---	---	✓

Tabla 9. Grupos experimentales de ratas wistar para el estudio de liposomas flexibles cargados con Insulina. STZ=estreptozotocina, SC=vía subcutánea, PO=va oral, TD=vía transdérmica.

### 5.7.4. Determinación de la concentración de glucosa en sangre

Una vez administrada la insulina, se obtuvo la concentración de glucosa en sangre de todos los animales de todos los grupos, de la vena coccígea por medio del uso de un glucómetro (Accu-Chek® bG, Roche) y tiras reactivas de oxidasa-peroxidasa (Trinder, 1969) una toma previa a la administración y luego a los 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutos y luego cada hora hasta que reapareció la hiperglucemia.

### 5.7.5. Eutanasia de los animales

Al finalizar el estudio, las ratas permanecen con diabetes mellitus tipo I de manera irreversible de modo que los animales recibieron la eutanasia, recibieron pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/Kg IP y luego una dosis por vía intracardiaca.

### **5.7.6. Análisis Estadístico**

En la primera Fase de formulación los datos se presentan en media  $\pm$  desviación estándar. La normalidad de los datos se determinó mediante la prueba Shapiro-wilks. La comparación de las medias se realizó usando un ANOVA de dos factores, siendo el factor A, la técnica de preparación con dos niveles y el factor B, la formulación con cuatro niveles. Las diferencias entre las medias fueron determinadas mediante Tukey Test. Todos los resultados se obtuvieron mediante el uso de software estadístico (IBM SPSS statistics 20).

En la Fase II de la formulación, los datos se presentan en media  $\pm$  desviación estándar. La normalidad de los datos se determinó mediante la prueba de Shapiro-wilks, la homogeneidad de las varianzas se determinó mediante la prueba de Levene. La comparación de las medias se realizó con la prueba de ANOVA y las diferencias entre las medias mediante la prueba de Tukey. Todos los resultados se obtuvieron mediante el uso de software estadístico (IBM SPSS statistics 20).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

#### 6.1.1. Espectroscopia UV de la curva estándar

Luego de un barrido espectrofotométrico realizado al principio activo, en un intervalo de longitudes de onda de 200 – 400 nm. La absorción máxima ( $\lambda_{\max}$ ) obtenida fue 269 nm, donde la absorbancia fue de 1.356.

#### 6.1.2. Linealidad del Sistema

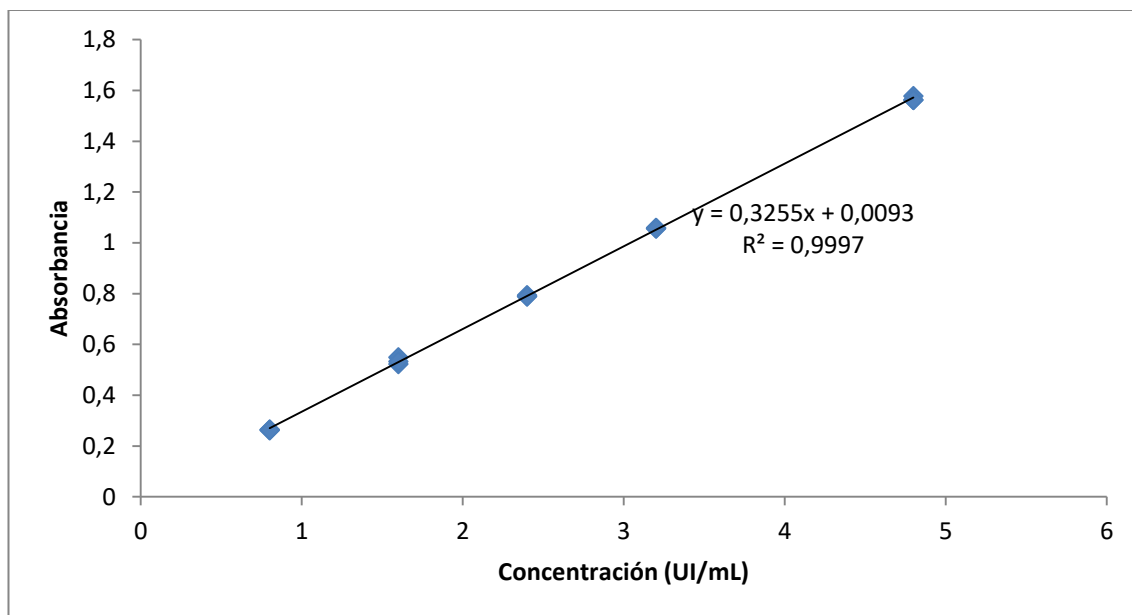
En la Tabla 10 se muestran los datos de absorbancia obtenidos para cada uno de los sistemas por triplicado.  $\epsilon$  indica el coeficiente de absortividad y se calcula como ( $\epsilon = \text{Abs}/\text{Con}$ ). El coeficiente de variación debe ser menos al 2%.

Sistema	Con (UI/ML)	Abs	$\epsilon$
1	0,8	0,2645	0,3306
1	0,8	0,2643	0,3304
1	0,8	0,262	0,3275
2	1,6	0,5218	0,3261
2	1,6	0,5484	0,3428
2	1,6	0,5325	0,3328
3	2,4	0,7931	0,3305
3	2,4	0,7897	0,3290
3	2,4	0,7888	0,3287
4	3,2	1,0574	0,3304
4	3,2	1,0585	0,3308
4	3,2	1,0557	0,3299
5	4,8	1,5771	0,3286
5	4,8	1,5618	0,3254
5	4,8	1,5614	0,3253
		<b>Prom.</b>	0,3299
		<b>SD.</b>	0,0042
		<b>CV.</b>	1,2589

Tabla 10. Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado para la determinación de la curva de calibración para la linealidad del sistema.

Los datos son sometidos a un análisis de regresión y a un análisis de varianza, donde se obtiene un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,99, un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0,99 y un intervalo de confianza de -0,00049 a 0,01901.

Para evidenciar que el sistema es lineal en la Figura 6 se muestra que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración.



**Figura 6. Curva de calibración (Concentración Vs. Absorbancia) obtenida para la Insulina. Se observa que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración.**

### 6.1.3. Precisión y exactitud

En la Tabla 11 se muestran los datos de absorbancia obtenidos para cada uno de los sistemas por sextuplicado.  $\epsilon$  indica el coeficiente de absortividad y se calcula como ( $\epsilon = \text{Abs}/\text{Con}$ ). El coeficiente de variación debe ser menos al 2%.

Sistema	Con (UI/ML)	Abs	$\epsilon$
1	0,8	0,2643	0,3304
1	0,8	0,2646	0,3308
1	0,8	0,2663	0,3329
1	0,8	0,2746	0,3433
1	0,8	0,2645	0,3306
1	0,8	0,279	0,3488
2	2,4	0,7938	0,3308
2	2,4	0,7854	0,3273

2	2,4	0,7949	0,3312
2	2,4	0,7919	0,3300
2	2,4	0,7922	0,3301
2	2,4	0,7919	0,3300
3	4,8	1,5645	0,3259
3	4,8	1,5715	0,3274
3	4,8	1,575	0,3281
3	4,8	1,567	0,3265
3	4,8	1,5739	0,3279
3	4,8	1,5754	0,3282
<b>Prom.</b>			0,3311
<b>SD.</b>			0,0058
<b>CV.</b>			1,7506

Tabla 11. Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado para la determinación de la precisión y exactitud del sistema.

#### 6.1.4. Repetibilidad

En la Tabla 12 se muestran los datos obtenidos por el mismo analista en dos días diferentes y en la Tabla 13 se muestran los datos obtenidos para los datos de manera global.

	Sistema 1		Sistema 2		Sistema 3	
	Abs	$\epsilon$	Abs	$\epsilon$	Abs	$\epsilon$
<b>Día 1</b>	0,2643	0,3304	0,7938	0,3308	1,5645	0,3259
	0,2646	0,3308	0,7854	0,3273	1,5715	0,3274
	0,2663	0,3329	0,7949	0,3312	1,575	0,3281
<b>Día 2</b>	0,2645	0,3306	0,7931	0,3305	1,5771	0,3286
	0,2643	0,3304	0,7897	0,3290	1,5618	0,3254
	0,262	0,3275	0,7888	0,3287	1,5614	0,3253
	<b>Prom.</b>	0,3304		0,3296		0,3268
	<b>SD.</b>	0,0017		0,0015		0,0014
	<b>CV.</b>	0,5191		0,4570		0,4385

Tabla 12. Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado realizadas por el mismo analista en dos días completamente diferentes.

<b>Prom general</b>	<b>0,3289</b>
<b>SD.</b>	0,0019
<b>CV.</b>	0,5779

Tabla 13. Resultados globales para los dos días de análisis.

Se realiza un Test T-student para determinar si existe diferencia entre las medias de las muestras de acuerdo a los días. Se plantean las siguientes hipótesis:

Ho: Las absorbancias obtenidas el día 1 son iguales (=) a las absorbancias obtenidas el día 2.

Ha: Las absorbancias obtenidas el día 1 son diferentes ( $\neq$ ) a las absorbancias obtenidas el día 2.

El nivel de significancia de la prueba fue de 0.05. Los resultados indican que no se rechaza Ho, de modo que hay evidencia estadística suficiente para concluir que los resultados obtenidos son los mismos para ambos días.

### 6.1.5. Reproducibilidad

En la Tabla 14 se resumen los datos obtenidos por dos diferentes analistas en dos días diferentes de análisis.

		Sistema 1		Sistema 2		Sistema 3	
		Abs	$\epsilon$	Abs	$\epsilon$	Abs	$\epsilon$
<b>Analista 1</b>	Dia 1	0,2643	0,3304	0,7938	0,3308	1,5645	0,3259
		0,2646	0,3308	0,7854	0,3273	1,5715	0,3274
		0,2663	0,3329	0,7949	0,3312	1,575	0,3281
	Dia 2	0,2645	0,3306	0,7931	0,3305	1,5771	0,3286
		0,2643	0,3304	0,7897	0,3290	1,5618	0,3254
		0,262	0,3275	0,7888	0,3287	1,5614	0,3253
<b>Analista 2</b>	Dia 1	0,2561	0,3201	0,7864	0,3277	1,5701	0,3271
		0,2567	0,3209	0,784	0,3267	1,5525	0,3234
		0,2736	0,3420	0,7802	0,3251	1,5274	0,3182
	Dia 2	0,2867	0,3584	0,7736	0,3223	1,5559	0,3241
		0,279	0,3488	0,7802	0,3251	1,5561	0,3242
		0,2746	0,3433	0,7593	0,3164	1,5239	0,3175

Tabla 14. Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado realizados por dos analistas diferentes en dos diferentes días.

Para determinar si existen diferencias entre los analistas se realizó un análisis de varianza donde se utiliza al analista como factor. Se plantean las siguientes hipótesis:

Ho: Los resultados obtenidos por analista 1 son iguales (=) a los obtenidos por analista 2

Ha: Los resultados obtenidos por analista 1 son diferentes ( $\neq$ ) a los obtenidos por analista 2

El nivel de significancia de la prueba fue de 0.05. Los resultados indican que no se rechaza Ho, de modo que hay evidencia estadística suficiente para concluir que los resultados obtenidos son los mismos para ambos analistas.

### 6.1.6. Selectividad

Se realizaron barridos espectrales en un rango de 200 a 400 nm de insulina + PBS, insulina + sacarosa al 10% e insulina + fosfatidilcolina, los datos se encuentran resumidos en la Tabla 15.

Muestra	Absorbancia	$\lambda$ (nm)
Insulina+PBS	1.356	269
Insulina+Sacarosa 10%	1.377	269
Insulina+Acetonitrilo	1.34	269
Insulina+fosfatidilcolina	3,67	269

Tabla 15. Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de muestras de Insulina con diferentes medios.

Se observa que la fosfatidilcolina interfiere con la medición de la insulina.

### 6.1.7. Robustez

En la Tabla 16 se muestran los datos obtenidos de absorbancia para las mismas muestras en dos equipos de espectroscopia diferentes: Varian Cary 1E (Spectralab Analytical) y espectrofotómetro SPECORD 210 (Analytik Jena, Alemania).

Sistema	Con (UI/ML)	Absorbancias	
		SPECORD 210	Varian Cary 1E
1	0.8	0.2561	0.2645
1	0.8	0.2567	0.2643
1	0.8	0.2736	0.2620
2	1.6	0.5278	0.5218
2	1.6	0.5319	0.5484
2	1.6	0.5323	0.5325
3	2.4	0.7864	0.7931
3	2.4	0.7840	0.7897



3	2.4	0.7802	0.7888
4	3.2	1.0452	1.0574
4	3.2	1.0527	1.0585
4	3.2	1.0371	1.0557
5	4.8	1.5525	1.5771
5	4.8	1.5559	1.5618
5	4.8	1.5561	1.5614

**Tabla 16. Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de los diferentes niveles preparados por triplicado para la determinación de la curva de calibración para la linealidad del sistema de dos diferentes equipos de espectroscopia diferentes: Varian Cary 1E (Spectralab Analytical) y espectrofotometro SPECORD 210 (Analytik Jena, Alemania).**

Para determinar si existe diferencia entre los equipos se realizó un análisis T-test donde se comparan las absorbancias obtenidas en ambos equipos. Se plantean las siguientes hipótesis:

Ho: Los resultados obtenidos en SPECORD 210 son iguales ( $=$ ) a los obtenidos por Varian Cary 1E.

Ha: Los resultados obtenidos en SPECORD 210 son diferentes ( $\neq$ ) a los obtenidos por Varian Cary 1E.

El nivel de significancia de la prueba fue de 0.05. Los resultados indican que no se rechaza Ho, de modo que hay evidencia estadística suficiente para concluir que los resultados obtenidos son los mismos para ambos equipos.

## **6.2. EVALUACIÓN ESTRUCTURAL DE INSULINA EXPUESTA A DIFERENTES TEMPERATURAS**

### **6.2.1. Absorbancia**

Se evaluó una muestra de insulina a 4°C, una muestra de insulina mantenida en temperatura ambiente (18°C aproximadamente) durante 60 minutos y una muestra de Insulina a 70°C durante 60 minutos, los resultados están resumidos en la Tabla 17.

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>
Insulina 4°C	<b>1.356</b>	<b>269</b>
Insulina Ambiente	<b>1.328</b>	<b>269</b>
Insulina 70°C	<b>1.317</b>	<b>269</b>

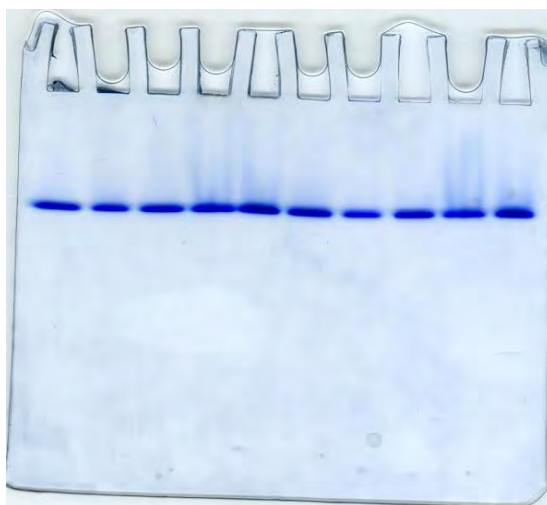
**Tabla 17. Resultados de las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 269 nm de muestras de Insulina sometidas a diferentes temperaturas.**

Los resultados muestran que no existen diferencias entre las absorbancias obtenidas para las diferentes temperaturas.

### 6.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida

En la Figura 7 podemos observar las bandas obtenidas en el procedimiento. De izquierda a derecha observamos Insulina, insulina expuesta a 60°C, Insulina expuesta a 100°C, formulado LF3 y formulado LF3-PEG3, luego se repiten nuevamente en el mismo orden.

En la tabla 18 se muestran los resultados de la citometría de las bandas electroforéticas, todas las mediciones son estadísticamente iguales para todas las muestras, lo que indica que la insulina permanece completamente integra después de la preparación de los liposomas.



**Figura 7. Bandas de insulina obtenidas por electroforesis gel de Poliacrilamida. De derecha a izquierda as bandas corresponden a Insulina 4°C, Insulina 100°C, Insulina 60°C, preparado LF3, preparado LF3-PEG3 y una repetición de cada uno en el mismo orden.**

<b>Citometria de las Bandas de Electroforesis</b>					
<b>UAD</b>	<b>Insulin</b>	<b>Insulina 60°</b>	<b>Insulina 100°</b>	<b>LF3</b>	<b>LF3-PEG3</b>
<b>Promedio</b>	13691,2 <sub>a</sub>	11357,57 <sub>a</sub>	9242,06 <sub>a</sub>	14689,24 <sub>a</sub>	15777,38 <sub>a</sub>
<b>±SD</b>	1964,62	1398,16	1126,94	1606,08	1967,08

**Tabla 18. Resultado de la citometria de las bandas de electroforesis obtenidas para las muestras de insulina expuestas a diferentes temperaturas y de los preparados LF3 y LF3-PEG3. <sub>a-b</sub> Las columnas con el mismo subíndice no muestran diferencias estadísticas sigDificativas.**

### 6.2.3. Espectroscopia Infrarrojo

En la espectroscopia infrarroja (IR), la estructura nativa de la insulina se caracteriza por un pico a  $1656\text{ cm}^{-1}$  (Bouchard et al., 2000). La relación de los picos entre todas las muestras de insulinas es la misma, entonces no se producen cambios estructurales significativos con la exposición a  $60^\circ\text{C}$  o  $100^\circ\text{C}$ , podemos verlo en la Figura 8.

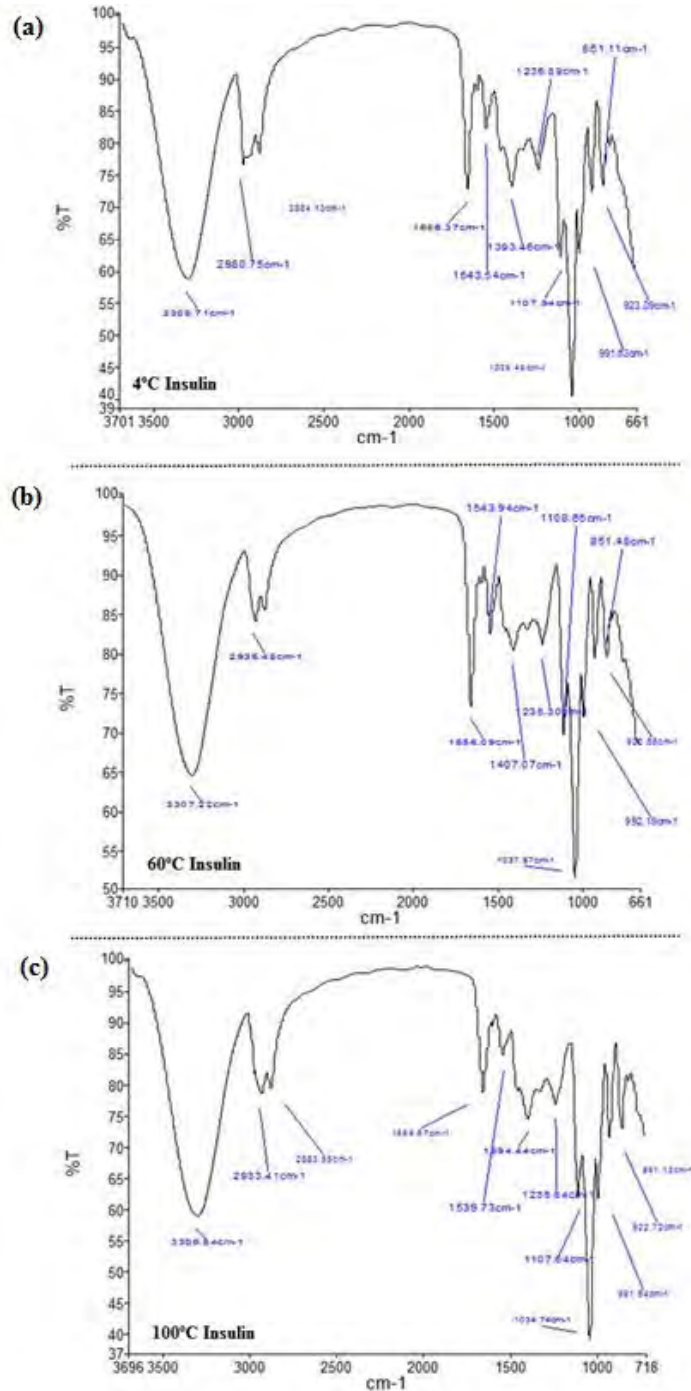


FIGURA 8. Espectros de infrarrojos obtenidos para la insulina a  $4^\circ\text{C}$  (a) y después de calentamiento a  $60^\circ\text{C}$  (b) y  $100^\circ\text{C}$  (c) durante 4 horas. La relación de los picos entre todas las muestras de insulinas es la misma, entonces no se producen cambios estructurales significativos con la exposición a  $60^\circ\text{C}$  o  $100^\circ\text{C}$ .

### 6.2.4. Calorimetría Diferencial de Barrido

Luego de obtener el termograma para la insulina recombinante humana en un barrido hasta 100°C a una velocidad de barrido de 1°C / min. El análisis muestra que la insulina se desnaturaliza con temperaturas por arriba de los 85°C. En la Figura 9, observamos el comportamiento de la insulina.

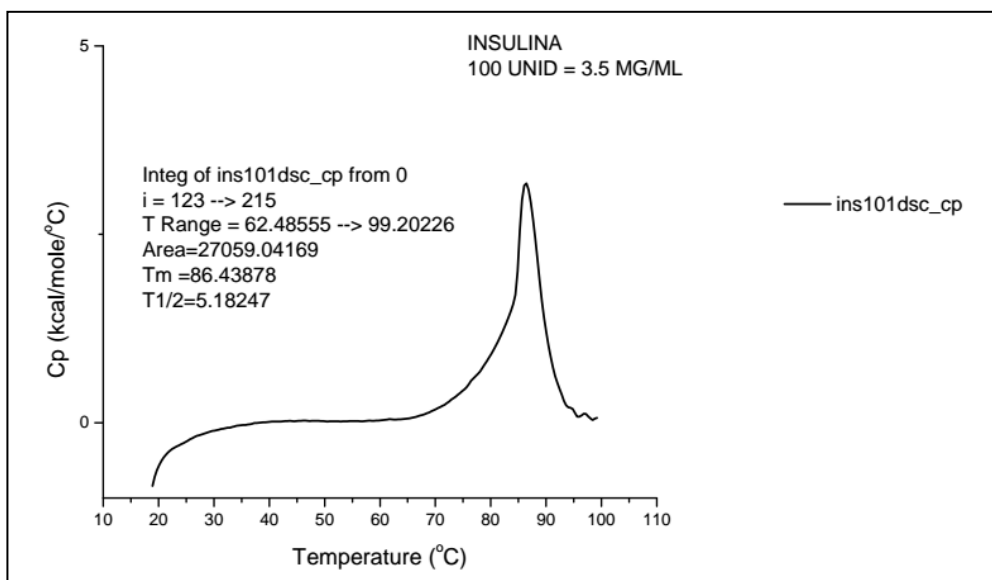


FIGURA 9. Termograma obtenido para la insulina recombinante humana en un barrido hasta 100°C.

## 6.3. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES DE FASE 1

### 6.3.1. Tamaño de los liposomas

Se evaluaron los liposomas el día uno de preparación y se evaluaron todas las muestras sin filtrar, ya que de acuerdo a mediciones previas, se observó que gran parte de la insulina queda atrapada en el filtro. Se muestran los resultados obtenidos para ambos métodos de preparación. Los datos se encuentran en las Tablas 19 y 20, donde se observan que todos los preparados de la técnica de rehidratación de película delgada (RPD) presenta una distribución de tres tamaños de partícula, mientras que mediante la técnica de calentamiento (Heating Method) el preparado LF1 y LF3 presentan una distribución de dos tamaños y el LF5 una distribución más uniforme a un solo tamaño.

Tamaño de partícula Técnica de rehidratación de Película delgada							
Preparad o	Promedi o Z (d.nm)	Pk 1 Mean (d.nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 Mean (d.nm)	Pk 2 (%)	Pk 3 Mean (d.nm)	Pk 3 (%)

<b>LF1</b>	1385	947.2	8.4	125.1	19.6	0	0
	1081	1134	79,6	170,7	20,4	0	0
	1287	1117	68.6	235.7	26.2	44	4.4
<b>Prom</b>	<b>1251.00</b>	<b>1066.06</b>	<b>52.2</b>	<b>177.16</b>	<b>22.06</b>	<b>14.66</b>	<b>1.46</b>
<b>SD</b>	<b>±155.16</b>	<b>±103.29</b>	<b>±38.32</b>	<b>±55.58</b>	<b>±3.60</b>	<b>±25.40</b>	<b>±2.54</b>
<b>LF2</b>	1207	1009	51	4782	34.9	277.9	14.2
	1805	980	55,2	3240	28.8	189	16
	1460	948.5	52,1	4211	29.8	233.45	18.1
<b>Prom</b>	<b>1490.67</b>	<b>994.50</b>	<b>52.77</b>	<b>4077.67</b>	<b>31.17</b>	<b>233.45</b>	<b>16.10</b>
<b>SD</b>	<b>±300.18</b>	<b>±574.36</b>	<b>±2.18</b>	<b>±779.60</b>	<b>±3.27</b>	<b>±44.45</b>	<b>±1.95</b>
<b>LF3</b>	563.4	1678	74.4	237.9	19.6	68.68	6
	555	1751	77.6	241.1	22.4	0	0.0
	579.6	669.4	55.1	335.1	34.9	87.06	10
<b>Prom</b>	<b>566.00</b>	<b>1366.13</b>	<b>69.03</b>	<b>271.37</b>	<b>25.63</b>	<b>51.91</b>	<b>8.00</b>
<b>SD</b>	<b>±12.50</b>	<b>±604.49</b>	<b>±12.17</b>	<b>±55.22</b>	<b>±8.15</b>	<b>±45.89</b>	<b>±5.03</b>
<b>LF4</b>	559.8	830.8	51.8	4152	31.7	117.5	16.5
	699.2	836.2	76.9	123.4	20.7	5560	2.4
	638.7	910	61.3	149.6	23	5231	13.5
<b>Prom</b>	<b>632.57</b>	<b>859.00</b>	<b>63.33</b>	<b>1475.00</b>	<b>25.13</b>	<b>3636.17</b>	<b>10.80</b>
<b>SD</b>	<b>±69.90</b>	<b>±44.25</b>	<b>±12.67</b>	<b>±2318.39</b>	<b>±5.80</b>	<b>±3051.69</b>	<b>±7.43</b>

**Tabla 19. Datos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de película delgada a las 24 horas de su fabricación.**

Tamaño de partículas Heating Method							
Preparado	Promedio Z (d.nm)	Pk 1 Mean (d.nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 Mean (d.nm)	Pk 2 (%)	Pk 3 Mean (d.nm)	Pk 3 (%)
<b>LF1</b>	1179	633,3	91,2	91,04	8,8	0	0
	1051	661,1	90,3	108,4	9,7	0	0
	1028	726,5	90,9	102,3	9,1	0	0
<b>Prom</b>	<b>1086,00</b>	<b>673,63</b>	<b>90,80</b>	<b>100,58</b>	<b>9,20</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>SD</b>	<b>±81,36</b>	<b>±47,85</b>	<b>±0,46</b>	<b>±8,81</b>	<b>±0,46</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>LF2</b>	1108	989	51,9	4482	34	280	14,2
	1098	1001	49,2	4210	31,7	209	19,1
	1170	1032	52,1	4022	33	240	14,9
<b>Prom</b>	<b>1125,33</b>	<b>1007,33</b>	<b>51,07</b>	<b>4238,00</b>	<b>32,90</b>	<b>243,00</b>	<b>16,07</b>
<b>SD</b>	<b>±39,00</b>	<b>±22,19</b>	<b>±1,62</b>	<b>±231,27</b>	<b>±1,15</b>	<b>±35,59</b>	<b>±2,65</b>

<b>LF3</b>	668,3	611,8	84,9	117,8	15,1	0	0
	669	597,7	85,8	115,6	14,2	0	0
	608,2	624,6	86,1	138,3	13,9	0	0
<b>Prom</b>	<b>648,50</b>	<b>611,37</b>	<b>85,60</b>	<b>123,90</b>	<b>14,40</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>SD</b>	<b>±34,90</b>	<b>±13,46</b>	<b>0,62</b>	<b>±12,52</b>	<b>0,62</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>LF4</b>	446	1677	52,9	260,3	40,1	4889	7
	408,7	1238	61,3	209,9	35,7	4982	3,1
	446,7	543,4	76	4517	14,9	79,07	8,8
<b>Prom</b>	<b>433,80</b>	<b>1152,80</b>	<b>63,40</b>	<b>1662,40</b>	<b>30,23</b>	<b>3316,69</b>	<b>6,30</b>
<b>SD</b>	<b>±21,74</b>	<b>±571,58</b>	<b>±11,69</b>	<b>±2472,28</b>	<b>±13,46</b>	<b>±2804,25</b>	<b>±2,91</b>
<b>LF5</b>	1321	413,4	100	0	0	0	0
	1332	420,2	100	0	0	0	0
	1168	485	100	0	0	0	0
<b>Prom</b>	<b>1273,67</b>	<b>439,53</b>	<b>100,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
<b>SD</b>	<b>±91,68</b>	<b>±39,52</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

**Tabla 20. Datos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de calentamiento una vez terminada su fabricación.**

En la tabla 21 se muestra una comparación entre los métodos de preparación con respecto al tamaño que predomina en cada uno de los formulados y en el porcentaje en el que se presenta dicho predominio, donde podemos observar que con el Método de Calentamiento se obtuvieron tamaños de partícula más pequeños.

<b>Preparado</b>	<b>Rehidratación</b>		<b>Heating Method</b>	
	<b>Tamaño predominante</b>	<b>%</b>	<b>Tamaño predominante</b>	<b>%</b>
<b>LF1</b>	1066,66 ±103,29	52,2%	673,63 ±47,85	90,80%
<b>LF2</b>	994,50 ±574,36	52,77%	1007,33 ±22,19	51,07%
<b>LF3</b>	1366,13 ±604,49	69,03%	611,37 ±13,46	85,60%
<b>LF4</b>	859,00 ±44,25	63,33%	1152,80 ±571,58	63,40%
<b>LF5</b>	----	----	439,53 ±39,52	100,00%

**Tabla 21. Datos comparativos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de película**

delgada y el método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación, donde se muestran los tamaños predominantes para cada uno de los preparados.

### 6.3.2. Índice de Polidispersión

En la tabla 22 se muestra una comparación entre los métodos de preparación con respecto al índice de polidispersión que predomina en cada uno de los formulados de la Fase I.

	Rehidratación de película delgada	Heating Method
<b>Preparado</b>		
<b>LF1</b>	0.39	0.694
	0.555	0.729
	0.468	0.588
<b>Prom</b>	<b>0.471</b>	<b>0.6703333</b>
<b>SD</b>	<b>±0.0825409</b>	<b>±0.0734189</b>
<b>LF2</b>	0.34	0.93
	0.331	0.921
	0.34	0.98
<b>Prom</b>	<b>0.337</b>	<b>0.9436667</b>
<b>SD</b>	<b>±0.0051962</b>	<b>±0.0317857</b>
<b>LF3</b>	0.688	0.650
	0.674	0.754
	0.590	0.570
<b>Prom</b>	<b>0.6506667</b>	<b>0.658</b>
<b>SD</b>	<b>±0.0530031</b>	<b>±0.0922605</b>
<b>LF4</b>	1	0.825
	0.936	0.717
	0.993	0.474
<b>Prom</b>	<b>0,976333333</b>	<b>0.672</b>
<b>SD</b>	<b>±0,035104606</b>	<b>±0.1797749</b>
<b>LF5</b>	---	0.919
	---	0.886
	---	0.811
<b>Prom</b>	<b>---</b>	<b>0.872</b>
<b>SD</b>	<b>---</b>	<b>±0.0553444</b>

Tabla 22. Datos comparativos del Índice de Polidispersión (IPD) obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de

película delgada y el método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación, donde se muestran el estimado para la distribución de tamaños de partículas para cada uno de los preparados.

El análisis estadístico (Two-way ANOVA) muestra la interacción entre el método de preparación y la formulación en el índice de polidispersión.

Las medias IPD fueron estadísticamente iguales para LF1 y LF2 en el método de rehidratación de película delgada e iguales para LF1, LF2 y LF4 para el método de calentamiento luego de realizar un test de Tukey. Todas las muestras muestran una distribución heterogénea, con la excepción de LF2 de rehidratación de película delgada que muestra una IPD baja.

### 6.3.3. Potencial Z

En la Tabla 23 se muestran los datos obtenidos para potencial Z realizados 24 horas posteriores a la preparación de todos los formulados de transfersomas para ambos métodos de fabricación.

	Rehidratación de película delgada	Heating Method
Preparado	ZP (mV)	ZP (mV)
LF1	-31,3	-45,8
	-29,5	-47,7
	-30,6	-47
Prom	-30,47	-46,83
SD	±0,91	±0,96
LF2	-26,2	-26,8
	-24,5	-26,5
	-24,4	-25,8
Prom	-25,03	-26,37
SD	±1,01	±0,51
LF3	-34,9	-70,1
	-36,7	-71,8
	-36,9	-68,7
Prom	-36,17	-70,20
SD	±1,10	±1,55
LF4	-44,7	-0,99
	-46	-1,02
	-44,6	-1,1



<b>Prom</b>	<b>-45,10</b>	<b>-1,04</b>
<b>SD</b>	<b>±0,78</b>	<b>±0,06</b>
<b>LF5</b>	----	-64,2
	----	-58,2
	----	-58,6
<b>Prom</b>		<b>-60,33</b>
<b>SD</b>		<b>±3,35</b>

**Tabla 23. Datos comparativos de potencial Zeta obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de rehidratación de película delgada y método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación.**

El análisis estadístico (Two-way ANOVA) muestra la interacción entre el método de preparación y la formulación en el potencial zeta. El potencial zeta muestra diferencias estadísticas entre los métodos de preparación y en las formulaciones.

En el potencial Zeta, las medias fueron estadísticamente diferentes para todas las formulaciones, con la excepción de LF4 del método de Calentamiento, el resto de las formulaciones mostraron valores adecuados.

#### **6.3.4. Porcentaje de encapsulamiento**

Con el fin de sedimentar por completo los fosfolípidos y que no exista interferencia con la medición de la insulina, se decide adicionar Acetonitrilo. Se realiza una curva de calibración de insulina + acetonitrilo, de la siguiente manera: 1 mL de insulina en 2.5 mL de acetonitrilo y c.b.p 25 mL de sacarosa al 10%. Se realiza un barrido espectral de 200 a 400 nm y se obtiene un  $\lambda$  de 269 con absorbancia de 1.34. De modo que, se observa que el acetonitrilo no altera la insulina.

Se obtienen muestras del sobrenadante obtenido posterior a la ultra centrifugación de las muestras, se realiza medición espectral a estas fases y los preparados completos, para obtener por diferencia el porcentaje de encapsulamiento. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 24.

Preparado	Rehidratación de Película delgada		Heating Method	
	%encapsulado	%no encapsulado	%encapsulado	%no encapsulado
LF1	36,2	63,8	41,49	58,51
	38,85	61,15	38,66	61,34
	34,92	65,08	42,53	57,47
<b>Prom</b>	<b>36,661</b>	<b>63,34</b>	<b>40,89</b>	<b>59,10</b>
<b>SD</b>	<b>±2,002</b>	<b>±2,004</b>	<b>±2</b>	<b>±2,0028</b>
LF2	28,03	71,97	31,02	68,98
	29,45	70,55	41,56	58,44
	31,98	68,02	34,73	65,27
<b>Prom</b>	<b>29,82</b>	<b>70,18</b>	<b>35,77</b>	<b>64,23</b>
<b>SD</b>	<b>±2,0017</b>	<b>±2,00082</b>	<b>±5,34</b>	<b>±5,34</b>
LF3	54,19	45,81	60,29	39,71
	52,43	47,57	59,21	40,79
	47,14	52,86	64,29	35,71
<b>Prom</b>	<b>51,25</b>	<b>48,74</b>	<b>61,26</b>	<b>38,73</b>
<b>SD</b>	<b>±3,66</b>	<b>±3,669</b>	<b>±2,67</b>	<b>±2,67</b>
LF4	49,8	50,2	67,94	32,06
	59,81	40,19	62,89	37,11
	62,04	37,96	66,67	33,33
<b>Prom</b>	<b>57,21</b>	<b>42,78</b>	<b>65,83</b>	<b>34,16</b>
<b>SD</b>	<b>±6,52</b>	<b>±6,519</b>	<b>±2,62</b>	<b>±2,62</b>
LF5	----		65,36	34,64
	----		66,7	33,3
	----		62,9	37,1
<b>Prom</b>	<b>----</b>	<b>64,99</b>	<b>35,01</b>	
<b>SD</b>	<b>----</b>	<b>±1,92</b>	<b>±1,92</b>	

**Tabla 24. Datos de porcentaje de encapsulamiento obtenidos por diferencia de mediciones espectrofotométricas del sobrenadante obtenido mediante ultracentrifugación de las muestras y formulación completa para los preparados de liposomas flexibles elaborados mediante el método de rehidratación de película delgada y técnica de calentamiento.**

El porcentaje de encapsulación muestra diferencias estadísticas tanto en el preparado como en la técnica de manufactura. El porcentaje de encapsulamiento de LF2 fue estadísticamente igual a LF1 y LF3 estadísticamente igual a LF4 para ambas técnicas. Sin embargo, el método de calentamiento mostró un mejor porcentaje de encapsulación de insulina en comparación con la misma formulación preparada por el otro método.

#### 6.4. CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS FLEXIBLES DE FASE 2

De acuerdo a los resultados de la Fase 1, se considera que la técnica que presenta mejores características es la de “Heating method”. De los preparados obtenidos por esta técnica el que presenta mejor porcentaje de encapsulamiento, potencial z y tamaño de partícula es el LF3. De modo que se escoge esta formulación para la adición de PEG-2000 PE con el fin de generar un recubrimiento que genere protección contra la degradación de insulina y un alargamiento de la vida media.

##### 6.4.1. Tamaño de los liposomas

Se evaluaron los liposomas LF3 obtenidos mediante la técnica de Heating Method con adición de PEG-2000 PE en diferentes proporciones el día uno de preparación y se evaluaron todas las muestras sin filtrar. Se muestran los resultados en la Tabla 25.

Tamaño de particular Heating Method							
Preparado	Promedio Z (d.nm)	Pk 1 Mean (d.nm)	Pk 1 (%)	Pk 2 Mean (d.nm)	Pk 2 (%)	Pk 3 Mean (d.nm)	Pk 3 (%)
<b>LF3-PEG1</b>	793.0	578.5	90.3	71.55	9.7	0.000	0.000
	898.2	476.0	92.0	54.98	8.0	0.000	0.000
	855.4	680.2	85.0	119.2	15.0	0.000	0.000
<b>Prom</b>	<b>848.87</b>	<b>578.23</b>	<b>89.10</b>	<b>81.91</b>	<b>10.90</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>SD</b>	<b>±52.90</b>	<b>±102.10</b>	<b>±3.65</b>	<b>±33.34</b>	<b>±3.65</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>LF3-PEG2</b>	524.7	621.3	79.9	108.0	18.1	5560	2.0
	505.3	771.5	70.5	161.0	24.8	5376	4.7
	541.7	601.0	73.9	126.5	18.5	5374	7.5
<b>Prom</b>	<b>523.90</b>	<b>664.60</b>	<b>74.77</b>	<b>131.83</b>	<b>20.47</b>	<b>5436.67</b>	<b>4.73</b>
<b>SD</b>	<b>±18.21</b>	<b>±93.13</b>	<b>±4.76</b>	<b>±26.90</b>	<b>±3.76</b>	<b>±106.81</b>	<b>±2.75</b>
<b>LF3-PEG3</b>	547.0	825.2	74.4	200.0	22.9	5381	2.7
	551.5	641.5	77.8	143.3	12.4	5026	9.7
	540.0	1269	100.0	0.000	0.0	0.000	0.0
<b>Prom</b>	<b>546.17</b>	<b>911.90</b>	<b>84.07</b>	<b>114.43</b>	<b>11.77</b>	<b>3469.00</b>	<b>4.13</b>
<b>SD</b>	<b>±5.80</b>	<b>±322.61</b>	<b>±13.90</b>	<b>±103.08</b>	<b>±11.46</b>	<b>±3009.48</b>	<b>±5.01</b>
<b>LF3-</b>	406.9	507.7	70.3	110.6	29.7	0.000	0.0

<b>PEG4</b>	411.4	512.3	66.0	122.2	34.0	0.000	0.0
	389.2	526.1	76.1	80.63	14.5	5182	9.4
<b>Prom</b>	<b>402.50</b>	<b>515.37</b>	<b>70.80</b>	<b>104.48</b>	<b>26.07</b>	<b>1727.33</b>	<b>3.13</b>
<b>SD</b>	<b>±11.74</b>	<b>±9.58</b>	<b>±5.07</b>	<b>±21.45</b>	<b>±10.25</b>	<b>±2991.83</b>	<b>±5.43</b>
<b>LF3-PEG5</b>	768.2	656.7	89.6	82.62	10.4	0.000	0.000
	768.2	543.5	93.9	48.07	6.1	0.000	0.000
	750.4	590.2	91.2	80.81	8.8	0.000	0.000
<b>Prom</b>	<b>762.27</b>	<b>596.80</b>	<b>91.57</b>	<b>70.50</b>	<b>8.43</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>
<b>SD</b>	<b>±10.28</b>	<b>±56.89</b>	<b>±2.17</b>	<b>±19.45</b>	<b>±2.17</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00</b>

**Tabla 25. Datos de tamaño de partícula obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de calentamiento una vez realizada su fabricación.**

El tamaño de partícula y la distribución de tamaños se expresaron en valores de intensidad. La distribución de la intensidad describe la cantidad de luz que se dispersa por las partículas en los compartimientos de diferentes tamaños (Malvern, 2017). Los resultados muestran que LF3-PEG1, LF3-PEG5 presentan dos grupos de partículas, mientras que LF3-PEG2, LF3-PEG3 y LF3-PEG4 presentan tres grupos diferentes de tamaños. El grupo de tamaño más predominante en cada formulación es superior a 500 nm, sin embargo esto se ponderó de acuerdo con la intensidad de dispersión de cada partícula.

#### 6.4.2. Índice de Polidispersión

En la siguiente tabla (Tabla 26) se muestra una comparación entre los métodos de preparación con respecto al índice de polidispersión (IPD) que predomina en cada uno de los formulados de la Fase II.

<b>Índice de Polidispersión - Heating Method</b>					
<b>Preparado</b>	<b>LF3-PEG1</b>	<b>LF3-PEG2</b>	<b>LF3-PEG3</b>	<b>LF3-PEG4</b>	<b>LF3-PEG5</b>
<b>IPD</b>	0.734	0.638	0.475	0.594	0.696
	0.770	0.627	0.491	0.609	0.666
	0.721	0.679	0.513	0.642	0.686
<b>Prom</b>	<b>0.741<sub>a</sub></b>	<b>0.648<sub>a</sub></b>	<b>0.493</b>	<b>0.615<sub>a</sub></b>	<b>0.682<sub>a</sub></b>
<b>SD</b>	<b>±0.025383722</b>	<b>±0.02740438</b>	<b>±0.01907878</b>	<b>±0.02455606</b>	<b>±0.01527525</b>

**Tabla 26. Datos comparativos del Índice de Polidispersión (IPD) obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles con PEG-2000 PE preparados mediante el método de calentamiento a las 24 horas de su fabricación, donde se muestran el estimado para la distribución de tamaños de partículas para cada uno de los preparados.**

El índice de polidispersión es un número calculado a partir de un ajuste simple de 2 parámetros a los datos de correlación. Los resultados muestran que las medias son estadísticamente iguales para todos los grupos con excepción de LF3-PEG3. Todas las muestras muestran una distribución heterogénea.

### 6.4.3. Potencial Z

En la Tabla 27 se muestran los datos obtenidos para potencial Z obtenidos luego de la preparación de todos los formulados de transfersomas para el método de Calentamiento.

Potencial Z - Heating Method					
Preparado	LF3-PEG1	LF3-PEG2	LF3-PEG3	LF3-PEG4	LF3-PEG5
ZP (mV)	-65.5	-46.6	-31.7	-33.3	-56.9
	-64.3	-45.3	-33.4	-34.5	-56.1
	-64.6	-49.5	-32.5	-35.2	-55.0
<b>Prom</b>	<b>-64.8</b>	<b>-47.13</b>	<b>-32.53<sub>a</sub></b>	<b>-34.33<sub>a</sub></b>	<b>-56</b>
<b>SD</b>	<b>0.62</b>	<b>2.15</b>	<b>0.85</b>	<b>0.96</b>	<b>0.95</b>

Tabla 27. Datos de potencial Zeta obtenidos mediante el Zetasaizer® para los preparados de liposomas flexibles preparados mediante el método de calentamiento posterior a su periodo de fabricación.

Los preparados LF3-PEG3 y LF3-PEG4 no muestran diferencias significativas en el resultado del potencial Z. Sin embargo todos los preparados presentan adecuado potencial zeta.

### 6.4.4. Porcentaje de encapsulamiento

Se obtienen muestras del sobrenadante obtenido posterior a la ultra centrifugación de las muestras, se realiza medición espectral al sobrenadante y a los preparados completos, para obtener por diferencia el porcentaje de encapsulamiento. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 28 y 29.

Heating Method		
Preparado	% no encapsulado	% encapsulado
LF3-PEG1	66.21	33.79
	69.84	30.15
	62.10	37.89
<b>Prom</b>	<b>66.06</b>	<b>33.94</b>
<b>SD</b>	<b>±3.87</b>	<b>±3.87</b>

<b>LF3-PEG2</b>	59.16	40.84
	48.97	51.03
	54.60	45.40
<b>Prom</b>	<b>54.24</b>	<b>45.76</b>
<b>SD</b>	<b>±5.10</b>	<b>±5.10</b>
<b>LF3-PEG3</b>		
	22.66	77.34
	15.93	84.07
	15.75	84.24
<b>Prom</b>	<b>18.12</b>	<b>81.88</b>
<b>SD</b>	<b>±3.94</b>	<b>±3.94</b>
<b>LF3-PEG4</b>		
	63.90	36.10
	57.58	42.41
	58.60	41.39
<b>Prom</b>	<b>60.03</b>	<b>39.97</b>
<b>SD</b>	<b>±3.39</b>	<b>±3.39</b>
<b>LF3-PEG5</b>		
	53.09	46.91
	68.16	31.84
	59.25	40.75
<b>Prom</b>	<b>60.16</b>	<b>39.84</b>
<b>SD</b>	<b>±7.58</b>	<b>±7.58</b>

Tabla 28. Datos de porcentaje de encapsulamiento obtenidos por diferencia de mediciones espectrofotométricas del sobrenadante obtenido mediante ultracentrifugación de las muestras y formulación completa para los preparados de liposomas flexibles con adición de diferentes porcentajes de PEG-2000 PE elaborados mediante el método técnica de calentamiento.

Porcentaje de Encapsulamiento - Heating Method					
Preparado	LF3-PEG1	LF3-PEG2	LF3-PEG3	LF3-PEG4	LF3-PEG5
% encap (mV)	33.94 <sub>a</sub>	45.76 <sub>a</sub>	81.88	39.97 <sub>a</sub>	39.84 <sub>a</sub>
	±3.87	±5.10	±3.94	±3.39	±7.58

Tabla 29. Datos de porcentaje de encapsulamiento obtenidos por diferencia de mediciones espectrofotométricas del sobrenadante obtenido mediante ultracentrifugación de las muestras y formulación completa para los preparados de liposomas flexibles con adición de diferentes porcentajes de PEG-2000 PE PE. <sub>a-b</sub> Las columnas con el mismo subíndice no muestran diferencias estadísticas significativas.

Estadísticamente ningún preparados muestra diferencia estadística con excepción de LF3-PEG3. El mayor porcentaje de atrapamiento de principio activo fue alcanzado por dicho preparado.

## 6.5. ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES

Se evaluaron los liposomas LF3 y LF3-PEG3 el día uno de preparación, a los treinta y a los sesenta días (Tabla 30 y 31).

Estabilidad de formulación LF3							
Día	Size Peak 1		Size Peak 2		Size Peak 3		Z potential
	Mean	%	Mean	%	Mean	%	mV
<b>1</b>	611.36 <sub>a</sub>	85.60	123.90 <sub>a</sub>	14.40	0.00	0.00	-70.20 <sub>ab</sub>
	±13.45	±0.62	±12.51	±0.62	0.00	0.00	±1.55
<b>30</b>	744.00	70.46	140.06 <sub>a</sub>	25	5363.00 <sub>a</sub>	4.56	-72.90 <sub>a</sub>
	±35.06	±1.55	±3.51	±1.85	±56.92	±1.30	±1.76
<b>60</b>	593.60 <sub>a</sub>	83.3	121.16 <sub>a</sub>	12.26	5505.00 <sub>a</sub>	4.46	-68.73 <sub>b</sub>
	±16.95	±2.12	±25.82	±2.19	±95.26	±2.85	±0.66

Tabla 30. Distribución de tamaño de partícula y Potencial Z de las muestras de LF3 al día 1, 30 y 60 de almacenamiento a 4°C <sub>a-b</sub> Las columnas con el mismo subíndice no muestran diferencias estadísticas significativas.

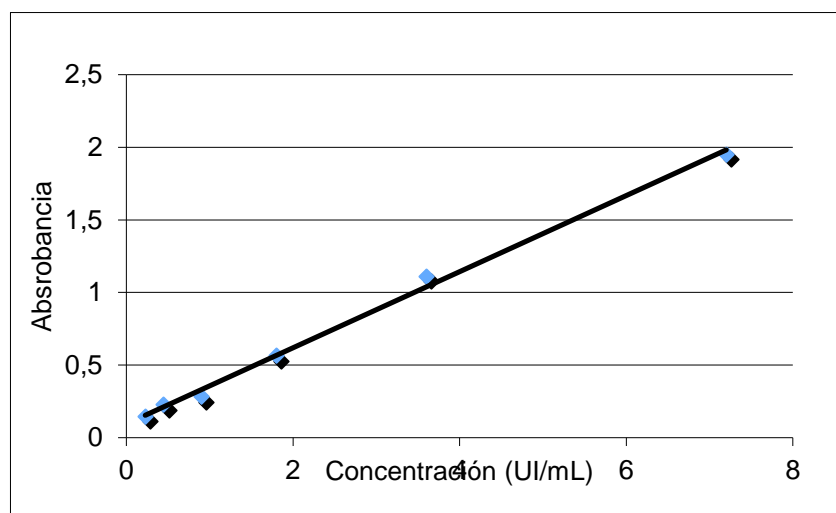
Estabilidad de LF3-PEG3							
Día	Size Peak 1		Size Peak 2		Size Peak 3		Z potential
	Mean	%	Mean	%	Mean	%	mV
<b>1</b>	911.90 <sub>b</sub>	74.77	114.43 <sub>a</sub>	11.77	3469.00	4.13	-53.90 <sub>a</sub>
	±322.60	±4.76	±103.07	±11.46	±3009.48	±5.01	±2.95
<b>30</b>	285.50 <sub>a</sub>	79.2	64.49 <sub>a</sub>	20.8	0.00	0.00	-54.20 <sub>a</sub>
	±24.92	±2.47	±5.25	±2.47	± 0.00	0.00	±2.30
<b>60</b>	475.23 <sub>ab</sub>	71.13	97.87 <sub>a</sub>	28.86	0.00	0.00	-45.70
	±21.17	±3.45	±16.31	±3.45	± 0.00	0.00	±2,22

Tabla 31. Distribución de tamaño de partícula y Potencial Z de las muestras de LF3-PEG3 al día 1, 30 y 60 de almacenamiento a 4°C <sub>a-b</sub> Las columnas con el mismo subíndice no muestran diferencias estadísticas significativas.

Estadísticamente, el tamaño de LF3 no mostró diferencias en el día sesenta en comparación con el día 1, ni potencial zeta mostró diferencias. LF3-PEG3 no mostró diferencias entre el día 1 y el día 30 ni en el día 1 y día 60 relacionados con el tamaño, sin embargo, el potencial zeta mostró diferencia estadística con el día 60, el potencial z disminuyó en comparación con el día 30 y el día 1.

## 6.6. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN *IN-VITRO*

La curva de calibración obtenida se aprecia en la figura 10.



**Figura 10. Curva de Calibración de Insulina, donde se observa variación de la absorbancia en función de la concentración.**

La ecuación de la recta obtenida fue:  $y = 0.2619x + 0.0952$  con una  $R^2 = 0.99647$

Las muestras obtenidas para la prueba de disolución fueron medidas a 269 nm, usando la ecuación obtenida en la curva de calibración, se puede obtener la concentración de insulina en función de la absorbancia de cada muestra tomada durante la experimentación.

El perfil de liberación del fármaco se realizó solo para LF3 y LF3-PEG3. Las curvas de disolución se compararon mediante la prueba univariante ANOVA; mostró diferencias estadísticas en todos los intervalos de tiempo con la excepción de las 4 y 5 horas para el medio HCl ( $p < 0.05$ ). En la figura 11 se muestran las curvas obtenidas para ambas formulaciones en este medio de disolución, la desviación estándar es tan pequeña que no se percibe, el 84.64% de insulina se liberó 4 horas después de la adición de TRITON, mientras que el 20.78% de la insulina fuera liberada antes en la formulación LF3. En la formulación LF3-PEG3 el 90.87% fue liberado en 4 horas, después de la adición de TRITON y 22.92% antes. Para PBS, las curvas medias mostraron diferencias estadísticas en todos los intervalos de tiempo ( $p < 0.05$ ). La figura 12 muestra el perfil de



liberación obtenido para ambas formulaciones en medio PBS, la desviación estándar es tan pequeña que no se percibe, el 97.43% de la insulina se liberó 5 horas después de la adición de TRITON y solo el 3.22% antes para la formulación de LF3. El porcentaje de liberación de LF3-PEG3 fue 77.43% por el mismo tiempo después de TRITON y 1.46% antes. antes.

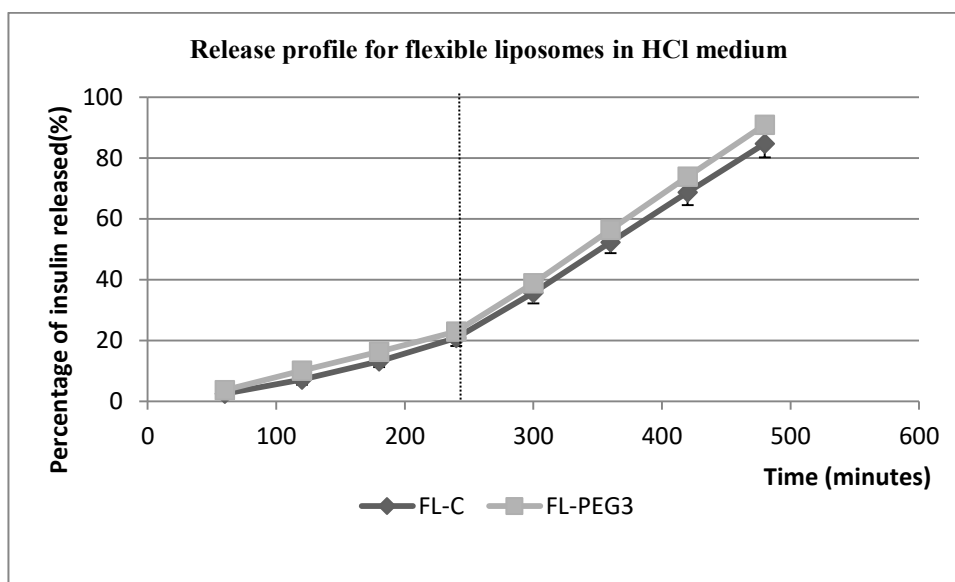


Figura 11. Perfil de liberación de insulina de los preparados LF3 y LF3-PEG3 en medio ácido. La línea punteada indica el momento en que se agregó el surfactante TRITON.

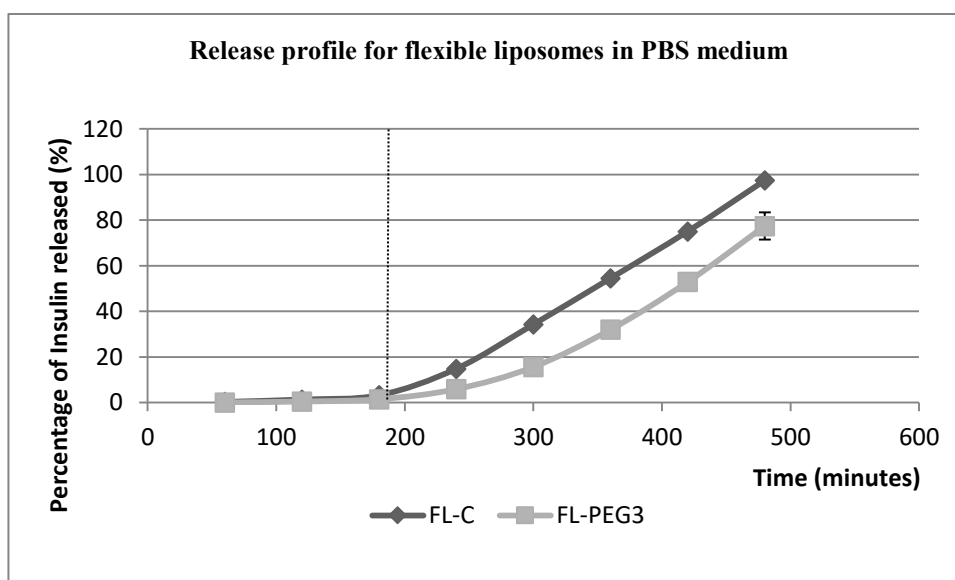


Figura 12. Perfil de liberación de insulina de los preparados LF3 y LF3-PEG3 en medio PBS. La línea punteada indica el momento en que se agregó el surfactante TRITON.

El AUC, MDT y DE en el medio PBS mostraron diferencias estadísticas entre ambas formulaciones, pero el área entre la curva de disolución del fármaco y su asíntota (ABC) son estadísticamente iguales. Mientras tanto, en el medio HCl, el AUC, ABC, MDT y DE son estadísticamente iguales ( $p < 0,05$ ). Los resultados se resumen en las tablas 32 y 33.

<b>Valores farmacocinéticos en medio de PBS</b>				
	LF3		LF3-PEG3	
	Mean	±SD	Mean	±SD
<b>AUC</b>	212.5714	2.6126	139.2306	5.4360
<b>ABC</b>	177.1640 <sub>a</sub>	3.8496	170.4940 <sub>a</sub>	18.6834
<b>TMD</b>	1.8182	0.0183	2.1973	0.0752
<b>ED</b>	0.5314	0.0065	0.3481	0.0136

**Tabla 32. Valores farmacocinéticos obtenidos mediante el complemento de Excel DDSOLVER para los preparados LF3 y LF3-PEG3 en el medio de PBS. <sub>a-b</sub> Las columnas con el mismo subíndice no muestran diferencias estadísticas significativas.**

<b>Valores farmacocinéticos en medio de HCl</b>				
	LF3		LF3-PEG3	
	Mean	±SD	Mean	±SD
<b>AUC</b>	242.613 <sub>a</sub>	20.579	242.613 <sub>a</sub>	20.579
<b>ABC</b>	434.586 <sub>a</sub>	15.469	434.586 <sub>a</sub>	15.469
<b>TMD</b>	5.138 <sub>a</sub>	0.091	5.138 <sub>a</sub>	0.091
<b>ED</b>	0.303 <sub>a</sub>	0.026	0.303 <sub>a</sub>	0.026

**Tabla 33. Valores farmacocinéticos obtenidos mediante el complemento de Excel DDSOLVER para los preparados LF3 y LF3-PEG3 en el medio de HCl. <sub>a-b</sub> Las columnas con el mismo subíndice no muestran diferencias estadísticas significativas.**

El cálculo de los factores de diferencia ( $f_1$ ) y de similitud ( $f_2$ ) se resume en la tabla 34. El comportamiento de la formulación de LF3 y LF3-PEG3 es similar en el medio de HCl, pero en el medio de PBS diferente.

<b>Factores de similitud y diferencia</b>			
	$f_1$	$f_2$	Similarity
<b>HCl</b>	10.4677556	74.6016548	SI
<b>PBS</b>	33.8646591	40.9468953	NO

**Tabla 34. Valores de similitud ( $f_2$ ) y diferencia ( $f_1$ ) obtenidos mediante el complemento de Excel DDSOLVER para la comparación entre los preparados LF3 y LF3-PEG3.**

En los métodos del modelo dependiente LF3 y LF3-PEG3 se ajustaron a muchos modelos de disolución, las ecuaciones de ajuste y los valores obtenidos para cada

modelo se resumen en la tabla 35. Según los valores obtenidos para el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el criterio de información de Akaike (AIC), los mejores perfiles de liberación para ambas formulaciones en medio HCl y PBS podrían explicarse por el modelo Korsmeyer-Peppas.

<b>Modelos matemáticos para el perfil de disolución</b>				
<b>Models</b>	<b>PBS (pH 7.4)</b>		<b>HCL (pH 1.3)</b>	
	<b>LF3</b>	<b>FL3-PEG3</b>	<b>LF3</b>	<b>LF-PEG3</b>
Orden Cero	<b><math>F=k_0*t</math></b>			
<b>K0</b>	0.313	0.222	0.146	0.159
<b>R2</b>	0.990	0.892	0.866	0.881
<b>AIC</b>	20.862	31.385	55.990	55.867
Korsmeyer-Peppas	<b><math>F=kKP*t^n</math></b>			
<b>Kkp</b>	0.137	0.008	0.003	0.006
<b>n</b>	1.151	1.610	1.745	1.548
<b>R2</b>	0.999	0.994	0.989	0.980
<b>AIC</b>	8.243	17.844	36.799	43.663
Weibull	<b><math>F=100*\{1-Exp[-((t-Ti)^\beta)/\alpha]\}</math></b>			
<b><math>\alpha</math></b>	1317.017	5112.740	33603.206	10819.749
<b><math>\beta</math></b>	1.428	1.554	1.691	1.567
<b>Ti</b>	36.000	26.090	24.000	36.000
<b>Td</b>	187.297	269.480	431.519	411.824
<b>R2</b>	0.956	0.954	0.939	0.923
<b>AIC</b>	32.115	30.842	53.573	56.411
Hopfenberg	<b><math>F=100*[1-(1-kHB*t)^n]</math></b>			
<b>Khb</b>	0.003	0.002	0.001	0.002
<b>n</b>	0.842	1.000	1.000	1.000
<b>R2</b>	0.995	0.892	0.866	0.881
<b>AIC</b>	18.205	33.385	57.990	57.867
Peppas-Sahlin	<b><math>F=k_1*t^m+k_2*t^{(2*m)}</math></b>			
<b>k1</b>	-2.688	-5.048	-4.691	-4.605
<b>k2</b>	0.775	0.823	0.599	0.616
<b>m</b>	0.450	0.450	0.450	0.450
<b>R2</b>	0.999	0.980	0.970	0.968
<b>AIC</b>	11.109	26.406	47.948	49.374
Gompertz	<b><math>F=100*Exp\{-\alpha*Exp[-\beta*log(t)]\}</math></b>			
<b><math>\alpha</math></b>	147111.558	1441.762	2025.193	3287.178
<b><math>\beta</math></b>	5.336	3.199	3.107	3.328
<b>R2</b>	0.881	0.888	0.854	0.850
<b>AIC</b>	34.943	33.426	58.663	59.725
Logistic	<b><math>F=100*Exp[\alpha+\beta*log(t)]/\{1+Exp[\alpha+\beta*log(t)]\}</math></b>			
<b><math>\alpha</math></b>	-15.636	-13.016	-14.368	-15.311
<b><math>\beta</math></b>	7.192	5.569	5.706	6.041
<b>R2</b>	0.868	0.949	0.935	0.917
<b>AIC</b>	35.293	29.188	52.091	54.979
Probit	<b><math>F=100*\Phi[\alpha+\beta*log(t)]</math></b>			
<b><math>\alpha</math></b>	-9.293	-7.414	-8.121	-8.686
<b><math>\beta</math></b>	4.210	3.178	3.211	3.427
<b>R2</b>	0.920	0.936	0.912	0.899
<b>AIC</b>	33.013	30.521	54.566	56.525

Tabla 35. Ajuste matemático de algunos modelos de disolución para los preparados LF3 y LF3-PEG3, mediante el complemento de Excel DDSOLVER. En la tabla se resumen las variables obtenidas para cada uno de los modelos.

## 6.7. PRUEBAS *IN-VIVO*

Todos los datos de las pruebas *in-vivo* de los preparados de la FASE I y FASE II se encuentran resumidos en la tabla 36. Y se encuentran en detalle en los siguientes apartados:

T (min)	LF3 SCT (prom ± SD)		LF3 trans (prom ± SD)		PEG SCT (prom ± SD)		PEG trans (prom ± SD)		LF3 oral (prom ± SD)		PEG oral (prom ± SD)	
0	465.67	47.71	407.83	45.52	443.17	69.71	475.67	80.32	449.86	54.53	457.17	36.63
15	391.00	56.75	421.80	65.74	323.17	39.22	475.00	37.15	472.00	53.56	501.17	34.56
30	183.80	40.92	377.20	38.37	165.83	60.44	442.33	82.22	483.86	70.40	460.00	56.40
45	128.50	20.51	466.00	80.61	101.00	16.97	453.00	72.12	463.25	19.72	493.00	12.46
60	86.83	19.62	397.83	34.00	102.50	57.45	439.67	59.11	475.29	53.44	436.67	49.04
75	75.50	3.54	420.00	53.74	93.00	57.98	447.50	91.22	443.00	24.64	490.00	18.26
90	62.00	10.00	410.75	33.13	80.00	51.78	433.00	62.79	460.33	71.41	436.60	46.30
120	61.25	22.56	428.40	58.31	62.50	29.51	416.20	44.43	466.00	27.31	475.00	58.28
180	72.50	35.07	412.60	79.44	97.83	56.80	442.50	45.77	426.75	46.89	476.20	70.33
240	114.33	51.50	403.00	65.46	145.83	89.61	419.40	19.28	426.50	35.38	448.20	91.28
300	217.33	107.63	402.60	40.63	271.67	94.83	365.80	92.97	393.00	25.12	420.75	67.44
360	349.50	142.74	366.60	57.78	380.00	99.88	393.20	68.28	383.33	27.61	422.00	92.30
420	409.67	124.77	363.00	33.76	390.33	93.00	370.40	33.69	---	---	---	---

**Tabla 36. Curvas de Glucosa obtenidas en los animales diabetizados experimentalmente y tratados con LF3 y LF3-PEG3 por diferentes vías (oral, subcutánea y transdermica).**

### 6.7.1. Curva de glucosa basal

Los animales sanos en ayunas mantuvieron un nivel de glucosa de 127 mg / dL en promedio, mientras que los animales diabéticos experimentales sin ningún tratamiento mostraron niveles de glucosa superiores a 400 mg / dL. Los datos se encuentran detallados en la tabla 37.

Hora	Glucosa mg/dL (Promedio)	±SD
0	103	11.9522861
15	126.5	10.3371729
30	122	7.98212288
45	127.875	16.2431304
60	132.75	20.1476691
75	125.25	16.2985538

90	117.875	11.7769448
105	122.25	13.0247018
120	115.714286	14.0322757
135	114.6	10.4067286
150	114	7.43863787
165	117.333333	19.857828

Tabla 37. Datos de Glucosa basal obtenidas en los animales sanos y sin tratamiento.

### 6.7.2. Vía de administración oral

La concentración de glucosa en sangre para animales sanos, animales diabéticos y animales tratados con insulina, LF3 y LF3-PEG por vía oral se muestra en la Figura 12. Estadísticamente, no se mostraron diferencias significativas en los valores de glucosa de ningún grupo en ningún momento. El tratamiento con ambos liposomas flexibles o con insulina sola no generó reducción de los niveles de glucosa. Los valores detallados se encuentran resumidos en la Tabla 36.

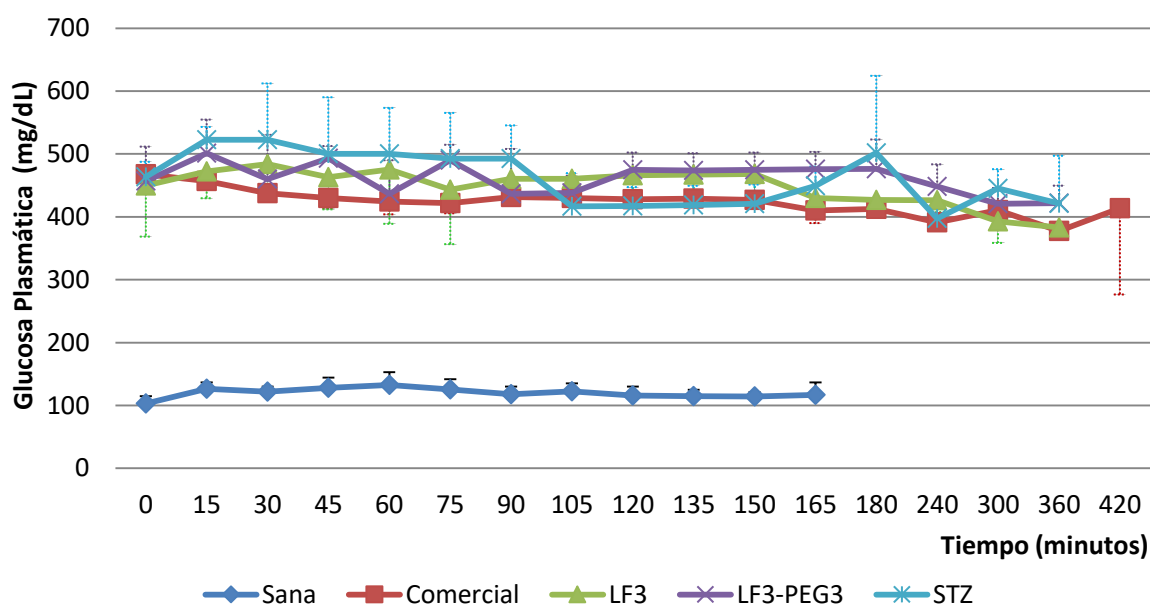


Figura 12. Curvas de Glucosa obtenidas en los animales sanos y en animales diabéticos con estreptozotocina (STZ) tratados con insulina comercial y los preparados LF3 y LF3-PEG3 por vía oral.

### 6.7.3. Vía de administración Transdérmica

La concentración de glucosa en sangre para animales sanos, animales diabéticos y animales tratados con insulina, LF3 y LF3-PEG por vía transdérmica se muestra en la Figura 13. Ningún grupo mostró diferencias estadísticas en los niveles de glucosa en ningún momento. Sin embargo, la formulación de LF3-PEG mostró una pequeña

reducción del nivel de glucosa durante 90 minutos en comparación con la formulación LF3 e insulina sola. Los valores detallados se encuentran resumidos en la Tabla 36.

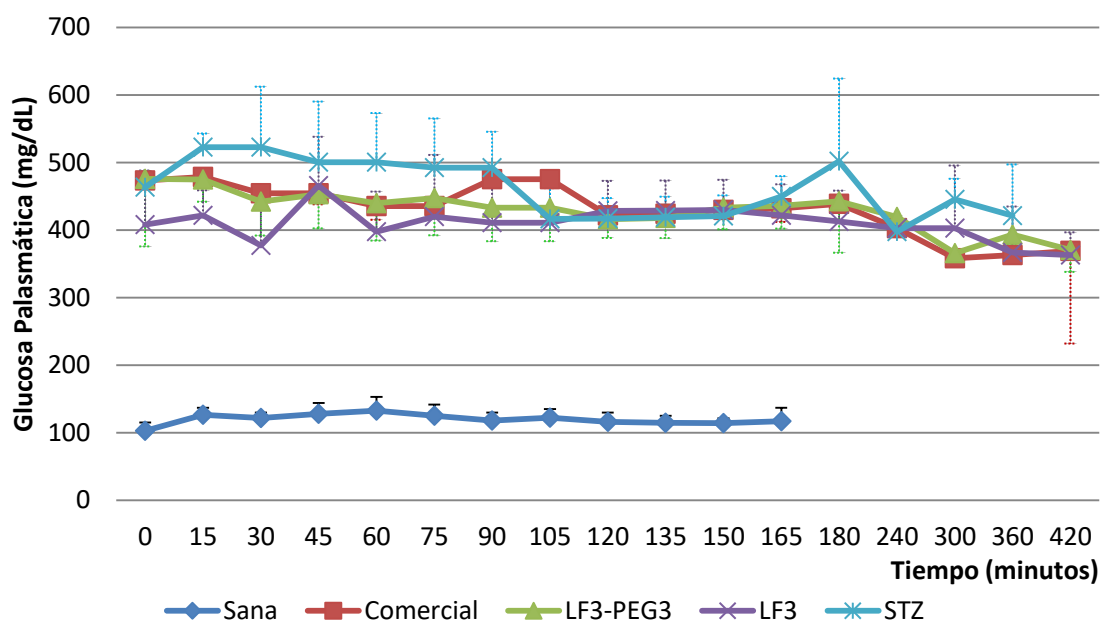


Figura 13. Curvas de Glucosa obtenidas en los animales sanos y en animales diabéticos con estreptozotocina (STZ) tratados con insulina comercial y los preparados LF3 y LF3-PEG3 por vía transdérmica.

#### 6.7.4. Vía de administración subcutánea

La concentración de glucosa en sangre para animales sanos, animales diabéticos y animales tratados con insulina, LF3 y LF3-PEG por vía subcutánea se muestra en la Figura 14. Ninguno de los tres tratamientos mostró diferencias estadísticas en los valores de glucosa entre ellos en ningún momento. No obstante, los tres tratamientos generaron la reducción de los niveles de glucosa a valores normales. Los valores detallados se encuentran resumidos en la Tabla 36.

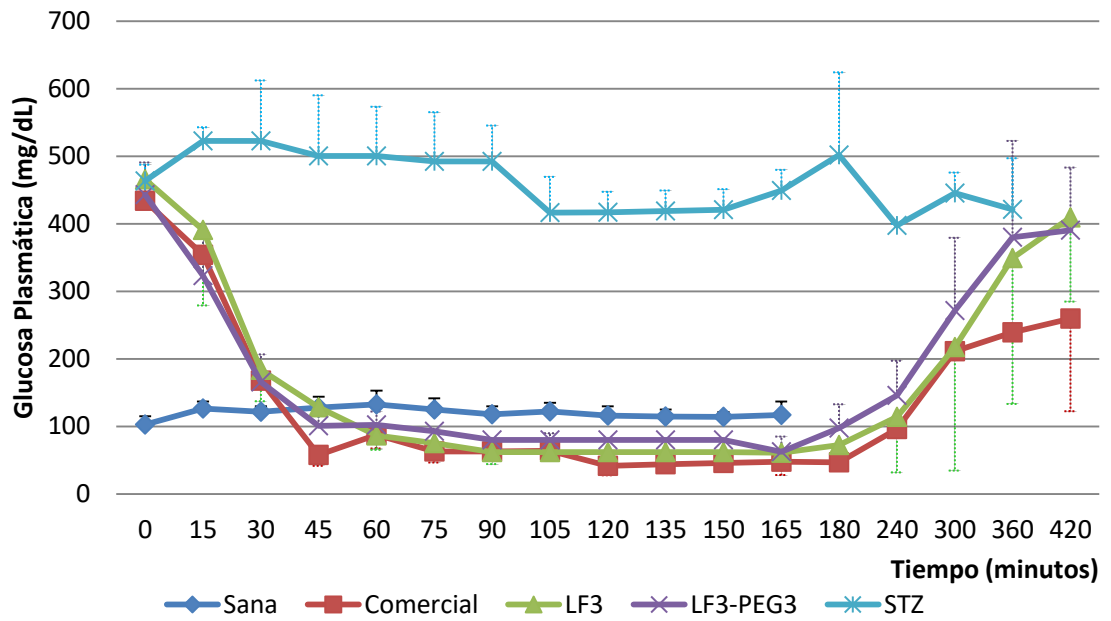


Figura 14. Curvas de Glucosa obtenidas en los animales sanos y en animales diabetizados con estreptozotocina (STZ) tratados con insulina comercial y los preparados LF3 y LF3-PEG3 por vía subcutánea.

#### 6.7.5. Liposomas flexibles vacíos

Estadísticamente, los niveles de glucosa de ambas preparaciones sin insulina no mostraron diferencias en ningún momento entre ellos. No obstante, ambas formulaciones mostraron diferencias estadísticas en los niveles de glucosa en comparación con los valores normales de 60 minutos hasta 300 minutos. Las curvas de glucosa se describen en la Figura 15.

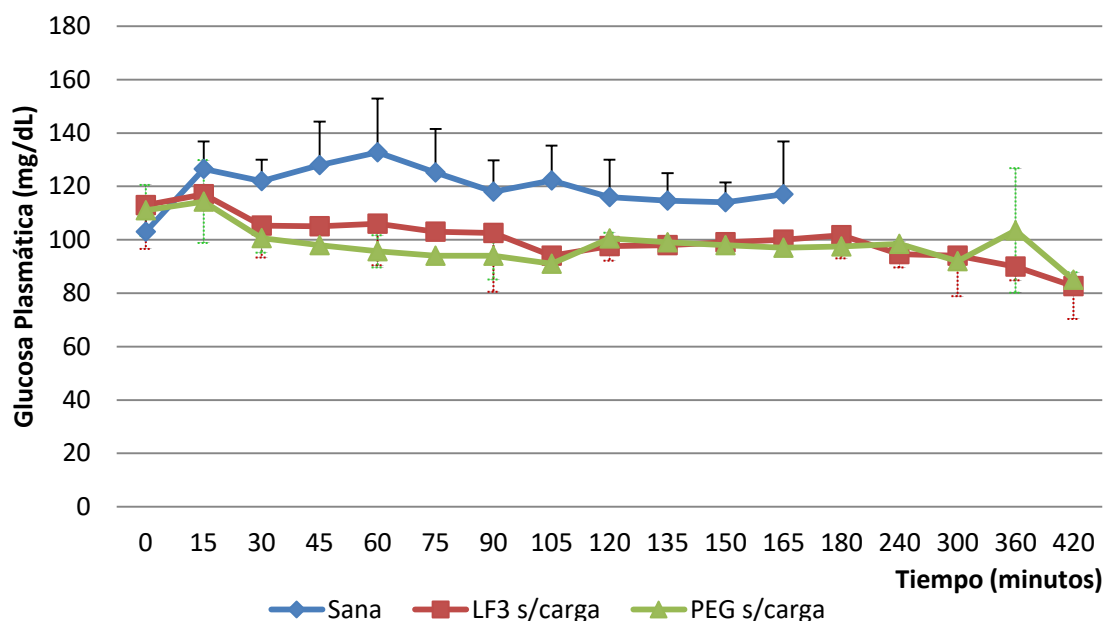


Figura 15. Curvas de Glucosa obtenidas en los animales sanos con la administración de los formulados vacíos (sin carga de insulina) por vía subcutánea.

#### 6.7.6. Efecto biológico de insulinas expuestas a diferentes temperaturas

Los niveles de concentración de glucosa en sangre para animales sanos, animales diabéticos y animales tratados con insulina expuestos a 4°C, 60°C y 100°C se muestran en la Figura 16. Los animales diabéticos sin tratamiento mostraron niveles de glucosa superiores a 400 mg / dL. Los animales que recibieron tratamiento mostraron una reducción en los niveles de glucosa a valores normales. La insulina a 4°C mostró un efecto reductor de glucosa hasta 240 minutos después de la inyección, donde los niveles de glucosa comenzaron a aumentar. La insulina expuesta a 60°C y 100°C mostraron un comportamiento similar a la insulina a 4°C; aunque la insulina a 100°C redujo los valores de glucosa en sangre a valores normales, el tiempo de efecto fue relativamente corto en comparación con los otros tratamientos, porque los valores de glucosa aumentaron a los 180 minutos después de la inyección. Estadísticamente, ninguno de los tres grupos mostró diferencias de 0 a 120 minutos ( $p < 0.05$ ). La insulina a 4°C y 60°C no mostraron diferencias significativas en la curva de glucosa completa entre ellas, mientras que la insulina a 100°C mostró diferencias significativas a los 180 y 240 minutos en comparación con los tratamientos a 4°C y 60°C. Sin embargo, a los 420 minutos, no hubo diferencia en la concentración de glucosa en sangre entre los grupos de insulina a 60°C y 100°C ( $p < 0,05$ ).



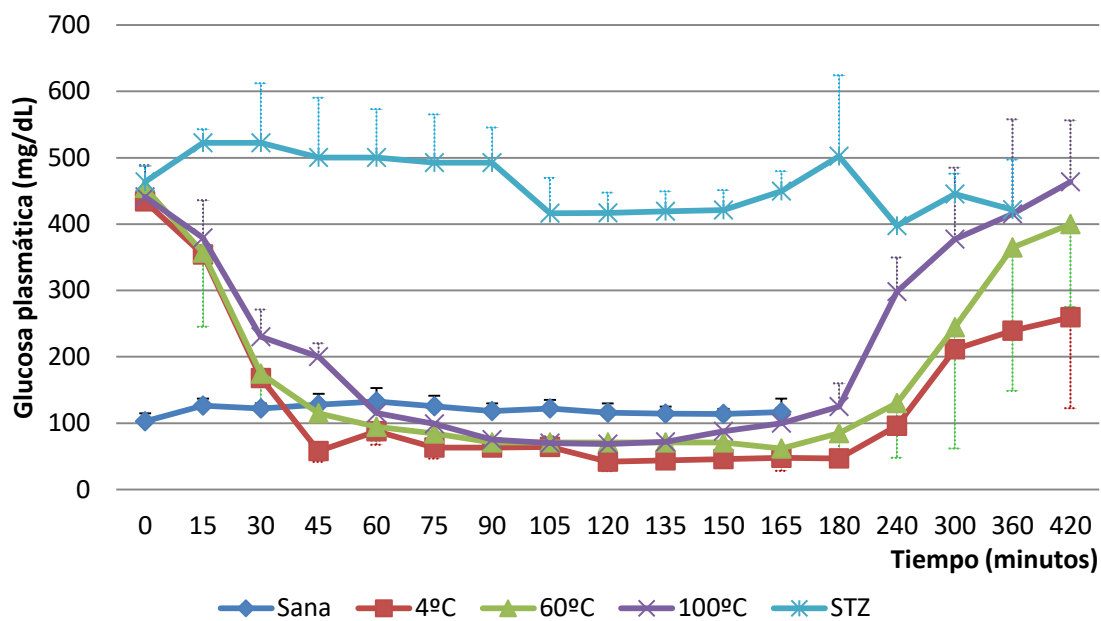


Figura 16. Curvas de Glucosa obtenidas en los animales sanos, en animales diabetizados experimentalmente con estreptozotocina (STZ) y en animales diabetizados luego del tratamiento con insulinas expuestas a diferentes temperaturas (4°C, 60°C y 100°C).

## 7. ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

#### 7.1.1. Linealidad del Sistema

Se observa que el sistema sigue una tendencia lineal en un intervalo de concentraciones de 0.8 UI/mL hasta 4.8 UI/mL. Para determinar que un sistema cumple con la linealidad, deben considerarse los siguientes criterios de aceptación (Tabla 38):

Parámetro de desempeño	Factor de evaluación	Criterio de Aceptación
Linealidad del sistema	Coeficiente de correlación (r)	$r \geq 0.99$
	Coeficiente de determinación ( $r^2$ )	$r^2 \geq 0.98$
	Intervalo de Confianza de la ordena al origen (IC (Bo))	El IC debe incluir el cero

Tabla 38. Criterios de Aceptación para la linealidad de un sistema.

En este sistema se observa que se cumplen con todos los factores de evaluación. De modo que el sistema presenta una relación lineal entre la respuesta analítica y la concentración de Insulina.

#### 7.1.2. Precisión y Exactitud

Se puede observar que el coeficiente de variación que es el parámetro que se evalúa para determinar precisión y exactitud, se encuentra dentro del criterio de aceptación establecido ( $CV < 2\%$ ), por lo cual se puede afirmar que la dispersión de los datos es mínima y por tanto el sistema se considera tanto preciso como exacto.

#### 7.1.3. Repetibilidad y Reproducibilidad

Para determinar si los resultados son repetibles se debe calcular el coeficiente de variación global, el cual debe ser menor al 3% para poder ser un criterio aceptado, entonces, como los coeficientes de variación por día son menores al 3% y el coeficiente de variación global también lo es, se puede considerar que el método es repetible entre días. Adicionalmente se realiza una prueba de Hipótesis para determinar si existe diferencia entre las medias de los días, el nivel de significancia de la prueba fue de 0.05, y los resultados indican que hay evidencia estadística suficiente para concluir que los resultados obtenidos son los mismos para ambos días.

Para determinar si los resultados son reproducibles por diferentes analistas se realizó un análisis de varianza donde se utilizó al analista como factor. Los resultados indican que hay evidencia estadística suficiente para concluir que los resultados obtenidos son los mismos para ambos analistas.

#### **7.1.4. Selectividad**

Para los barridos espectrales de Insulina+PBS, Insulina+sacarosa 10%, Insulina+acetronitrilo se mantiene la longitud máxima de absorción en 269 nm y se obtienen las mismas absorbancias para todos. Para la medición de Insulina+fosfatidilcolina se obtiene una longitud máxima de absorción también a 269 nm, sin embargo la curva no empieza desde el cero, de modo que se puede concluir que los fosfolípidos están interfiriendo con la medición de la insulina en los preparados finales. Por dicho motivo deben separarse los fosfolípidos de los sistemas antes de realizar la medición de la insulina. Sin embargo la Norma NOM-177-SSA1-1998 del colegio de químicos farmacéuticos biólogos, establece que el método es selectivo si cumple con los criterios de linealidad, exactitud y precisión.

#### **7.1.5 Robustez**

Para determinar si existe diferencia entre los equipos se realizó una comparación de medias de las absorbancias obtenidas en ambos equipos. Los resultados indican que hay evidencia estadística suficiente para concluir que los resultados obtenidos son los mismos para ambos equipos.

## **7.2. EVALUACIÓN ESTRUCTURAL DE INSULINA EXPUESTA A DIFERENTES TEMPERATURAS**

La exposición de proteínas y formulaciones de péptidos a temperaturas elevadas generalmente disminuye su estabilidad química al acelerar todas las reacciones de degradación química. A altas temperaturas, puede ocurrir una degradación física debida a una desnaturalización irreversible. Esto a menudo resulta de la destrucción de los enlaces disulfuro, lo que da como resultado un cambio conformacional en la proteína nativa y la posterior agregación de proteínas (Jacob et al., 2006).

Las proteínas generalmente mantienen sus estructuras nativas en sus entornos naturales para ser funcionales. Además, son flexibles para adaptarse a entornos cambiantes para sus funciones biológicas. Por ejemplo, la mayoría de las proteínas experimentan cambios conformacionales cuando interactúan con ligandos o receptores para sus actividades. Esto implica que las proteínas pueden sacrificar la estructura original y reordenar a diferentes conformaciones cuando el entorno cambia, por ejemplo, superficie de contacto, temperatura, concentración, condición de la solución (Chang y Yeung, 2010).

La inestabilidad física incluye las reacciones que no implican la formación o destrucción de enlaces covalentes y da como resultado la agregación y precipitación de proteínas. Los factores estresantes ambientales, como el pH y la temperatura, pueden causar modificaciones estructurales o cambios conformacionales, que pueden detectarse mediante técnicas espectroscópicas estándar, incluida la espectroscopía infrarroja (Jacob et al., 2006; Chang y Yeung, 2010).

La necesidad de mejorar la administración de insulina y la búsqueda de una metodología relativamente simple y rápida para fabricar transportadores de insulina nos llevaron a varios métodos que requieren altas temperaturas. Por lo tanto, estos métodos de fabricación son la razón para investigar si la actividad biológica de la insulina se vería afectada después del proceso de calentamiento. La espectroscopía infrarroja y la electroforesis en gel se realizaron con el fin de determinar la integridad de la insulina a pesar de la exposición a altas temperaturas.

Como se planteó en los resultados, físicamente la insulina expuesta a 100°C mostró cambios en el color en comparación con las otras insulinas. No obstante, los cambios conformacionales en la insulina no se apreciaron después de la exposición al calor. La espectroscopía infrarroja se usa generalmente para la identificación de grupos funcionales que son activos para IR. En la espectroscopía infrarroja, una molécula absorbe radiación infrarroja a medida que experimenta un cambio neto en el momento dipolar debido a su movimiento vibratorio o de rotación. En términos de número de onda, el espectro infrarrojo se divide en regiones cercanas (de 12800 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ),

medias (de 4000 a 200  $\text{cm}^{-1}$ ) y de infrarrojo lejano (de 200 a 10  $\text{cm}^{-1}$ ), con 1700 a 1600  $\text{cm}^{-1}$  es la región más utilizada para el análisis de proteínas (Chang y Yeung, 2010). La región de frecuencia interesante para determinar la estructura secundaria de la proteína es la denominada región amida I; la vibración de la amida I da lugar a una banda IR en la región entre 1600  $\text{cm}^{-1}$  y 1700  $\text{cm}^{-1}$  (Bandekar, 1992; Mauri, 2014). La estructura nativa de la insulina se caracteriza por un pico a 1656  $\text{cm}^{-1}$ , como lo muestran los estudios previos en IR de todas las muestras (Bouchard et al., 2000; Dzwolak et al., 2004, 2006). La relación de los picos entre todas las muestras de insulina es la misma, con cambios mínimos en algunas regiones, lo que indica que no se produjeron cambios estructurales significativos con la exposición a 60°C o 100°C.

Se realizaron estudios PAGE para confirmar la estructura de la insulina, y se encontró que era estable en las formulaciones a 4°C, 60°C y 100°C. PAGE puede utilizarse no solo como una herramienta de separación, ya que se ha utilizado históricamente, sino también como un método de cuantificación para compuestos de alto peso molecular, como proteínas, si se acompaña con un sistema de documentación en gel (Tippavajhala y Yamsani, 2010; Chi y Huang, 2016).

La técnica de DSC ha sido útil para estudiar el despliegue de estructuras secundarias de proteínas y para caracterizar la estabilidad conformacional de proteínas en diferentes condiciones, tanto en estado sólido como líquido. Mientras que el despliegue de proteínas produce picos endotérmicos medidos por DSC, la agregación de proteínas se detecta como un evento exotérmico (Biltonen y Lichtenberg, 1993; Chang y Yeung 2010). Los termogramas DSC de insulina indicaron un punto de fusión a 85°C, y la desnaturalización ocurre solo si la insulina se calienta por encima de esta temperatura. Los termogramas previos de DSC informaron dos picos distintos a 72°C y 86°C con cantidades variables de zinc. La insulina humana libre de cinc a pH 7.4 muestra una transición aparente con un punto medio a 68.5 °C, según Huus et al., (2005), insulina nativa a 75°C según Sarmiento et al., (2006), y 85°C por Todinova et al., (2016). A pesar de esto, IR y PAGE mostraron que la insulina expuesta a mayor temperatura de punto de fusión no cambia estructuralmente.

### **7.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS FASE I y FASE II**

#### **7.3.1. Tamaño de los Liposomas**

En todos los preparados elaborados mediante el método de rehidratación de película delgada se observan tres tamaños de partículas, mientras que en los elaborados por la técnica de calentamiento se observan tres tamaños en los preparados LF2 y LF4, dos tamaños en LF1 y LF3, mientras que se obtiene un tamaño homogéneo en LF5. En el método de calentamiento las partículas en general presentan tamaños menores que en la técnica de rehidratación. El tamaño predominante de la formulación hecha por el Método de Calentamiento se encuentra por encima de los 600 nm, mientras que en método de rehidratación de película delgada se encuentra por encima de los 800 nm.

En la Fase 2, Los resultados muestran que LF3-PEG1, LF3-PEG5 presentan dos grupos de partículas, mientras que LF3-PEG2, LF3-PEG3 y LF3-PEG4 presentan tres grupos diferentes de tamaños. El grupo de tamaño más predominante en cada formulación es superior a 500 nm, sin embargo esto se determinó de acuerdo con la intensidad de dispersión de cada partícula.

La distribución de intensidad se pondera naturalmente de acuerdo con la intensidad de dispersión de cada fracción de partícula o familia. Para materiales o polímeros biológicos, la intensidad de dispersión de partículas es proporcional al cuadrado del peso molecular. Como tal, la distribución de intensidad puede ser algo engañosa, ya que una pequeña cantidad de agregación / aglomeración o presencia o una especie de partículas más grande puede dominar la distribución. Sin embargo esta distribución se puede utilizar como un detector sensible para la presencia de material grande en la muestra (Malvern, 2017). Sin embargo, si asumimos que todas las partículas son esféricas, todas las partículas tienen una densidad homogénea y equivalente, es posible transformar estos datos en valores numéricos, las distribuciones de tamaños numéricos sólo se deben usar para estimar las cantidades relativas de material en picos separados como medios y particularmente Las anchuras son menos fiables: LF3 tiene un tamaño medio de  $131 \pm 38$  nm con 97,2% de predominio en la población de partículas, LF3-PEG1, LF3-PEG4 y LF3-PEG5 tiene tamaños mayores de 445 nm, LF3-PEG2 muestra

97,3% de la población con tamaño de  $97,6 \pm 10,5$  nm y 87,6% de la población de LF3-PEG3 de tamaño  $131,4 \pm 33,3$  nm, sin embargo, estos datos son una cantidad relativa, ya que el Zetasizer Nano utiliza la teoría Mie por defecto para convertir las distribuciones de tamaño de intensidad en volumen y número. Para todos los tamaños de partículas (Wriedt, 2012).

### **7.3.2. Índice de Polidispersión**

Todas las muestras tienen una distribución heterogénea, con la excepción de LF2 de rehidratación de película delgada que muestra un índice de polidispersión bajo respecto a los demás. Los preparados con contenido de PEG, continúan mostrando población de partículas heterogénea.

El índice de polidispersidad proporciona información sobre la distribución del tamaño de partícula, todas las formulaciones mostraron polidispersidad elevada con excepción de LF1 y LF2 con polidispersidad moderada, esto podría afectar a la estabilidad del sistema en términos de aglutinación de partículas (Malvern, 2017)

El Índice de polidispersión (IPD) es una medida que estima la heterogeneidad de los tamaños de partícula en un compuesto (Awad et al, 2008). Un  $IDP \leq 0.25$  demuestra mayor uniformidad, monodispersión, y garantiza la estabilidad del sistema ya que disminuye la probabilidad de cambio del tamaño de partícula en corto tiempo. El IPD con valores mayores a 0.5 indican pobre uniformidad de la muestra o polidispersión de esta (Cheng et al, 2013; Karn et al, 2013; Pereira-Lachataignerais et al, 2006). Los índices de polidispersión altos presuponen la formación de un sistema inestable que muy probablemente no permitirá mantener en dispersión las partículas por tiempos prolongados.

El incremento en el IPD puede atribuirse a que el exceso de energía es absorbida en la superficie de las partículas a consecuencia del esfuerzo mecánico, lo que provoca modificaciones en la distribución del tamaño de partícula y en la amplitud de las mismas (Xu y Zhang, 2009).

### **7.3.3. Potencial Z**

El potencial zeta de un preparado de liposomas puede ayudar a predecir el destino de estos y la eficacia terapéutica *in-vivo*. Además, ayuda en la investigación del comportamiento de los liposomas influenciado por su carga superficial. Los liposomas en dispersiones acuosas tienden a agregarse y posteriormente se fusionan en el almacenamiento si tienen potenciales zeta inferiores (Batalla et al., 2014). El valor del potencial zeta demuestra la estabilidad de los sistemas de partículas. Es una medida de las fuerzas repulsivas entre las partículas. Las partículas que tienen una potencial Z de menos de -30 mV o más de +30 mV se consideran generalmente estables (Malvern, 2017). Considerando que los valores del Potencial Zeta de las formulaciones LS1 y LS3 de ambos métodos y la formulación del método de calentamiento LS4 fueron superiores a -30 mV, confirma la estabilidad aceptable así como su uniformidad y suspensión de homogeneidad de tamaño. Con presencia de PEG-2000 PE en su composición, todos los formulados muestran adecuados valores de potencial Z, sin embargo son relativamente menores con los obtenidos con la formulación LF3 de la Fase 1.

### **7.3.4. Porcentaje de Encapsulación**

Se observa que mediante la técnica de centrifugación a 10000 rpm hay un porcentaje de encapsulación muy bajo, lo cual puede indicar que los sistemas se rompen durante el proceso y liberan su contenido de insulina, lo cual no permite evaluar en realidad la cantidad de insulina que logro incorporarse a los sistemas. En la ultrafiltración ocurre la separación de las fases, sin embargo los valores obtenidos nos muestran valores de insulina incorrectos, lo cual indica que muy probablemente debido a la flexibilidad de los liposomas, estos atraviesan las membranas de filtración, alterando la completa separación.

De modo que se realizó Ultracentrifugación a 25000 revoluciones por minuto (rpm), donde se obtuvo una adecuada separación de fases. Luego de comparar los tres métodos de separación se concluye que la separación adecuada se realiza por medio de este último método, descartando los otros dos métodos nombrados.



Los resultados mostraron que los liposomas flexibles preparados por el método de calentamiento poseían un mayor porcentaje de atrapamiento en comparación con el método de rehidratación de película fina. LS2 en ambos métodos mostró el menor porcentaje de encapsulación de insulina, estas formulaciones contienen colesterol. En ambas técnicas, el aumento de proporciones de fosfolípidos y surfactante aumenta el porcentaje de encapsulación, pero aparentemente aumenta el tamaño y la heterogeneidad de las partículas. LS3 y LS4 del método de calentamiento mostraron un encapsulado superior al 60%.

En la fase 2, los resultados mostraron que los liposomas flexibles con un 10% de adición de PEG presentaban un mayor porcentaje de captura (> 81%) en comparación con las otras formulaciones con diferente cantidad de PEG. LF3 Y LF-PEG3 mostraron tamaño y distribución similares. Los liposomas convencionales habían mostrado porcentajes de atrapamiento inferiores comparados con liposomas flexibles. En esta investigación, la adición de PEG a liposomas flexibles genera un aumento en el porcentaje de encapsulación.

#### **7.4. ESTABILIDAD DE LOS FORMULADOS**

El estudio de estabilidad muestra que los liposomas mantienen su tamaño y carga durante al menos sesenta días. Sin embargo es necesario realizar estudios adicionales de estabilidad a largo plazo.

#### **7.5. PRUEBAS DE DISOLUCIÓN *IN-VITRO***

El perfil de disolución se realizó con membranas de diálisis, donde la liberación del fármaco observada es el resultado de dos procesos de transporte paralelos: la liberación del fármaco desde los liposomas y la difusión del fármaco liberado a través de la membrana de diálisis (Xu et al., 2012). Es muy importante determinar la cinética de difusión del fármaco a través de la membrana de diálisis para comprender las características reales de liberación del fármaco. Sin embargo, para las nuevas formas de dosificación no existen normas regulatorias o compendiales, la evaluación *in-vitro* de la

liberación de medicamentos asume mayor importancia como un indicador de la calidad y el rendimiento del producto (D'Souza, 2014).

Para transportar el fármaco directamente al objetivo, los liposomas deberían tener una estabilidad *in-vivo* razonable (retención del fármaco) durante la circulación. Para simular este escenario, en la primera etapa de la prueba de liberación *in-vitro*, las formulaciones de liposomas se dializaron contra el tampón y a la temperatura corporal de la rata (38 °C) (Xu et al., 2012). Los fármacos hidrófilos, tales como Insulina, se encapsulan en el compartimiento acuoso interno del liposoma y se separan del medio exterior mediante una bicapa hidrófoba. Debido a su alta polaridad, no es posible la partición y posterior difusión de moléculas de insulina en la bicapa lipídica. Por esta razón, la dilución de liposomas en el medio de liberación de PBS no tuvo efecto sobre la retención de fármaco dentro de los liposomas (Bhardwaj y Burgess, 2010). Esto determina la alta estabilidad de las bicapas lipídicas que reducen en gran medida la difusión de moléculas de fármaco. Durante esta etapa se encontraron 3.22% de insulina de FL y 1.46% de FL-PEG3 en el medio, esta pequeña cantidad podría explicarse por la insulina no encapsulada en la formulación.

En el cuerpo, después de que los liposomas entren en las células diana mediante endocitosis, se espera que se rompan en los endosomas debido a la hidrólisis inducida por pH, y se liberará el contenido de los liposomas (Xu et al., 2012; Sonia y Sharma, 2014). *In-vitro* para imitar este tipo de características de liberación del fármaco, se añadieron soluciones tensoactivas al final de la prueba de la primera etapa para simular los estímulos para la liberación del fármaco desde los liposomas. El uso de TRITON X-100 como surfactante no iónico actuó como disruptivo para la estabilidad de las bicapas de liposomas, y genera la difusión del fármaco a través de la bicapa lipídica (Xu et al., 2012).

En sujetos sanos, el vaciado gástrico a medio tiempo ( $T_1 / 2$ ) normalmente ocurre para líquidos en  $80.5 \pm 22.1$  min y para sólidos  $143.6 \pm 54.6$  min (Hellmig et al., 2006). En ratas sanas, el vaciado gástrico puede ocurrir entre 20 minutos y 200 minutos (Tomlin et al., 1993). Por este motivo, no es necesario obtener valores de la disolución en pH

gástrico durante más tiempo. En medio de HCl, el 20,78% de la insulina se había liberado en la formulación de FL antes de la adición de tensoactivo y el 22,92% para FL-PEG3, era de 4 horas en condiciones ácidas. Es evidente que se liberaba más cantidad de insulina con medio de pH ácido en comparación con el medio PBS. Sin embargo, el efecto en la liberación después de la adición de tensoactivo puede suponer que la bicapa lipídica no se interrumpió completamente por efecto del pH bajo, porque la liberación mejora después de la adición de tensoactivo. Esta información es muy crucial en el momento de la administración oral de formulaciones de FL y FL-PEG3; es importante considerar que este porcentaje probable de liberación de insulina en el estómago no puede generar control de glucosa, porque el ambiente ácido con un rango de pH de 1.5 a 3.5 induce la proteólisis de proteínas y péptidos en aminoácidos constituyentes, dipéptidos y tripéptidos para la absorción (Sonia y Sharma, 2014). Sin embargo, el porcentaje de insulina no liberada durante el tiempo en el estómago probablemente esté protegido por los restos de la bicapa lipídica, que no sufrieron ningún cambio en el pH intestinal, puede permitir que los liposomas con la insulina no liberada continúen su proceso de absorción. Esta absorción puede ocurrir directamente, debido a la evidencia existente de absorción de insulina en el tracto gastrointestinal en la rata por infusión directa de una solución de insulina en varias partes del TGI (32, 33), se encontró que la insulina se adsorbe al plasma apical membrana e internalizado por endocitosis.

Sin embargo, como se discutió anteriormente, existen otras teorías sobre la interacción de las partículas de lípidos con la membrana gastrointestinal, como: fusión, endocitosis, transporte paracelular o transcelular o absorción por el sistema linfático. Es muy difícil saber cuál de estas vías es utilizada por los liposomas para cruzar las barreras, ya que depende de varias características, como la composición, la técnica de preparación, la carga iónica, etc. Sin embargo, los liposomas flexibles que llegan al intestino deben ser capaces de deformarse para pasar por uniones estrechas (Cevc et al., 1998; Jadupati et al., 2012). Para sortear estas barreras difíciles, la insulina puede administrarse utilizando portadores submicrométricos (diámetro <1 mm), (García-Fuentes et al., 2005; Pinto Reis y Damgé, 2012). De los diferentes portadores submicrométricos, las formulaciones obtenidas mostraron que pueden permanecer en estado sólido a la temperatura corporal

(Müller et al., 1995), son particularmente atractivos para la administración oral de proteínas.

Los péptidos, como la insulina, se degradan fácilmente en el tracto GI en presencia de varias enzimas proteolíticas (Thompson et al., 2010). Se suponía que la incorporación de insulina en un liposoma flexible con PEG había reducido su degradación enzimática, porque estaba parcialmente protegida en el pH ácido del estómago y completamente protegida en el pH intestinal.

El cálculo de los factores de diferencia ( $f_1$ ) y similitud ( $f_2$ ) estima la diferencia porcentual entre las dos curvas en cada punto de tiempo y es una medida del error relativo entre las dos curvas (Costa y Souza Lobo, 2001). La liberación de insulina en formulación FL y FL-PEG3 fue similar en medio HCl, pero diferente en medio PBS. El enfoque del factor de similitud independiente del modelo es un método relativamente simple y ampliamente aceptado para comparar los perfiles de disolución. Sin embargo, los criterios asociados con la aplicación de esta prueba no están armonizados en todo el mundo (Díaz et al., 2016).

Los valores farmacocinéticos como el área bajo la curva (AUC), el tiempo medio de disolución (MDT) y la eficacia de la disolución (DE) en el medio PBS no mostraron diferencias entre FL y FL-PEG3. Mientras tanto en medio HCl estos parámetros son similares para FL y FL-PEG3. Es consistente con los resultados de los factores de similitud y diferencia.

El perfil de liberación se ajusta al modelo de Korsmeyer-Peppas, el cual describe el mecanismo de liberación de fármacos de los sistemas poliméricos (Kousar et al., 2013). En la Tabla 7 se describe el exponente de liberación  $n$  del modelo cinético de Korsmeyer-Peppas, que describe el mecanismo de liberación del fármaco. Dependiendo de su valor, el proceso de liberación puede ser impulsado por la difusión de Fick, la erosión o la combinación de ambos mecanismos. Para todos los casos, el valor  $n$  es  $> 0,89$ , es un mecanismo de transporte de fármacos asociado con las tensiones y la transición de estado en polímeros vídriosos hidrófilos que se hinchan en agua o fluidos

biológicos. Eso indicaría un mecanismo de liberación de fármaco controlado por difusión (Singhvi y Singh, 2011). Esto sugiere que puede haber más de un mecanismo involucrado en la cinética de liberación, refiriéndose a la combinación de mecanismos de liberación de drogas basados en difusión y erosión (Costa y Souza Lobo, 2001; Singhvi y Singh, 2011; Kousar et al., 2013). Según este modelo en medio HCl, la liberación del 90% de la insulina de FL se alcanza a  $510,79 \pm 2,59$  minutos, mientras que para FL-PEG3 se alcanza a  $504,84 \pm 1,59$  minutos. Confirma la liberación de similitud obtenida para ambas formulaciones en medio ácido. Sin embargo, en el medio PBS el comportamiento de la liberación fue muy diferente para ambas preparaciones, ninguna de ellas libera una cantidad significativa antes de la exposición al surfactante; FL alcanzó el 90% de la liberación de insulina a  $280.85 \pm 3.32$  minutos después del uso de surfactante y LF-PEG3 alcanzó el 90% de liberación a  $337.74 \pm 9.57$  minutos. Todos los parámetros de disolución permiten concluir que FL-PEG3 tuvo una acción más prolongada que FL en el escenario mimético de la liberación en las células objetivo.

Los resultados mostraron que la inclusión de polímero en la estructura de liposoma flexible genera un nanovehículo excelente para proteínas tales como insulina en términos de estabilidad y composición. Además, el perfil de disolución mostró una acción más prolongada en la simulación de algunas condiciones del tracto gastrointestinal con buena retención de fármaco dentro de los liposomas. A pesar de eso, es necesario evaluar el comportamiento de la formulación en otros posibles escenarios del tracto gastrointestinal antes de realizar pruebas *in-vivo* en sujetos diabéticos.

## **7.6. PRUEBAS *IN-VIVO***

Se informó que la insulina atrapada por los liposomas redujo significativamente los niveles de glucosa en plasma de los animales diabéticos por administración oral (Patel y Ryman, 1976), lo que sugiere la posibilidad de que los liposomas sean una herramienta de administración oral de fármacos peptídicos. Sin embargo, la eficacia de los liposomas como una forma de dosificación oral aún no se ha definido debido al

comportamiento complejo de los liposomas en el tracto GI (Spangler, 1990; Chodhari et al., 1994).

Los desafíos de desarrollar una formulación de insulina oral están asociados a las barreras que tendrían que cruzarse. La principal barrera es la absorción a través de la membrana gastrointestinal. En términos generales, la absorción de moléculas en el tracto gastrointestinal (TGI) se produce a través de la ruta paracelular o transcelular. Las moléculas con un alto peso molecular, como la insulina (6 KDa), no penetrarían a través de esta ruta. Este gran tamaño molecular, su carga y su hidrofiliidad impedían la absorción de la insulina por difusión transcelular. Las uniones estrechas presentes entre las células evitan el transporte paracelular de fármacos, con la excepción de moléculas de fármacos hidrófilos que pesan menos de 200 Da (Mustata y Dinh, 2006). Sin embargo, la evidencia morfofocitoquímica y bioquímica para la absorción de insulina se demostró en el TGI de rata (Bendayan et al., 1994). Esto se logró mediante la infusión directa de insulina en diversas partes del TGI, seguida de visualización con marcadores de oro e inmunoensayo de insulina en la sangre (Khan y Agarwal, 2003). Se encontró que la insulina se adsorbe en la membrana plasmática apical y se internaliza por endocitosis (Bendayan et al, 1990).

Por lo cual, los liposomas flexibles son suficientemente flexibles para pasar a través de los poros considerablemente más pequeños que ellos mismos; esta capacidad de deformación es la razón para seleccionarlos para sondear por esta ruta, debido a que los liposomas flexibles deben adaptarse a su forma para pasar a través de uniones estrechas (Cevc 1998, 2003).

Obstáculos adicionales son los cambios de pH y las enzimas en todo el TGI. En el estómago están las proteasas aspárticas llamadas pepsinas. En el intestino delgado, las proteasas pancreáticas que consisten en la serina endopeptidasa (tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, elastasa y exopeptidasas, carboxipeptidasas A y B) son responsables de la degradación de las proteínas (TenHoor y Dressman, 1992). Para reducir el ataque enzimático y proteger a los cambios de pH es necesario mantener la insulina dentro del portador; por esa razón se seleccionaron liposomas, porque tienen buenas propiedades

de permeación porque su estructura bicapa es similar a la de la membrana celular, y se ha demostrado que la insulina cuando se encapsula dentro de los liposomas está probablemente protegida de la degradación proteolítica en el TGI (Patel y Ryman 1976; Patel et al., 1982; Owens et al., 2003), además la administración de liposomas no informa ningún efecto tóxico.

Otra barrera es la capa de moco presente en el intestino. El revestimiento de mucina presenta una barrera física en lugar de una barrera química. Se informa que la capa de mucina es más gruesa en el estómago y el colon, mientras que en el intestino delgado el grosor varía según el grado de actividad digestiva. La capa de moco disminuye la velocidad de difusión de los fármacos para alcanzar la superficie de absorción de las células epiteliales (Lai et al., 2009), aunque el efecto es insignificante para los fármacos hidrófilos de bajo peso molecular (Sonia y Sharma, 2014)

Sin embargo, los liposomas también tienen algunas limitaciones, en primer lugar, generalmente muestran una semivida de circulación corta después de la administración debido a la captación de liposomas en el sistema reticuloendotelial (RES); en segundo lugar, son propensos a adherirse entre sí y fusionarse para formar vesículas más grandes en suspensión, lo que puede dar lugar a fugas de inclusión. Por lo tanto, la estabilidad es un problema general en las vesículas lipídicas (Degim 2006; Sipai Altaf Bhai et al., 2012). Se han investigado muchos intentos, tales como la modificación de la superficie de los liposomas, para mejorar sus propiedades. En general, el material modificado en superficie de los liposomas incluye proteínas, polisacáridos, glicolípidos, PEG, etc. PEG es un polímero soluble en agua, no tóxico, no antigénico y biocompatible que ha sido aprobado por la FDA para aplicaciones humanas intravenosas, orales y dérmicas. El polímero de PEG forma una cubierta exterior en los liposomas con efectos beneficiosos. El polietilenglicol soluble en agua forma un revestimiento de polímero protector, que se encontró que mejoraba el tiempo de circulación de los liposomas al disminuir la absorción en el RES (Rajamanickam Vijayakumar et al., 2016).

Las formulaciones FL1 y FL2 administradas por vía oral no mostraron reducción en los niveles de glucosa, lo que sugiere que los liposomas flexibles no superaron todas las

barreras TGI, considerando que la insulina estaba protegida dentro de los portadores y adicional protegida por polímero modificado, soporta cambios de pH y agresión enzimática, pero probablemente no fue suficiente para cruzar a fondo la capa de moco; Es común que las partículas de portadores de fármacos administrados por vía oral queden atrapadas dentro de la capa mucosa del intestino, independientemente de su tamaño (Sonia y Sharma, 2014). Estas partículas atrapadas en el moco tienen, entonces, una capacidad muy limitada para la absorción sistémica y la administración de fármacos.

En la administración de vía transdérmica, solo FL1 mostró una pequeña reducción en los valores de glucosa en comparación con los otros. Sin embargo, la reducción no fue suficiente para reducir la glucosa a niveles normales, a pesar de la experiencia con otras drogas que sugiere que la biodistribución de los fármacos inyectados y administrados transcutáneamente puede ser muy similar (Cevc et al., 2002; Cevc, 2003).

Los liposomas flexibles son nuevos portadores de fármacos, llamados también transfersomas, que proporcionan medios para la administración transdérmica no invasiva de agentes terapéuticos. Cuando se cargan con insulina y se aplican en una cantidad razonable, inducen una hipoglucemia terapéuticamente significativa en ratones y en humanos con buena eficacia y reproducibilidad. Esto ofrece nuevas oportunidades para el uso terapéutico de grandes agentes biogénicos o biotecnológicos, tales como péptidos, en la piel de mamífero intacta (Cevc et al., 1998). Los atajos transcutáneos, como las glándulas o los folículos capilares, juegan un papel importante en el proceso de difusión molecular a través de la piel (Potts y Guy, 1992). A pesar de esto, estos son demasiado limitados o demasiado impermeables para permitir que una molécula grande, como la insulina, atraviese la piel en cantidades apreciables. Esto explica por qué una aplicación cutánea de insulina en las micelas de lípidos mixtos o liposomas no tiene un efecto hipoglucémico significativo (Cevc et al., 1998). Investigaciones previas informan la posibilidad de que solo las moléculas con un peso inferior a 500 Da puedan atravesar la piel (Potts y Guy, 1992). Sin embargo, otros investigadores indicaron que las vesículas aplicadas por esta vía se desintegran en la piel y liberan sus componentes con poca eficacia en el cuerpo (Schreier y Bouwstra, 1994).



Aparentemente, las micro-lesiones cutáneas han demostrado mejorar la penetración de vesículas a través de la piel. Los daños generados permeabilidad anómala a las moléculas de insulina, que corresponden a aumentar el transporte de liposomas flexibles. Sin embargo, estos efectos de las lesiones cutáneas deben reflejarse en la mayor variabilidad interindividual (Cevc et al, 1998). Probablemente sugiere una causa de efecto reducido de nuestra formulación. Además, la penetración de los liposomas flexibles está completa en relación con la dosis aplicada y el área de aplicación superficial (Schreier y Bouwstra, 1994).

Todas las formulaciones administradas por vía subcutánea mostraron una reducción a los niveles de glucosa a valores normales. Sin embargo, ambas formulaciones alcanzan valores más altos de glucosa antes de que la insulina se administre sola. El hecho de que los niveles de glucosa disminuyan con la inyección subcutánea de nanocármacos indicó que las formulaciones pueden liberar su contenido. Pero a pesar de la excelente eficacia de encapsulación de estos liposomas flexibles, la liberación de insulina se limitó *in-vivo* por vía oral y transdérmica. Sugiere que otra posibilidad es que el nanovehículo no permita que la proteína cruce su membrana, porque la temperatura de transición de los lípidos utilizados en la fabricación no alcanza un ambiente térmico adecuado dentro del cuerpo para liberar su contenido. Por esa razón es necesario reducir esta temperatura de transición. Las transiciones polimórficas de la matriz de partículas lipídicas presentan una barrera para la caracterización fisicoquímica y el desarrollo exitoso de la formulación (Martins et al, 2007).

La temperatura de esta transición ( $T_m$ ) es una característica física extremadamente importante de los liposomas. De hecho, la transición de fase y la fluidez de las membranas de fosfolípidos determinan propiedades tales como empaquetamiento, permeabilidad, fusión, agregación, unión a proteínas, todo lo cual puede afectar marcadamente la estabilidad de los liposomas y su comportamiento en sistemas biológicos (Lassic, 1993).

Los liposomas flexibles vacíos administrados en animales sanos mostraron una pequeña reducción de los niveles de glucosa en comparación con los animales sin tratamiento. Sin embargo, es necesario evaluar este efecto en animales diabéticos.

En conclusión, la administración oral es la vía más adecuada para obtener un comportamiento fisiológico similar de la insulina; sin embargo, los desafíos para desarrollar formas de dosificación de insulina oral son significativos, considerando que la absorción de insulina es el principal obstáculo. Sin embargo, los resultados de este estudio indican que los liposomas flexibles mantienen la insulina protegida en su interior, tanto que la insulina no podría liberarse al exterior en la vía oral y transdérmica, pero eso indica que es posible obtener un nanovehículo con alto contenido de insulina; sin embargo es necesario modificar algunos detalles en la composición, como la temperatura de transición de los lípidos de la formulación, para lograr mejoras en la liberación *in-vivo* de esta proteína en diferentes rutas a subcutáneas. Se están investigando otros estudios para aclarar estos puntos.

## **8. CONCLUSIONES**

La insulina tiene una biodisponibilidad muy baja cuando se administra por vías alternativas debido a su baja permeabilidad e inestabilidad frente a las enzimas y cambios de pH. Los liposomas pueden proporcionar una capa protectora para las moléculas de insulina, y hay un número de estudios que indican que las moléculas de fármacos en forma de liposomas pueden penetrar más eficazmente a través de las membranas celulares (Patel y Ryman 1976; Iwanaga et al, 1997; Owens, 2003)

El tamaño de partícula de los liposomas es muy importante, ya que las partículas grandes tenderán a ser excretadas fuera del cuerpo a una velocidad mucho más rápida que las más pequeñas más largo lo cual puede causar toxicidad. El índice de polidispersidad proporciona información sobre la distribución del tamaño de las partículas, todas las formulaciones mostraron una alta polidispersidad con excepción de LS1 y LS2 con polidispersidad moderada, lo que podría afectar a la estabilidad del sistema en términos de aglutinación de partículas (Malvern, 2017).

Los resultados mostraron que los liposomas flexibles preparados por método de calentamiento poseían un mayor porcentaje de atrapamiento en comparación con el método de rehidratación de película fina. En ambas técnicas, el aumento de proporciones de fosfolípidos y surfactante aumenta el porcentaje de encapsulación, pero aparentemente aumenta el tamaño y la heterogeneidad de las partículas.

La insulina se sometió a alta temperatura en el proceso de fabricación, se determinó la integridad de su estructura. Los termogramas DSC de insulina indicaron un punto de fusión a 85°C, y la desnaturalización sólo se produce si la insulina se calienta a esta temperatura. Se realizaron estudios de PAGE para confirmar la estructura de la insulina; se encontró estable en Insulina a formulaciones de 4°C, 60°C y 100°C. Adicionalmente, junto con los resultados obtenidos de dichas insulinas expuestas en las pruebas *in-vivo*, los datos sugieren que la refrigeración de la insulina en períodos cortos no es esencial. A pesar de los pequeños cambios estructurales que puede sufrir la insulina, el efecto biológico no se ve afectado. Las formulaciones farmacéuticas que requieren altas temperaturas para su preparación, pueden usarse para insulina sin afectar su efecto biológico. Sin embargo, es necesario evaluar la actividad biológica de esta proteína bajo diferentes condiciones de desnaturalización y extender este estudio a otra especie.

El método de calentamiento, es un modelo de técnica para la producción rápida y sencilla de las vesículas lipídicas. Además, esta técnica evitó el uso de disolventes orgánicos, reduciendo la toxicidad sin afectar la estabilidad y la respuesta clínica, es un método relativamente económico y eficaz para fabricar liposomas cargados eficazmente con insulina, con una dispersidad y estabilidad superiores usando un protocolo simple y rápido en comparación con otros métodos tradicionales (Mozafari 2005, 2010; Mozafari et al., 2007).

La adición de PEG a los liposomas flexibles redujo el tamaño de partícula de liposomas, así como el porcentaje encapsulado en comparación con los liposomas flexibles convencionales. Además, uno de los principales problemas que limita el uso generalizado de liposomas es la estabilidad, tanto física como química, sin embargo los

liposomas flexibles con PEG mantienen la estabilidad durante más de 60 días, la formación de sedimento o el aumento de la turbidez de sobrenadantes no se observaron hasta este período. Los liposomas flexibles cargados de insulina son un nano-transportador potencialmente adecuado para proteger las proteínas contra la desnaturalización y la degradación causadas por el tracto gastrointestinal.

En las pruebas *in-vivo* previas se ha demostrado que la administración oral es la vía más adecuada para obtener un comportamiento fisiológico similar de la insulina; sin embargo, los desafíos para desarrollar formas de dosificación de insulina oral son significativos, considerando que la absorción de insulina es el principal obstáculo. Sin embargo, los resultados de este estudio indican que los liposomas flexibles mantienen la insulina protegida en su interior, tanto que la insulina no podría liberarse al exterior en la vía oral y transdérmica, pero eso indica que es posible obtener un nanovehículo con alto contenido de insulina; sin embargo es necesario modificar algunos detalles en la composición, como la temperatura de transición de la formulación, para lograr mejoras en la liberación *in-vivo* de esta proteína en diferentes rutas a subcutáneas. Se están investigando otros estudios para aclarar estos puntos

Las pruebas de disolución *In-vitro* del preparado LF3-PEG3 muestran que el poco efecto que se obtuvo en las pruebas *in-vivo* puede ser debido a la insulina que quedó fuera de los sistemas, ya que en el momento de agregar el surfactante TRITON X-100, el cual rompe por completo los liposomas, se muestra una liberación de la insulina. Lo cual confirma que nuestros sistemas si han encapsulado la insulina de manera eficiente, pero que la temperatura de transición que requieren para generar liberación no es suficiente, de modo que se debe disminuir la temperatura de transición de nuestros preparados y de esa manera asegurar la liberación de la Insulina.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALLEN T.M., HANSEN C., MARTIN F., REDEMANN C., YAU-YOUNG A. 1991. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives *in-vivo*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1066, 29–36.
- AHRÉN B, TABORSKY GJ JR. 2002. Beta cell function and insulin secretion. En: Porte D. Jr, Sherwin R.S, Baron A., (editors). *Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus*, 6<sup>th</sup> Edition. New York, McGraw-Hill Medical Publishing. p. 43–65.
- AMPUDIA-BLASCO F.J., GIRBES J., CARMENA R. 2005. A case of lipoatrophy with insulin glargine: long-acting insulin analogs are not exempt from this complication. *Diabetes Care* 28(12), 2983.
- ARGÜESO ARMESTO R, DÍAZ DÍAZ JL, DÍAZ PEROMINGO JA, RODRÍGUEZ GONZÁLEZ A, CASTRO MAO M, DIZ-LOIS F. 2011. Lípidos, colesterol y lipoproteínas. *Galicía Clin* 72(1), 7-17.
- AROURI A., HANS H., ELMELUND T., MOURITSEN O. 2012. Lipases, liposomes and lipid-prodrugs. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 18, 419–431.
- ARRANZ B, ROSEL P, RAMIREZ N, DUENAS R, FERNANDEZ P, SANCHEZ JM, NAVARRO MA, SAN L. 2004. Insulin resistance and increased leptin concentrations in noncompliant schizophrenia patients but not in antipsychotic-naive first-episode schizophrenia patients. *Journal of Clinical Psychiatry* 65, 1335–1342.
- AWAD T.S., HELGASON T., KRISTBERGSSON K., DECKER E.A., WEISS J., MCCLEMENTS D.J. 2008. Effect of Cooling and Heating Rates on Polymorphic Transformations and Gelation of Tripalmitin Solid Lipid Nanoparticle (SLN) Suspensions. *Food Biophysics* 3(2), 155 –162.
- BANDEKAR J. 1992. Amide modes and protein conformation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1120, 123-143.
- BANFIELD PET HOSPITAL. State of Pet Health: Report 2011.Estados Unidos. Disponible en: [www.stateofpethealth.com](http://www.stateofpethealth.com).
- BANGHAM AD. 1961. A Correlation between Surface Charge and Coagulant Action of hospholipids. *Nature* 23,1.
- BANGHAM A.D., STANDISH M.M., WATKINS J.C. 1965. The action of steroids and streptolysin S on the permeability of phospholipid structures to cations. *Journal of Molecular Biology* 13, 253-259.

- BANGHAM, AD. 1968. Membrane Models with Phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol* 18,66.
- BANTING, F.G., BEST, C.H., COLLIP, J.B., CAMPBELL, W.R., FLETCHER, A.A., MACLEOD, J.J.R., NOBLE, E.C. 1922. The effect produced on diabetes by extracts of pancreas. *Transactions of the Association of American Physicians* 37, 337–347.
- BATALLA MAYORAL M., CUADROS MORENO A., SAN MARTÍN-MARTÍNEZ E. 2014. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Latin-American Journal of Physics Education* 8(4), 4319-1 – 4319-6.
- BARTLETT J., TURNER-HENSON A., ATCHINSON J., WOOLLEY T, PILLION D. 1994. Insulin administration to the eyes of normoglycemic human volunteers. *Journal of Ocular Pharmacology* 10, 683-90.
- BENDAYAN M., ZIV E., BEN-SASSON R., BAR-ON H., KIDRON M. 1990. Morphocytochemical and biochemical evidence for insulin absorption by the rat ileal epithelium . *Diabetologia* 33, 197-204.
- BENDAYAN M., ZIV E., GINGRAS D., BEN-SASSON R., BAR-ON H., KIDRON M. 1994. Biochemical and morpho- cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa . *Diabetologia* 37, 119-26.
- BERRY M.R., LIKAR M.D. 2007. Statistical assessment of dissolution and drug release profile similarity using a model-dependent approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45(2), 194–200.
- BEST C.H. 1956. The first clinical use of insulin. *Diabetes* 5, 65–67.
- BEULAC C., SACHETELLI S., LAGACÈ J. 1999. Aerosolization of low phase transition temperature liposomal tobramycin as a dry powder in an animal model of chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Drug Targeting* 7(1), 33-41.
- BHARDWAJ U, BURGESS D.J. 2010. A novel USP apparatus 4 based release testing method for dispersed systems. *International Journal of Pharmaceutics* 388, 287–294.
- BHUMKAR, D., JOSHI, H., SASTRY, M., POKHARKAR, V. 2007. Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharmaceutical Research* 24, 1415–1426.
- BILTONEN R.L., LICHTENBERG D. 1993. The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64, 129-142.

- BLUME G., CEVC G., 1990. Liposomes for sustained drug release *in-vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1029, 91–97.
- BORGOÑO C., ZINMAN B. 2012. Insulins: Past, Present, and Future. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America* 41, 1–24.
- BOUCHARD M., ZURDO J., NETTLETON E.J., DOBSON C.M., ROBINSON C.V. 2000. Formation of insulin amyloid fibrils followed by FTIR simultaneously with CD and electron microscopy. *Protein Science* 9, 1960-1967.
- BRANDL M. 2001. Liposomes as drug carriers: a technological approach. *Biotechnology Annual Review* 7, 59-85.
- BURNHAM K.P., ANDERSON D.R. 2004. Multimodel Inference: Understanding AIC and BIC in Model Selection. *Sociological Methods & Research* 33(2), 261–304.
- BURGE, M., SCHADE D. 1997. Insulins. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 26 (3), 575–598.
- CARINO G., MATHIOWITZ E. 1999. Oral insulin delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 35, 249–257.
- CATCHPOLE B., RISTIC J.M., FLEEMAN L.M., DAVISON L.J. 2005. Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks?. *Diabetologia* 48(10), 1948-56.
- CATCHPOLE B., KENNEDY L.J., DAVISON L.J., OLLIER W.E. 2008. Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. *J Small Anim Pract* 49(1), 4-10.
- CEFALU, W. 2004. Concept, strategies, and feasibility of noninvasive insulin delivery. *Diabetes Care* 27, 239–246.
- CERNEA S., KIDRON M., WOHLGELERNTER J., AND RAZ, I. 2005. Dose-response relationship of an oral insulin spray in six patients with type 1 diabetes: A single-center, randomized, single-blind, 5-way crossover study. *Clinical Therapeutics* 27, 1562–1570.
- CEVC G, GEBAUER D, STIEBER J, SCHATZLEIN A, BLUME G. 1998. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1368: 201–215
- CEVC G., SCHÄTZLEIN A., RICHARDSEN H. 2002. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochimica et Biophysica Acta* 1564(1), 21-30.

- CEVC G. 2003. Transdermal Drug Delivery of Insulin with Ultradeformable Carriers. *Clinical Pharmacokinetics* 42 (5), 461-474
- CHAN Y.K., ODA G., KAPLAN H. 1981. Chemical properties of the functional groups of insulin. *Biochemical Journal* 193(2), 419–425.
- CHANCE R.E., ROOT M.A., GALLOWAY J.A. 1976. The immunogenicity of insulin preparations. *Acta Endocrinologica Supplemento (Copenhagen)* 205:185-98.
- CHANG B.S., YEUNG B. 2010. Physical stability of protein pharmaceuticals. In: Feroz Jameel F., Hershenson S. (editors). *Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing Biopharmaceuticals*. John Wiley & Sons Inc. pp. 69-104.
- CHEN Y., SHEN Y., GUO X., ZHANG C., YANG W., MA M., LIU S., ZHANG M., WEN, L. 2006. Transdermal protein delivery by a coadministered peptide identified via phage display. *Nature Biotechnology* 24, 455–460.
- CHENG K., LIM, L. 2004. Insulin-loaded calcium pectinate nanoparticles: Effects of pectin molecular weight and formulation pH. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 30, 359–367.
- CHENG M., GAO X., WANG Y., CHEN H., HE B., XU H., LI Y., HAN J., ZHANG Z. 2013. “Synthesis of glycyrrhetic acid-modified chitosan 5-fluorouracil nanoparticles and its inhibition of liver cancer characteristics *in-vitro* and *in-vivo*,” *Marine Drugs* 11 (9), 3517–3536.
- CHI Q., HUANG K. 2016. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Insulin. *Analytical Letters* 40(1), 95-102
- CHOUDHARI K. B., LABHASETWAR V., DORLE, A.K. 1994. Liposomes as a carrier for oral administration of insulin: Effect of formulation factors. *Journal of Microencapsulation* 11, 319–325.
- ÇILEK A, CELEBI N, TIRNAKSIZ F, TAY A. 2005. A lecithin-based microemulsion of rh-insulin with aprotinin for oral administration: investigation of hypoglycemic effects in non-diabetic and STZ-induced diabetic rats. *International Journal of Pharmaceutics* 298(1), 176–185.
- CLOGSTON J.D., PATRI A.K. 2011. Zeta potential measurement. *Methods in Molecular Biology* 697, 63-70.
- CNQFB. Colegio Nacional de Químicos Biólogos Farmacéuticos. 2002. *Guía de validación de Métodos Analíticos*. Comisión de validación de métodos analíticos. México. Pp. 8 – 50.
- COSTA P, SOUSA LOBO J.M. 2001. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13(2), 123–133.



- COURNARIE F., AUCCHERE D., CHEVENNE D., LACOURE B., SEILLER M., VAUTHIER C. 2002. Absorption and efficiency of insulin after oral administration of insulin-loaded nanocapsules in diabetic rats. *Journal of Pharmaceutics* 242, 325–328.
- CUI F., SHI K., ZHANG L., TAO A., KAWASHIMA Y. 2006. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, *in-vitro* characterization and *in-vivo* evaluation. *Journal of Controlled Release* 114, 242–250.
- CUI F., TAO A., CUN D., ZHANG L., SHI K. 2007. Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *Journal of Pharmaceutical Science* 96, 421–427.
- DAMGÉ C., MICHEL C., APRAHAMIAN M., COUVREUR P. 1988. New approach for oral administration of insulin with polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as drug carrier. *Diabetes* 37, 246–251.
- DAMGÉ C. 1991. Oral insulin. En: Pickup J. (editor). *Biotechnology of Insulin Therapy*. Oxford: Blackwell Scientific. 97–112.
- DAMGÉ C., MAINCENT P., UBRICH N. 2007. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *Journal of Controlled Release* 117, 163–170.
- DAMGÉ C., REIS C.P., MAINCENT P. 2008. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. *Expert Opinion on Drug Delivery* 5(1), 45-68.
- DAPERGOLAS G., GREGORIADIS G. 1976. Hypoglycaemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats. *Lancet* 2, 824-27.
- DAVIDSON J.K., DEBRA D.W. 1978. Immunologic insulin resistance. *Diabetes* 27(3), 307-18.
- DEFRONZO R., FERRANNINI E., HENDLER R., FELIG P., WAHREN J. 1983. Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man. *Diabetes* 32, 35- 45.
- DEGIM Z., UNALB N., EYSIZC D., ABBASOGLU U. 2004. The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer. *Life Sciences* 75, 2819–2827.
- DEGIM I., GUMUSEL B., DEGIM Z., OZCELIKAY.T., TAY A., GUNER S. 2006. Oral administration of liposomal insulin. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6, 2945–2949.

- DEL PRATO S., LEONETTI F., SIMONSON D., SHEEHAN P., MATSUDA M., DE FRONZO R. 1994. Effect of sustained physiologic hyperinsulinaemia and hyperglycaemia on insulin secretion and insulin sensitivity in man. *Diabetologia* 37, 1025–1035.
- DIAZ D.A., COLGAN S.T., LANGER C.S., BANDI N.T., LIKAR M.D., ALSTINE L.V. 2016. Dissolution Similarity Requirements: How Similar or Dissimilar Are the Global Regulatory Expectations?. *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) journal* 18(1), 15–22.
- DOPPLER CA. 1843. Über das farbige Licht der Doppelsterne und einiger anderer Gestirne des Himmels. *Abh Königl Böhm Ges Wiss* 2, 17.
- D'SOUZA S. 2014. A Review of *In-vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms. *Advances in Pharmaceut* 2014: 1-12.
- DZWOLAK W., SMIRNOVAS V., JANSEN R. WINTER R. 2004. Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: An FT-IR spectroscopic study. *Protein Science* 13(7), 1927–1932.
- DZWOLAK W., LOKSZTEJN A., SMIRNOVAS V. 2006. New insights into the self-assembly of insulin amyloid fibrils: an HD exchange FT-IR study. *Biochemistry* 45, 8143-8151.
- ELSNER M., GULDBAKKE B., TIEDGE M., MUNDAY R., LENZEN S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43(12):1528-33.
- FALL T., HANSSON H., HEDHAMMAR A., KÄMPE O., EGENVALL A. 2007. Diabetes Mellitus in a Population of 180,000 Insured Dogs: Incidence, Survival, and Breed Distribution. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21, 1209–1216.
- FELDMAN E.C., NELSON R. 2000 (editores). *Endocrinología y Reproduccion En Perros yGatos*. Mcgraw-Hill / Interamericana. México.
- FDA- CDER. 1997. *Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms; Guidance for Industry*; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U.S. Government Printing Office: Washington, DC.
- FERNÁNDEZ-URRUSUNO R., CALVO P., REMUÑAN-LÓPEZ C., VILA-JATO J., ALONSO M. 1999. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Reseach*. 16, 1576–1581.
- FERRANNINI E., WAHREN J., FELIG P., DEFRONZO R. 1980. The role of fractional glucose extraction in the regulation of splanchnic glucose metabolism in normal and diabetic man. *Metabolism* 29, 28-35.

- GABIZON A.A., MARTIN F.J., 1997. Polyethylene glycol-coated (PEGylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumors. *Drugs* 54, S15–S21.
- GARCIA-FUENTES M., PREGO C., TORRES D., ALONSO M.J. 2005. A comparative study of the potential of solid triglyceride nanostructures coated with chitosan or poly(ethylene glycol) as carriers for oral calcitonin delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 25,123–33.
- GILLET A., GRAMMENOSB A., COMPÈREC P., EVRARDA B., PIEL G. 2009. Development of a new topical system: Drug-in-cyclodextrin-in-deformable Liposome. *International Journal of Pharmacology* 380(1-2),174-80.
- GILOR C., GRAVES T. 2010. Synthetic Insulin Analogs and Their Use in Dogs and Cats. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 40, 297–307.
- GITTINGS M.R., SAVILLE D. 1998. The determination of hydrodynamic size and zeta potential from electrophoretic mobility and light scattering measurements. *Colloids and Surfaces* 141(1), 111-117.
- GOTO T., MORISHITA M., NISHIMURA K., NAKANISHI M., KATO A., EHARA J., TAKAYAMA K. 2006. Novel mucosal insulin delivery systems based on fusogenic liposomes. *Pharmaceutical Research* 23(2), 384-91.
- GORIYA Y, BAHORIC A, MARLISS EB, ZINMAN B, ALBISSER A.M. 1980. Blood glucose control and insulin clearance in unrestrained dogs portally infused with a portable insulin delivery system. *Diabetologia* 19, 452-57.
- GOYCOOLEA F., LOLLO G., REMUÑAN-LÓPEZ C., QUAGLIA F., ALONSO M. 2009. Chitosan-alginate blended nanoparticles as carriers for the transmucosal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules* 10, 1736–1743.
- GRECO D. 2012. Diabetes Mellitus in Animals: Diagnosis and Treatment of Diabetes Mellitus in Dogs and Cats. En: Bagchi D., Sreejayan N. *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. El sevier. Estados Unidos. 487–497.
- GREGORIADIS G. 1992. *Liposome: Preparation and Related Techniques*. Vol. 1. 1992, Florida: CRC Press.
- GREGORIADIS G. 1995. *Engineering Liposomes for Drug Delivery*. Progress and Problems. *Trends Biotechnology*, 13, 10
- GRENHA A., SEIJO B., REMUÑAN-LÓPEZ C. 2005. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *European Journal of Pharmaceutical Science* 25, 427–437.

- GRIFFIN M., FEDER A., TAMBORLANE W. 2001. Lipoatrophy associated with lispro in insulin pump therapy. *Diabetes Care* 24(1), 174.
- GUO J., PING Q., ZHANG L. 2000. Transdermal delivery of insulin in mice by using lecithin vesicles as a carrier. *Drug Delivery* 7, 113–116.
- GUO J., PING Q., JIANG G., HUANG L., TONG Y. 2003. Chitosan-coated liposomes: characterization and interaction with leuprolide. *International Journal of Pharmaceutics* 260, 167–173.
- GUPTILL, L., GLICKMAN, L., GLICKMAN, N., 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records. *The Veterinary Journal* 165, 240–247.
- HALLAS-MOLLER K., JERSILD M., PETERSEN K, SCHILICHTKRULL J. 1957. Clinical investigations on new insulin preparations with protracted action: Insulin-zinc preparations used in one daily injection. *Ugeskr Laeger* 113, 1767-1771.
- HAGEDORN H., JENSEN B., KRARUP N., WODSTRUP I. 1936. Protamine insulinate. *Journal of the American Medical Association* 106, 177-180.
- HEINEMANN L. 2011. New ways of insulin delivery. *International Journal of Clinical Practice Supplement* 170, 31-46.
- HEISE T., PIEBER T.R. 2007. Towards peakless, reproducible and long-acting insulins. An assessment of the basal analogues based on isoglycaemic clamp studies. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 9(5), 648-59.
- HELLMIG S., VON SCHÖNING F., GADOW C., KATSOULIS S., HEDDERICH J., FÖLSCH U.R., STÜBER E. 2006. Gastric emptying time of fluids and solids in healthy subjects determined by C13 breath tests: influence of age, sex and body mass index. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 21, 1832-1838.
- HERNANDEZ B., SOLIS. D. 2005. Desarrollo y validación de un método analítico por adiciones patrón para evaluar y comparar perfiles de disolución de cinco marcas diferentes de tabletas de Metoprolol en equipos II y IV, USP (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores (FES-UNAM). Cuatitlan. México. Paginas 56 – 65.
- HOENIG M. 2002. Comparative aspects of diabetes mellitus in dogs and cats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 197(1-2), 221-9.
- HOME P.D., LINDHOLM A, RIIS A. 2000. Insulin aspart vs. human insulin in the management of long-term blood glucose control in Type 1 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *Diabetic Medicine* 17(11), 762-70.

- HUUS K., HAVELUND S., OLSEN H, VAN DE WEERT M., FROKJAER S. 2005. Thermal Dissociation and Unfolding of Insulin. *Biochemistry* 44, 11171-11177.
- IMAMURA T., KOFFLER M., HELDERMAN J.H., PRINCE D., THIRLBY R., INMAN L., UNGER R.H. 1988. Severe Diabetes Induced In Subtotally Depancreatized Dogs By Sustained Hyperglycemia. *Diabetes* 37(5), 600-9.
- INGLE J.D., CROUCH R. 1988. *Spectrochemical Analysis*. Primera edición. Prentice Hall, Englewood Cliffs.
- ICH. International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. 1994. *VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*. Published in the FDA, Federal Register 60, 11260.
- ISHIDA M., MACHIDA Y., NAMBU N., NAGAI T. 1981. New mucosal dosage form of insulin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29, 810–816.
- IWANAGA K., ONO S., NARIOKA K., MORIMOTO K., KAKEMI M, YAMASHITA S., NANGO M., OKU N. 1997. Oral delivery of insulin by using surface coating liposomes: Improvement of stability of insulin in GI tract. *International Journal of Pharmaceutics* 157, 73–80.
- IYER H., KHEDKAR A., VERMA M. 2010. Oral insulin - a review of current status. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12(3), 179-85.
- JACOB S., SHIRWAIKAR A.A., SRINIVASAN K.K., ALEX J., PRABU S.L., MAHALAXMI R., KUMAR R. 2006. Stability of proteins in aqueous solution and solid state. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 68(2), 154-163
- JADUPATI M, SUMA S, AMIT N, KALYAN S. 2012. Formulation, optimization and evaluation of transferosomal gel for transdermal insulin delivery. *Saudi Pharmaceutical Journal* 20:355–363
- KANIKKANNAN N., SINGH J., RAMARAO P. 1999. Transdermal iontophoretic delivery of bovine insulin and monomeric human insulin analogue. *Journal of Controlled Release* 59, 99–105.
- KATAYAMA K., KATO Y., ONISHI H., NAGAI T., MACHIDA Y. 2003. Double liposomes: hypoglycemic effects of liposomal insulin on normal rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 29(7), 725-31.
- KATSUMA M., WATANABE S., KAWAI H., TAKEMURA S., SAKO K. 2005. Effect of absorption promoters on insulin absorption through colon targeted delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 307, 156–162.

- KARN P.R., CHO W., PARK H.J., PARK J.S., HWANG S.J. 2013. Characterization and stability studies of a novel liposomal cyclosporin A prepared using the supercritical fluid method: comparison with the modified conventional Bangham method. *International Journal of Nanomedicine* 8, 365–377.
- KHAN M.A., AGARWAL V. 2003. Composition and method for preparation of an oral dual controlled release formulation of a protein and inhibitor . U.S. Patent No. 20,030,220,254.
- KISEL M., KULIK L., TSYBOVSKY I., VLASOV A., VOROB'YOV M., KHOLODOVA E. 2001. Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat. *International Journal of Pharmaceutics* 216, 105–114.
- KOUSAR R., AHMAD M., KHAN S.A., AAMIR M.N., MURTAZA G. 2013. Preparation and *In-vitro* Characterization of Microparticles Loaded with Cimetidine: Analysis of Dissolution Data using DDSolver. *Latin American Journal of Pharmacy* 32(8), 1212-1217.
- KRAYENBUHL, C., ROSENBERG, T. 1946. Crystalline protamine insulin. *Reports of the Steno Memorial Hospital and the Nordisk Insulin Laboratory* 1, 60–73.
- LAI S.K., WANG Y.Y., HANES J. 2009. Mucus- penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 158 – 71.
- LASIC D.D. 1993. *Liposomes from physics to applications*. Elsevier Science BV. Amsterdam .
- LASSMANN-VAGUE V., RACCAH D. 2006. Alternatives routes of insulin delivery. *Diabetes & Metabolism* 32, 513-522.
- LEE Y, YALKOWSKY S. 1999. Systemic absorption of insulin from a Gelfoam ocular device. *International Journal of Pharmaceutics* 10 (190), 35-40.
- LEVIN P., ZHANG Q., MERSEY J., LEE F., BROMBERGER L., BHUSHAN M., BHUSHAN R. 2011. Glycemic Control With Insulin Glargine Plus Insulin Glulisine Versus Premixed Insulin Analogues in Real-World Practices: A Cost-Effectiveness Study With a Randomized Pragmatic Trial Design. *Clinical Therapeutics* 33(7), 841 – 850.
- LI N., ZHUANGA C., WANGA M., SUNB X., NIEA S., PANA W. 2009. Liposome coated with low molecular weight chitosan and its potential use in ocular drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 379, 131–138.
- MALVERN. Dynamic light scattering common terms defined [Online]. Malvern Instruments Limited. Disponible en: <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp->

content/uploads/2011/02/DLS\_Terms\_defined\_Malvern.pdf (Accessed: 20 April 2017)

- MANSOURI E., PANAH M., GHAFFARI M., GHORBANI A. 2011. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on oxidative estrés induced by diabetes in rat kidney. *Iran Biomedical Journal* 15(3), 100-106.
- MAO S., GERMERSHAUS O., FISCHER D., LINN T., SCHNEPF R., KISSEL, T. 2005. Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells. *Pharmaceutical Research* 22, 2058–2068.
- MARMOR M., WILLEBERG P., GLICKMAN L., PRIESTER W., CYPESS R., HURVITZ A. 1982. Epizootiologic patterns of diabetes mellitus in dogs. *American Journal of Veterinary Reserch* 43, 465-470.
- MARIER J.F., LAVIGNE J., DUCHARME M.P. 2002. Pharmacokinetics and efficacies of liposomal and conventional formulations of tobramycin after intratracheal administration in rats with pulmonary Burkholderia cepacia infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(12), 3776-81.
- MARTINS S., SARMENTO B., FERREIRA D.C., SOUTO E.B. 2007. Lipid- based colloidal carriers for peptide and protein delivery – liposomes versus lipid nanoparticles . *International Journal of Nanomedicine* 2, 595–607.
- MASSEY J.T., MOORE T.F., PARSONS V.L., TADROS W. 1989. Design and estimation for the National Health Interview Survey, 1985–1994. Hyattsville, MD: National Center for Health Statistics. *Vital and Health Statistics* 2(110).
- MATSUO Y., SHIMODA S., SAKAKIDA M., NISHIDA K., SEKIGAMI T., ICHIMORI S., ICHINOSE K., SHICHIRI M., ARAKI E. 2003. Strict glycemic control in diabetic dogs with closed-loop intraperitoneal insulin infusion algorithm designed for an artificial endocrine pancreas. *Journal of Artificial Organs* 6(1), 55–63.
- MAURI, S. 2014. Insulin unfolding and aggregation: a multi-disciplinary study. PhD Thesis. University of Liverpool.
- McKEE T., McKEE JR. 2009. *Bioquímica*. 4 edición. Mexico: McGraw Hill. pp 372-404.
- MELIÁN C., PEREZ A. 2008. Diabetes mellitus canina. En: Melian C. *Manual de endocrinología de pequeños animals*. Multimedica ediciones veterinarias. España. 225 – 266.
- MESIHA M., SIDHOM M., FASIPE B. 2005. Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 288, 289–293.

- MEYER HW, RICHTER A. 1998. Minimal Radius of Curvature of Lipid Bilayers in the Gel Phase correspond to the Dimension of Biomembrane Structures. *Journal Struct Biol* 124,10.
- MODI P., MIHIC M., LEWIN A. 2002. The evolving role of oral insulin in the treatment of diabetes using a Rapid Mist™ system. *Diabetes Metabolism Reserch and Reviews* 18, S38–S42.
- MOORE J.W., FLANNER H.H. 1996. Mathematical comparison of dissolution profiles. *Pharmaceutical Technology* 20, 64–74.
- MORGAN R., HUNTZICKER M. 1996. Delivery of systemic regular insulin via the ocular route in dogs. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 12, 515-26.
- MORI A., SAKO T., LEE P., MOTOIKE T., IWASE K., KANAYA Y., FUKUTA H., MIZUTANI H., ARAI T. 2008. Comparison of time-action profiles of insulin glargine and NPH insulin in normal and diabetic dogs. *Veterinary Research Communications* 32(7),563-73.
- MOZAFARI M.R. 2005. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10(4), 711-9.
- MOZAFARI M.R., REED C.J., ROSTRON C. 2007. Cytotoxicity evaluation of anionic nanoliposomes and nanolipoplexes prepared by the heating method without employing volatile solvents and detergents. *Pharmazie* 62, 205–209.
- MOZAFARI M.R. 2010. Liposomes: Methods and Protocols. In: Volkmar W. (ed). *Liposomes, Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*. 1st edition. Human Press. Arizona. USA.
- MÜLLER R.H., MÄDER K., GOHLA S. 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50, 161–77.
- MUÑOZ M. 2014. Degludec, una nueva insulina basal de acción ultra-lenta para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y 2: avances en investigación clínica. *Endocrinología y Nutrición* 61(3), 153-159.
- MUSTATA G, DINH S. 2006. Approaches to oral drug delivery for challenging molecule. *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems* 23, 111-135.
- NAVARRO G., CABRAL P., MALANGA A., SAVIO E. 2008. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenac sódico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas* 37(2), 212-223.
- NEW R.R.C. 1990. Characterization of liposomes. En: NEW R.R.C (editor). *Liposomes: a practical approach*. Oxford University press. New York. Pp. 138-139.



- Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-1998. Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.
- OBEROI H., YORGENSEN Y., MORASSE A., EVANS J., BURKHART D. 2016. PEG modified liposomes containing CRX-601 adjuvant in combination with methylglycol chitosan enhance the murine sublingual immune response to influenza vaccination. *Journal of Controlled Release* 223, 64-74.
- OGAWA M., UCHINO R., KAWAI A., KOSUGI M., MAGATA Y. 2015. PEG modification on (111)In-labeled phosphatidyl serine liposomes for imaging of atherosclerotic plaques. *Nuclear Medicine and Biology* 42(3), 299-304
- OWENS D., ZINMAN B., BOLLI G. 2003. Alternative routes of insulin delivery. *Diabetic Medicine* 20, 886–898 P
- OWENS D.R., BOLLI G.B. 2008. Beyond the era of NPH insulin--long-acting insulin analogs: chemistry, comparative pharmacology, and clinical application. *Diabetes Technology and Therapeutics* 10(5), 333-49.
- POWERS A., D'ALESSIO D. 2011. Endocrine Pancreas and Pharmacotherapy of Diabetes Mellitus and Hypoglycemia. En: Brunton L., Chabner B., Knollmann B. (eds). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12<sup>o</sup> edicion. McGraw Hill, medical publishing division. USA. Capitulo 43.
- PAN Y, LI YJ, ZHAO HY, ZHENG JM, XU H, WEI G, HAO JS, CUI FD. 2002. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin *in-vivo*. *International Journal of Pharmaceutics* 249(1-2), 139-47.
- PARK, S.J., JEONG, U.H., LEE, J.W., PARK, J.S. 2010. Preparation and characterization of bovine albumin-loaded cationic liposomes: effect of hydration phase. *Journal of Pharmaceutical Investigation* 40, 353–356.
- PARK S., CHOI S., DAVAA E., PARK J. 2007. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1521–1546.
- PARK S, CHOI S, DAVAA E, PARK J. 2011. Encapsulation enhancement and stabilization of insulin in cationic liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 415, 267– 272.
- PARNIS M., OLDHAM K. 2013. Beyond the Beer–Lambert law: The dependence of absorbance on time in photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 267, 6– 10.
- PATEL H., RYMAN B. 1976. Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes. *FEBS Letters* 62, 60-62.

- PATEL H., STEVENSON R., PARSONS J., RYMAN B. 1982. Use of liposomes to aid intestinal absorption of entrapped insulin in normal and diabetic dogs. *Biochimica et Biophysica Acta* 716, 188-193.
- PEREIRA-LACHATAIGNERAIS J., PONS R., PANIZZA P., COURBIN L., ROUCH J., LÓPEZ O. 2006. Study and formation of vesicle systems with low polydispersity index by ultrasound method. *Chemistry and Physics of Lipids* 140 (1-2), 88–97.
- PEPPAS N., KAVIMANDAN N. 2006. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *European Journal of Pharmaceutical Science* 29, 183–197.
- PILLAI O., PANCHAGNULA R. 2001. Insulin therapies – past, present and future. *Drugs Discovery & Therapeutics* 6 (20), 1056 – 1061.
- PINTO REIS C., NEUFELD R., RIBEIRO A., VEIGA F. 2006. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine* 2, 53–65.
- PINTO REIS C., RIBEIRO A., HOUNG S., VEIGA F., NEUFELD R. 2007. Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and *in-vitro/in-vivo* bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Science* 30, 392–397.
- PINTO REIS C., DAMGE C. 2012. Nanotechnology as a Promising Strategy for Alternative Routes of Insulin Delivery. *Methods in Enzymology* 508, 217- 294.
- POTTS R.O., GUY R.H. 1992. Predicting skin permeability. *Pharmaceutical Research* 9, 663–669.
- PUBCHEM. Sodium Cholate [Online]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. (Acceso 27 febrero de 2017).
- RADWAN M. 2001. Enhancement of absorption of insulin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanospheres by sodium cholate after oral and subcutaneous administration in diabetic rats. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27, 981–989.
- RADWAN, M., ABOUL-ENEIN, H. 2002. The effect of oral absorption enhancers on the *in-vivo* performance of insulin-loaded poly(ethylcyanoacrylate) nanospheres in diabetic rats. *Journal of Microencapsulation* 19, 225–235.
- RAJAN R, JOSE S, MUKUND VP, VASUDEVAN DT. 2011. Transferosomes – A Vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research* 2(3): 138–143.

- RAKIETEN N., RAKIETEN M., NADKARNI M. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemotherapy Reports* 29, 91-98.
- RAJAMANICKAM VIJAYAKUMAR M., KOSURU R., VUDDANDA P.R., SINGH S.K., SINGH S. 2016, 'Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 33, 125–135
- REIS C., VEIGA F., RIBEIRO A., NEUFELD R., DAMGÉ C. 2008. Nanoparticulate biopolymers deliver insulin orally. *Journal of Pharmaceutical Science* 97, 5290–5305
- ROYATVAND S., FALLAH HOSEINI H., EZZATPANAH H., SEKEHCHI M. 2013. Determination of Insulin Concentration in Camel Milk Using Ultra Violet – Visible Absorption Spectroscopy. *Journal of Food Biosciences and Technology* 3, 53-60.
- RUIZ M.E. VOLONTÉ M.G. 2014. Biopharmaceutical Relevance of Dissolution Profile Comparison: Proposal of a Combined Approach. *Dissolution Technologies* 21 (1-2), 32-46.
- SARMENTO B., RIBEIRO A., VEIGA F., SAMPAIO P., NEUFELD R., FERREIRA D. 2007. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery. *Pharmaceutical Research* 24, 2198–2206.
- SARMENTO B., DOMINGOS F., VEIGA F., RIBEIRO A. 2006. Characterization of insulin-loaded alginate nanoparticles produced by ionotropic pre-gelation through DSC and FTIR studies. *Carbohydrate Polymers* 66, 1–7.
- SCHREIER H, BOUWSTRA J. 1994. Liposomes and niosomes as topical drug carriers, dermal and transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release* 30, 1-15.
- SCOTT D. 1934. Crystalline insulin. *Biochemical Journal* 28, 1592-1602.
- SCOTT D., FISHER A. 1936. Studies on insulin with protamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 58, 78-92.
- SEARS K.W., DROBATZ K.J., HESS R.S. 2009. Use of lispro insulin for treatment of dogs with diabetic ketoacidosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 696.
- SEARS K.W., DROBATZ K.J., HESS R.S. 2012. Use of lispro insulin for treatment of diabetic ketoacidosis in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 22(2), 211-8.
- SHAH J.C., DESHPANDE A. 2014. Kinetic modeling and comparison of *in-vitro* dissolution profiles. *World Journal of Pharmaceutical Sciences* 2(4), 302-309.

- SIGMA ALDRICH. Poly(ethylene glycol) 2,000 [Online]. Disponible en: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/81221?lang=es&region=MX>. Acceso: 17 Julio de 2015.
- SIMÕES S., MOREIRAA J., FONSECAB C., DÜZGÜNES Z., PEDROSO DE LIMA P. 2004. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 947– 965.
- SIMON S.A., ADVANI S., MCINTOSH T.S. 1995. Temperature Dependence of the Repulsive Pressure Between Phosphatidylcholine Bilayers. *Biophysical Journal* 69, 1473-1483.
- SIMON M., WITTMAR M., KISSEL T., LINN T. 2005. Insulin containing nanocomplexes formed by self-assembly from biodegradable amine-modified poly(vinyl alcohol)-graft-poly(l-lactide): Bioavailability and nasal tolerability in rats. *Pharmaceutical Research* 22, 1879–1886.
- SINGHVI G., SINGH M. 2011. Review: *in-vitro* drug release characterization models. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2(1), 77-84.
- SMALL D. 1986. *The Physical Chemistry of Lipids: From Alkanes to Phospholipids*. Handbook of Lipid Research. Vol 4., New York: Plenum Press.
- SMITH L.L. 1991. Another cholesterol hypothesis: cholesterol as antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine* 11, 47-61.
- SIMON TJ. 1986. Depth of Water Penetration into Lipid Bilayers. *Meth Enzymol.* 127, 511.
- SIPAI ALTAF BHAI M., VANDANA D., MAMATHA Y., PRASANTH V. 2012. Liposomes: An overview. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* 1(1), 13-21.
- SONIA, T., SHARMA, C. 2014. *Oral insulin delivery*, 1 ed. United Kingdom: Woodhead Publishing.
- SPANGLER R., TRIEBWASSER K., WILSON M. 1986. Effect of charge 25 on hepatic specific-nature of vesicle encapsulated insulin in conscious dogs. *American Journal of Physiology* 251, 591—596.
- SPANGLER R. 1990. Insulin administration via liposomes. *Diabetes care* 13 (9), 911-922.
- SPANGLER R. 2006. Selective insulinization of liver in conscious diabetic dogs. *American Journal of Physiology* 249, 152-159.

- STEVENSON R.W., ALBERTI K.G. 1980. Comparison of the effects of portal and peripheral infusions of insulin on glucose turnover and recycling in diabetic dogs. *Diabetologia* 19, 564-72.
- STOTE R., MARBURY T., SHI L., MILLER M., STRANGE P. 2010. Comparison pharmacokinetics of two concentrations (0.7% and 1.0%) of Nasulin, an ultra-rapid-acting intranasal insulin formulation. *Journal of Diabetes Science & Technology* 4, 603–609.
- TENHOOR C., DRESSMAN J. 1992. Oral absorption of peptides and proteins. *S T P Pharma Sciences* 2, 301-312.
- TEUSCHER A. 1974. Treatment of insulin lipoatrophy with monocomponent insulin. *Diabetologia* 10(3), 211–214.
- THOMPSON C.J., TETLEY L., CHENG W.P. 2010. The influence of polymer architecture on the protective effect of novel comb shaped amphiphilic poly(allylamine) against *in-vitro* enzymatic degradation of insulin--towards oral insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 383(1-2), 216-27.
- TIPPAVAJHALA V., YAMSANI M. 2010. Electrophoretic estimation of insulin: a novel approach to an older technique. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 2(4), 19-23.
- TOMLIN J., BROWN N., ELLIS A., CARLSSON A., BOGENTOFT C., READ N.W. 1993. The effect of liquid Fibre on gastric emptying In the rat and humans and the distribution of small intestinal contents in the rat. *Gut* 34, 1177-1181.
- TODINOVA S., GUNCHEVA M., YANCHEVA D. 2016. Thermal and conformational stability of insulin in the presence of imidazolium-based ionic liquids. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 123(3), 2591–2598.
- TRINDER P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen receptor. *Annals if Clinical Biochemistry* 6, 24 – 37.
- TSUCHIYA Y., URAKAMI T. 1997. Quantitation of absorbing substances in turbid media such as human tissues based on the microscopic Beer-Lambert law. *Optics Communications* 144, 269-280.
- VANDANA M., SAHOO S.K., 2009. Optimization of physicochemical parameters influencing the fabrication of protein-loaded chitosan nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 4, 773-785.
- VEMURI C. 1995. Preparation and Characterization of Liposomes as Therapeutic Delivery Systems: a Review. *Pharmaceutic Acta Helv* 70, 16.
- VOET D., VOET J. 2006. *Bioquímica*. 3º Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.

- WEST E., SIMON O.R., MORRISON E.Y.1996. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Medical Journal* 45: 60-62.
- WINGER M., DE VRIES A., GUNSTEREN W.F. 2009. Dependencia de campo de fuerza de las propiedades conformacionales de glicol de  $\alpha$ ,  $\omega$ -dimethoxypolyethylene. *Física Molecular* 107(13), 1313-1321.
- WRIEDT, T. Mie Theory: A review. In: Hergert W, Wriedt Th. (eds.), *The Mie Theory. Basics and applications*. Springer Series in Optical Science, 2012, 169, 53-79.
- XU H., HUANG K., ZHU Y., GAO Q., WU Q., TIAN W., SHENG X., CHEN Z., GAO Z. 2002. Hypoglycaemic effect of a novel insulin buccal formulation on rabbits. *Pharmacological Research* 46, 459–467.
- XU G., ZHANG N. 2009. Nanoparticles for gene delivery: A brief patent review. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*. 3(2), 125-136
- XU X., KHAN M.A., BURGESS D.J. 2012. A two-stage reverse dialysis *in-vitro* dissolution testing method for passive targeted liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 426(1-2), 211-8.
- XUAN B., MCCLELLAN D., MOORE R., CHIOU G. 2007. Alternative delivery of insulin via eye drops. *Diabetes Technology & Therapeutics* 7, 695-698.
- YAMAOKA K., NAKAGAWA T., UNO T. 1978. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* 6(2), 165-175.
- ZHAO T., LIU Y., GAO Z., GAO D., LI N., BIAN Y., DAI K., LIU Z. 2015. Self-assembly and cytotoxicity study of PEG-modified ursolic acid liposomes. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 53, 196-203.
- ZHANG Q., SHEN Z., NAGAI, T. 2001. Prolonged hypoglycemic effect of insulin-loaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles after pulmonary administration to normal rats. *International Journal of Pharmaceutics* 218, 75–80.
- ZHANG N., PING Q., HUANGA G., XUA W. 2005. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics* 294, 247–259.
- ZHANG Y., ZHU J., TANG Y., CHEN X., YANG Y. 2009. The preparation and application of pulmonary surfactant nanoparticles as absorption enhancers in insulin dry powder delivery. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 35, 1059–1065.

- ZHANG Y., HUO M. , ZHOU J, ZOU A., LI W., YAO C.,XIE S. 2010. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) journal 12(3), 263-271.
- ZHANG X., QI J., LU Y., HU X., HE W., WU W. 2014. Enhanced hypoglycemic effect of biotin-modified liposomes loading insulin: effect of formulation variables, intracellular trafficking, and cytotoxicity. Nanoscale Research Letters 9(1): 185.
- ZHANG H. 2017. Thin-Film Hydration Followed by Extrusion Method for Liposome Preparation. Methods in Molecular Biology 1522, 17-22.