



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN PROTOTIPO DE INSULINA DE LIBERACIÓN
MODIFICADA PARA USO VETERINARIO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

JESSICA CONTRERAS GUZMÁN



CDMX

AÑO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: BERNAD BERNAD MARÍA JOSEFA
VOCAL: NOVELO TORRES ALMA MIRIAM
SECRETARIO: LEYVA GÓMEZ GERARDO
1er. SUPLENTE: GONZALEZ TRUJANO MARIA EVA
2° SUPLENTE: VALADEZ ESLAVA PEDRO SALVADOR

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO EN EL EDIFICIO F DE LA FACULTAD DE QUÍMICA EN LOS LABORATORIOS 118, 120 Y 123 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, ASÍ COMO EN EL LABORATORIO 100 EN EL EDIFICIO B DE LA UNIDAD DE POSGRADO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR, EN COLABORACIÓN CON LA FACULTAD DE MEDICINA VETERIANARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. DINORAH VARGAS ESTRADA

SUSTENTANTE:

JESSICA CONTRERAS GUZMÁN

AGRADECIMIENTOS

Gracias al financiamiento económico de este proyecto de Tesis de Licenciatura por parte del programa PAPIIT “Evaluación de la seguridad no clínica in vitro/in vivo (estadio 2) en el desarrollo de un prototipo de insulina de liberación modificada para el tratamiento de diabetes. Parte II” con clave IT202420 a cargo de la Dra. Sara del Carmen Caballero Chacón y por su puesto de la Supervisión Técnica de la Dra. Dinorah Vargas Estrada, a la FMVZ y el equipo de trabajo que llevan, Dra. Sheila Peña, Dr. Alonso Sierra y M. en C. Juan Isaac Chávez.

ÍNDICE

1. GLOSARIO.....	01
2. RESUMEN.....	02
3. MARCO TEORÍCO.....	03
3.1 . Diabetes Mellitus.....	03
3.1.1 Clasificación de la Diabetes Mellitus Humana.....	03
3.1.2 Diabetes Mellitus Canina.....	04
3.1.3 Epidemiología y tratamiento de la Diabetes Mellitus Canina.....	06
3.2 Insulina.....	09
3.2.1 Clasificación de la Insulina.....	10
3.2.2 Acción de la Insulina.....	13
3.3 Liposomas.....	15
4. HIPÓTESIS.....	19
5. OBJETIVO.....	19
5.1 Objetivos particulares.....	19
6. METODOLOGÍA.....	20
6.1 Material.....	20
6.1.1 Materia Prima.....	20
6.1.1.1 Fosfatidilcolina.....	20
6.1.1.2 Hidrato de Colato de Sodio.....	22
6.1.1.3 Polietilenglicol.....	22
6.1.1.4 Poloxámero.....	24
6.1.1.5 Éteres de Alquilo de Polioxietileno.....	26
6.1.2 Material de Laboratorio.....	27
6.1.2.1 Kit Pierce™ BCA Protein Assay.....	27
6.1.3 Equipos de Laboratorio.....	28

6.2 Procedimiento.....	29
6.2.1 Preparación de Liposomas por el método de calentamiento.....	29
6.2.2 Caracterización de Liposomas cargados con insulina.....	32
6.2.3 Cuantificación de Insulina Encapsulada en los Liposomas (% de Eficiencia de Encapsulación).....	32
6.2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	36
6.2.5 Preparación de la Curva de Calibración de Insulex R en medio de Sacarosa al 10% y PBS a pH de 7.4.....	37
6.2.6 Análisis Estadístico.....	38
7. RESULTADOS y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
8. CONCLUSIONES.....	63
9. BIBLIOGRAFÍA.....	64

1. GLOSARIO

aa	Aminoácido
ADA	Asociación Americana de Diabetes
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína Serina-Treonina-cinasa
ATP	Adenosina Trifosfato
CAD	Cetoacidosis diabética
DG	Diabetes Gestacional
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
d.nm	Diámetro en nanómetro
DSC	Calorimetría de Barrido Diferencial
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
FQ	Facultad de Química
GLUT	Glucotransportadores
IRS	Receptores de Insulina
LUV	Vesícula Unilaminar Grande

min.	Minuto
MLV	Vesícula Multilaminar
mTOR	Diana mamífera de la rapamicina
MV	Médicos Veterinarios
mV	Milivolts
MXN	Peso mexicano
NP	Nano partícula
NPH	Insulina Neutral Protamina de Hagedorn
OD	Otros tipos de Diabetes
PdI	Índice de Polidispersión
PEG	Polietilenglicol
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4-5-trifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
SHC	Proteína de colágeno
SUV	Vesícula Unilaminar Pequeña
UNIPREC	Unidad de Investigación Preclínica
USAIL	Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria
UV	Vesícula Unilaminar

2. RESUMEN

En el área Veterinaria existe una polémica sobre la clasificación de la Diabetes Mellitus, ya que algunos autores se basan al *Royal Veterinary College* de Inglaterra, donde la clasificación es con base en la causa de la hiperglucemia: por deficiencia de la insulina o por resistencia a esta, sin embargo, por sus signos y síntomas es comparable con la Diabetes Mellitus Tipo 1 en Humanos, siendo la administración de insulina vía subcutánea, el único tratamiento farmacológico viable, además de una dieta estricta junto con ejercicio.

Estudios poblacionales han reflejado que los dueños de estos animales al enterarse de su diagnóstico optan por la eutanasia de los caninos, lo cual nos hace replantear el uso de la nanotecnología como la ciencia encargada de manipular la materia a una escala casi atómica, para proponer una formulación de acción modificada y, junto a esto, se pueda considerar su administración por vía oral u otra, ya que esto facilitaría su dosificación tanto para el paciente canino como para el propietario e incluso su efecto terapéutico.

La fabricación de Liposomas por el método de calentamiento es una técnica fácil y económica que se plantea con el uso base de fosfolípidos y colato de sodio, en diferentes proporciones, e incluso la adición de algún otro excipiente como Polietilenglicol (PEG) 1500, Poloxamer 188, Brij S10 y Brij L23. Realizando la caracterización de Tamaño de Partícula, Índice de Polidispersión (Pdl) y Potencial Z, con el fin de comprobar la viabilidad de las nanopartículas, de acuerdo con la vía de administración y para estudios in vitro más adelante, sin dejar de lado la eficiencia de encapsulación de insulina en los liposomas.

Las formulaciones con Poloxamer 188 y Brij L23 presentan un tamaño de partícula aproximado de 110 - 150 d.nm, con un Pdl de 0.300 y un potencial Z alrededor de -30 mV, teniendo una eficiencia de encapsulación de Insulex R de 76% y 61%, respectivamente. Las características que tengan los liposomas dependen de los excipientes utilizados y las proporciones de estos.

Palabras clave: Diabetes Mellitus, caninos, liposomas, método de calentamiento, tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial Z, eficiencia de encapsulación.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus es un síndrome que pertenece a un grupo de enfermedades metabólicas, caracterizado por *hiperglucemia crónica* con alteraciones metabólicas de carbohidratos, lípidos y proteínas. Ocasionando defectos en: *la secreción de insulina, la acción de la insulina o la combinación de ambas*. Los síntomas característicos de la diabetes mellitus incluyen polidipsia, poliuria, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa. (American Diabetes Association [ADA], 2013; Gilor et al., 2016).

Una hiperglucemia grave conduce a complicaciones agudas, como el desarrollo de *cetoacidosis diabética* (potencialmente mortal), si no se trata de forma adecuada, esta consiste en la descomposición acelerada de la grasa corporal, siendo el hígado el responsable de convertir esta grasa en cetona produciendo la acidificación de la sangre. Por otro lado, la hiperglucemia crónica está asociada con complicaciones a largo plazo de disfunción y falla de diferentes órganos, entre ellos se encuentran: retinopatía con ceguera potencial, nefropatía que conduce a insuficiencia renal, neuropatía periférica con riesgo de ulceración en los pies, misma que conduce a la amputación de éstos; problemas gastrointestinales, disfunción sexual, así como, riesgo a largo plazo de desarrollar enfermedades cardiovasculares periféricas y cerebro vasculares. (ADA, 2013; Gilor et al., 2016).

3.1.1 Clasificación de la Diabetes Mellitus (DM) Humana

La clasificación etiológica de la DM describe cuatro tipos, según las posibles causas que originan esta enfermedad: diabetes tipo 1 (DMT1), diabetes tipo 2 (DMT2), diabetes gestacional (DG) y otros tipos de diabetes (OD) (*figura 1*), (ADA, 2013; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021).

1. DM tipo 1 (**Insulinodependiente** o juvenil): Se desconoce la causa de este tipo de diabetes la cual consiste en una respuesta errónea del sistema inmune, ya que destruye las células β del páncreas, mismas que son responsables de la producción de la insulina, causando así una deficiencia de esta hormona, siendo necesaria su administración diaria de por vida.

2. DM tipo 2 (**No insulinodependiente** o en la edad adulta): En donde el cuerpo no utiliza la insulina adecuadamente, generando una resistencia a la hormona, en un principio las células β producen insulina adicional para poder compensar, sin embargo, a través del tiempo el páncreas ya no produce suficiente insulina para mantener la glucosa en la sangre dentro de los niveles normales. Más del 95% de las personas que padecen diabetes

presentan el tipo 2, que se debe en gran medida al exceso de peso, la inactividad física y los malos hábitos alimenticios.

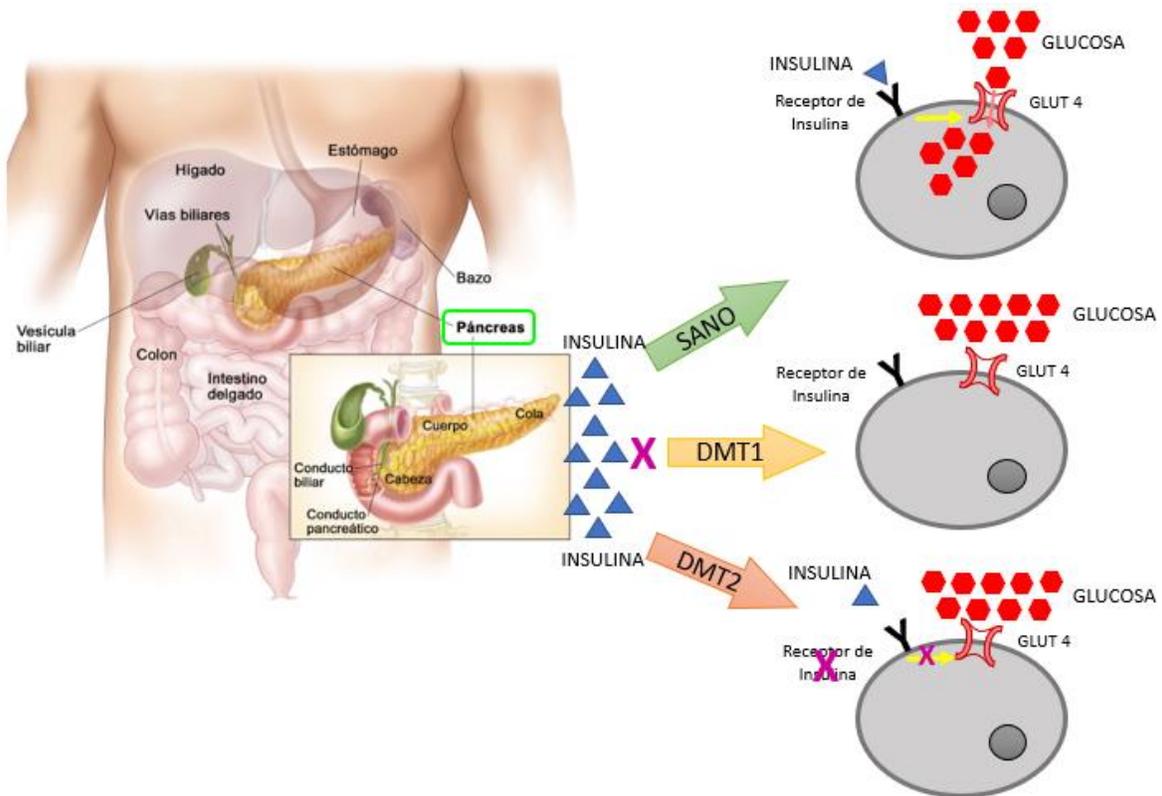


Figura 1: Esquematación de la acción de la insulina en pacientes Sanos, con DMT1 y DMT2.

(Modificado de: <https://nci-media.cancer.gov/pdq/media/images/644167-750.jpg>).

3.1.2 Diabetes Mellitus Canina

La Diabetes Mellitus en el área veterinaria es un trastorno endocrino espontáneo común en caninos, siendo afectados desde la mediana edad a geriátricos (mayores a 5 años). Se estima que la prevalencia de DM en la población canina oscila entre el 0.2% y el 1.2%, siendo aún mayor en razas genéticamente predispuestas como los: samoyedos, los terrier tibetanos, los cairn terriers, entre otros. (M. Moshref et al., 2019).

Las diferencias de razas caninas respecto a la susceptibilidad a la diabetes mellitus sugiere un componente genético a la patogenia de la enfermedad, debido a esto, se ha propuesto que la DM canina es más comparable a la forma tipo 1 de la enfermedad humana (DMT1), además de considerar que para su control es necesaria la administración exógena de Insulina, llevar una dieta estricta y el

ejercicio constante para proporcionar una mejor calidad de vida al paciente canino, (cuadro 1). (B. Catchpole et al., 2008).

Característica	DT1 humana	DM canino
Hiperglucemia persistente	+++	+++
Deficiencia de insulina	+++	+++
Hora de inicio	El 75% de la DT1 se diagnostica en niños <18 años	Edad media a geriátrica (>8 años)
Etiología	Autoinmunidad	Desconocido. Sin evidencia consistente de autoinmunidad
Histología	Marcada atrofia de los islotes con pérdida de células β e infiltración linfocítica (también conocida como insulinitis)	Marcada atrofia de los islotes con pérdida de células β , la insulinitis es un hallazgo poco común
Terapia	insulina de por vida	insulina de por vida
Complicaciones comunes	CAD	CAD
	enfermedad microvascular	Catarata
	Enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD)	retinopatía

Cuadro 1: Resumen comparativo de DM Tipo 1 humana y DM canina. (M. Moshref et al., 2019).

Sin embargo, se desconocen algunos factores que coincidan totalmente con la DMT1 Humana, es por esto que, en 2013, investigadores del Royal Veterinary College de Inglaterra propusieron una clasificación de la diabetes canina con base a las causas de la hiperglucemia, independientes al tratamiento con insulina que se necesita usar, (cuadro 2). (B. Catchpole et al., 2005; B. Catchpole et al., 2013).

Clasificación de la Diabetes Mellitus Canina	Descripción de la patogenia
Hiperglucemia por <i>deficiencia de insulina</i>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Destrucción de las células β ➤ Hipoplasia de células β ➤ Pérdida de células β asociada a lesiones exopancreáticas (necrosis)

	pancreática-pancreatitis)
	➤ Procesos ideopáticos
Hiperglucemia por <i>resistencia a insulina</i>	➤ Obesidad ➤ Secundaria respecto a otras endocrinopatías ➤ Diabetes gestacional ➤ Iatrogenia (administración de progestágenos sintéticos, glucocorticoides)

Cuadro 2: Clasificación de la DM canina de acuerdo con la Royal Veterinary College de Inglaterra, 2013. (B. Catchpole et al., 2013).

La DM canina se define por hiperglucemia persistente y deficiencia de insulina debido a la pérdida masiva de células β . Los signos clínicos de la deficiencia de insulina en perros son similares a las observadas en personas con diabetes e incluyen poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y letargo.

La concentración normal de glucosa en la sangre de perros oscila entre 60-100 mg/dL, si los valores se mantienen superiores a los 150mg/dL se considera diagnóstico de DMT1, por lo que el tratamiento con insulina exógena es de por vida, comúnmente con inyecciones subcutáneas que administra el propietario dos veces al día, dependiendo la dosis requerida. Una DM mal regulada puede conducir a la cetoacidosis diabética (CAD), un trastorno metabólico grave y potencialmente mortal, al igual que en humanos. (American Veterinary Medical Association [AVMA]; M. Moshref et al., 2019; O. Andrade et al., 2017).

3.1.3 Epidemiología y tratamiento de la Diabetes Mellitus Canina

Desafortunadamente, se cuenta con poca información epidemiológica que, de un panorama general de la situación actual de la DM presente en animales de compañía, tanto en perros como en gatos, ya que los felinos presentan una DM comparable con la DMT2 humana (*cuadro 3*).

Una base de datos de EE. UU. estima 2.5 millones de pacientes caninos, donde la prevalencia de DM en perros había aumentado en un 79.7% desde 2006, de acuerdo con un informe sobre el estado de salud de las mascotas (Benfield, 2016). En el 2012, considerando una población total de 70 millones de perros en EE. UU.,

al menos 165 000 de estos eran diabéticos. Sin embargo, una encuesta reciente a gran escala indicó que 1 de cada 10 perros diabéticos están siendo sacrificados en el momento de ser diagnosticados con DM y se esperaba que 1 de cada 10 más serían sacrificados dentro de un año, la población canina que logra sobrevivir después del diagnóstico de DM es de 3 años y la mayor mortalidad ocurre durante los primeros 6 meses. Por otro lado, se estima un gasto de \$1,400 MXN por mes solo en insulina, estimando un gasto anual total de ~ \$220 millones MXN. (AVMA, 2016; M. Moshref et al., 2019; O. Andrade et al., 2017).

Entre 2008 y 2009, un grupo de expertos de Reino Unido llevo a cabo una encuesta entre médicos veterinarios (MV) de áreas suburbanas y urbanas de EE. UU., Reino Unido e Irlanda, para conocer las decisiones de los dueños con mascotas diabéticas (gatos y perros), dicha encuesta fue puesta en línea para la recopilación de información sobre el impacto de esta enfermedad en animales de compañía, el compromiso de los propietarios con el tratamiento a seguir y, por ende, el financiamiento que conlleva esta enfermedad, además de la parte emocional significativa que influye en la decisión de mantener a los animales con tratamiento o solicitar su eutanasia. (Royal Veterinary College [RVC], University of London, 2010; S.J.M. Niessen et al. 2017).

Parámetro	Unidad	Valor	
		Gatos	Perros
Médicos que prescriben inyecciones de insulina dos veces al día	Porcentaje de médicos	82.9%	83.6%
Dosis inicial de insulina	UI/kg (media ± DE)	0.45 ± 0.31	0.60 ± 0.52
Número de pacientes que comenzaron con una nueva dieta en el momento del diagnóstico	Gatos o Perros	9 de 10	7 de 10
Número de pacientes que empezaron con tratamiento hipoglucemiantes oral en el momento del diagnóstico	Gatos o Perros	0 de 10	0 de 10

Cuadro 3: Descripción de los hábitos de tratamiento de DM en animales de compañía. (S.J.M. Niessen et al. 2017).

En total, 1192 veterinarios completaron dicha encuesta, donde se observa que los propietarios eran “*probablemente*” **41.8%** o “*definitivamente*” **26.7%** más propensos a elegir la terapia de inyección de insulina cuando los animales estaban asegurados, por otro lado, el **31.2%** “*probablemente*” o **57.5%** “*definitivamente*” preferían elegir las inyecciones de insulina cuando ellos mismos, sus familiares o amigos cercanos eran personas diabéticas. Otros factores considerados por los MV de “*gran importancia*” para tomar la decisión de sacrificar o no a los animales con DM eran en primer lugar: **45%** *enfermedad concurrente*, **44%** *costo del tratamiento*, **37%** *la edad del animal*, **35%** *problemas para obtener un control adecuado*, **35%** *bienestar de la mascota*, **32%** *el impacto considerable en el estilo de vida del propietario* y **17%** *problemas en la administración de la inyección*. (S.J.M. Niessen et al. 2017).

Finalmente, otra de las preguntas más importantes se refiere a la gran importancia que tiene el cumplimiento por parte del propietario respecto a los cuidados que requieren los animales de compañía con DM. Donde el **28%** *de los propietarios no siguen el protocolo de alimentación*, el **17%** *de los propietarios tienen dificultades para inyectar*, el **15%** *de los gatos tienen dificultades para ser inyectados*, el **12%** *de la administración no es dada en el momento adecuado*, el **9%** *tiene un almacenamiento inapropiado del medicamento* y el **8%** *de los perros generan dificultades para ser administrados*. (S.J.M. Niessen et al. 2017).

3.2 Insulina

La Insulina se incorpora en 1922, por parte de los Doctores: Frederick G. **Banting**, Charles H. **Best**, John J. R. **Macleod** y James **Collip**, investigadores de la Universidad Toronto quienes fueron los primeros en demostrar una respuesta fisiológica a la insulina animal canina inyectada en un paciente con DMT1. Sin embargo, fue hasta 1955 cuando la proteína de la insulina es completamente secuenciada. Consta de 51 aminoácidos dispuestos en dos cadenas, una cadena A de 21 aa y una cadena B de 30 aa, las cuales están unidas por dos enlaces disulfuro, el primero en el aa 7 de ambas cadenas y el segundo en el aa 20 de la cadena A y aa 19 de la cadena B, (figura 2). La proinsulina es el precursor de la insulina, se transporta al aparato de Golgi de las células β del páncreas, donde es procesada y empaquetadas en gránulos. La proinsulina, un péptido monocatenario de 86 aa, se escinde en insulina y péptido C (un péptido conector), ambos se secretan en porciones equimolares en las células β tras la estimulación de la glucosa y otros secretagogos de insulina. Si bien el péptido C no tiene una función fisiológica conocida, se puede medir para proporcionar una estimación de la secreción de insulina endógena. (A. de Leiva et al., 2011; T. Donner y S. Sarkar, 2019).

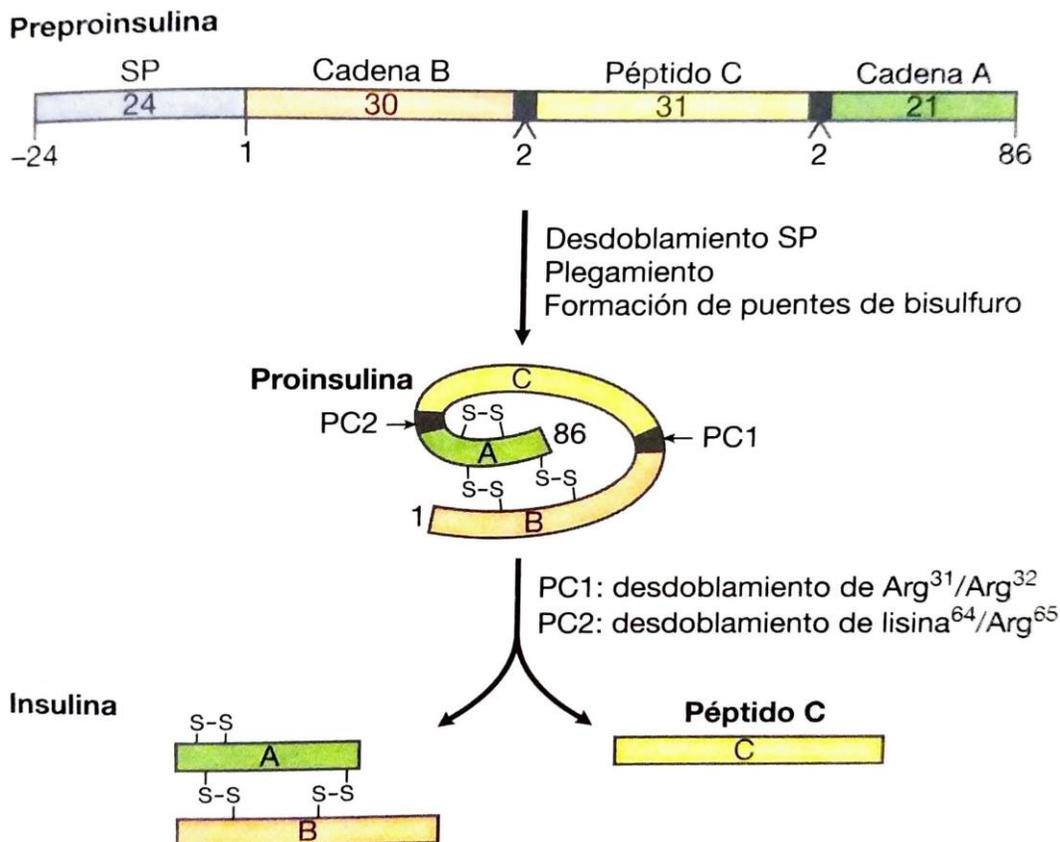


Figura 2: Síntesis y procesamiento de la Insulina. (R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008).

3.2.1 Clasificación de la Insulina

En la década de 1980, se pone a disposición la insulina huma mediante tecnología de ADN recombinante, por lo que el uso de insulina animal disminuyó drásticamente, de hecho, la FDA prohibió la comercialización de la insulina de res y cerdo en EE UU, aunque se permite la importación de insulina bovina o porcina a países extranjeros, sólo si el paciente no puede ser tratado con insulina humana. (Research, 2019). Actualmente, las insulinas utilizadas son de origen Humano y/o Análogos de la Insulina Humana, la tecnología de ADN recombinante para esta última consta de la implantación del gen de la proinsulina humana en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de cerveza) o en una cepa no patógena de *Escherichia coli*, que sirven como organismos de producción donde se aísla y purifica la insulina humana. (T. Donner y S. Sarkar, 2019).

Por otro lado, los análogos de la insulina humana consisten en modificaciones en la estructura de la molécula de la insulina para alterar sus propiedades farmacocinéticas (figura 3), afectando principalmente la absorción del principio activo en el tejido subcutáneo, por lo que su administración debe ser ≤ 15 min. antes de los alimentos. (R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008). La región de aminoácidos (aa) en la posición 26 a la 30 de la cadena B y 21 de la cadena A, en la molécula de la insulina, no son críticos para su reconocimiento por el receptor de insulina en las células, es por lo que en esta región se generan las sustituciones de aa: (T. Donner y S. Sarkar, 2019).

- La inversión de los aminoácidos en posición 28 y 29 en la cadena B “**lispro**” o la sustitución de un aspartato por prolina en la posición 28 de la cadena B “**insulina aspártica**”, proporciona a los análogos una menor tendencia para la asociación molecular y una acción más rápida.
- Sin embargo, una modificación de aspartato, en la posición 3 de la cadena B por lisina y la lisina de la posición 29 de la cadena B por glutamina, forma la insulina “**glusilina**” con un índice de acción más rápido y una duración de acción más corta.
- Por otro lado, la sustitución de una glicina en lugar de una asparagina en la posición 21 de la cadena A y la adición de dos moléculas de arginina en la cadena B en la posición 31 y 32, genera la insulina “**glargina**”, la cual tiene menor solubilidad a un pH de 7.4, por lo que se absorbe con mayor lentitud y actúa por un periodo más prolongado.
- Finalmente, la eliminación de una treonina en la posición 30 de la cadena B y la adición de un grupo miristoilo a un grupo ϵ amino en la lisina de posición 29 de la cadena B, forma la insulina “**detemir**” la cual incrementa la unión reversible a la albúmina, con la que se reduce el transporte a

través del endotelio vascular hacia los tejidos con duración de acción más prolongada.

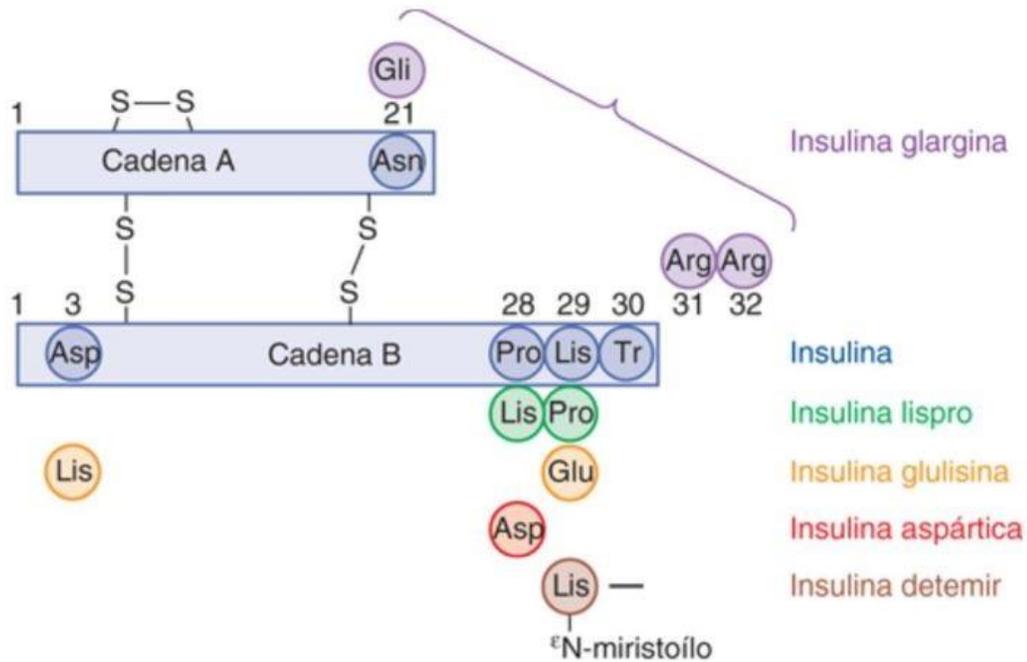


Figura 3: Análogos de la insulina. (R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008; T. Donner y S. Sarkar, 2019).

Las formulaciones de la insulina se clasifican respecto a su acción (cuadro 4): *insulina de acción corta* e *insulina de acción prolongada*. En la primera categoría se encuentran las insulinas *aspárticas*, *glulisina*, *lispro* y la *insulina regular* (insulina humana). Por otro lado, las insulinas de acción prolongada están formadas por *detemir*, *glargina* e *insulina NPH* (insulina neutral protamina de Hagedorn o mejor conocida como insulina isofana), siendo esta última una suspensión de complejos naturales de insulina con zinc y protamina en un amortiguador de fosfatos, lo cual le da su apariencia turbia-blanquecina. Esta formulación hace que se disuelva de manera gradual cuando es inyectada por vía subcutánea prolongando su acción. (A. de Leiva et al., 2011; R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008; T. Donner y S. Sarkar, 2019).

También existen otras formulaciones de insulina donde se encuentran combinaciones de las mencionadas anteriormente, por ejemplo: insulina NPH/regular en proporciones 70:30, insulina lispro/protamina y protamina/lispro en proporción 50/50 y 75/25 respectivamente, además de, aspártica/protamina en 70/30.

Clasificación	Preparación	Inicio (h)	Tiempo de Acción	
			Concentración máxima (h)	Duración efectiva (h)
<i>Acción corta</i>	Aspártica	<0.25	0.5 a 1.5	3 a 4
	Glulisina	<0.25	0.5 a 1.5	3 a 4
	Lispro	<0.25	0.5 a 1.5	3 a 4
	Regular	0.5 a 1.0	2 a 3	4 a 6
<i>Acción prolongada</i>	Detemir	1 a 4	- ^a	20 a 24
	Glargina	1 a 4	- ^a	20 a 24
	NPH	1 a 4	6 a 10	10 a 16
<i>Combinaciones de insulina</i>	75/25 75% protamina 25% lispro	<0.25	1.5	Hasta 10 a 16
	70/30 70% aspártica 30% protamina	<0.25	1.5	Hasta 10 a 16
	50/50 50% lispro 50% protamina	<0.25	1.5	Hasta 10 a 16
	70/30 70% NPH 30% insulina regular	0.5 a 1	Dual ^b	Hasta 10 a 16

Cuadro 4: Propiedades de las formulaciones de insulina. ^a Detemir y Glargina tienen mínima actividad en pico, ^b Doble, tiene dos picos: uno a las 2 a 3 h y el segundo varias horas más tarde. ((R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008).

3.2.2 Acción de la Insulina

Prácticamente, en todos los tipos de mamíferos se expresan los receptores de insulina, siendo los tejidos más importantes para la regulación de la glucosa sanguínea el hígado, músculo estriado, tejido adiposo y regiones específicas del encéfalo, así como los islotes pancreáticos.

Las acciones de la insulina son anabólicas y la señalización de esta hormona favorece la captación, uso y almacenamiento de la glucosa, lípidos y aminoácidos, estimulando la glucogénesis, lipogénesis y la síntesis de proteínas, a la par inhibe el catabolismo de estos. (J.A. Olivares y A. Arellano, 2008).

La acción de la insulina se transmite a través de un receptor de tirosina cinasa. El cual está compuesto por dímeros de subunidades α/β que son productos de un solo gen; los primeros se unen por enlaces de membrana para formar una glucoproteína heterotetramérica compuesta por dos subunidades α extracelulares y dos subunidades β que abarcan la membrana. Las subunidades α inhiben la actividad intrínseca de tirosina cinasa de las subunidades β . La unión de insulina a las subunidades α libera esta inhibición y permite la transformación de una subunidad β por otra y la autofosforilación en sitios específicos, de una región de yuxtamembrana a la cola intracelular del receptor. La actividad del receptor de insulina inicia la señalización mediante la fosforilación de un grupo de proteínas intracelulares como los sustratos para los receptores de insulina (IRS) y proteínas que contiene homología 2 con Src (Shc). Los IRS interactúan con los receptores que amplifican y extienden la cascada de señalización. (J.A. Olivares y A. Arellano, 2008; R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008).

La acción de la insulina en el transporte de glucosa depende de la activación de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). La PI3K se activa por interacción con proteínas IRS y genera fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato (PIP3), el cual regula la localización y actividad de varias cinasas, incluida Akt, isoformas atípicas de la proteína cinasa C (PKC ζ y λ/τ) y el blanco de la rapamicina para mamíferos (mTOR, mammalian target of rapamycin). La isoforma Akt2 parece controlar los pasos subsiguientes, que son importantes para la captación de glucosa en el músculo estriado y en el tejido adiposo, y para regular la producción de glucosa en el hígado. Los sustratos Akt2 coordinan la traslocación del transportador 4 de la glucosa (GLUT4) hacia la membrana plasmática, a través de un proceso que involucra la remodelación de la actina y de los otros sistemas de tráfico en la membrana. La acción de pequeñas proteínas G, como Rac y TC10 también se han implicado en la remodelación de actina, que es necesaria para la traslocación de GLUT4. En estado basal, la mayor parte de GLUT4 reside en el espacio intracelular; después de la activación de los receptores de insulina, GLUT4 se desplaza con rapidez y en abundancia hacia la membrana plasmática, donde facilita el transporte de glucosa al interior de la

célula desde la circulación. La señalización de la insulina también reduce la endocitosis de GLUT4, incrementando el tiempo de residencia de la proteína en la membrana plasmática. Después de la difusión facilitada al interior de las células siguiendo un gradiente de concentración, la glucosa se fosforila a glucosa-6-fosfato por acción de la hexocinasa. La hexocinasa II se encuentra asociada con GLUT4 en el músculo estriado y cardíaco, así como en el tejido adiposo. Al igual que GLUT4, la hexocinasa II es regulada por transcripción a través de la insulina. La glucosa-6-fosfato puede isomerizarse a glucosa-1-fosfato y almacenarse en forma de glucógeno (la insulina incrementa la actividad de la síntesis de glucógeno); la glucosa-6-fosfato puede entrar a la vía glucolítica (a través de la producción de ATP) y a la vía de las pentosas (figura 4). (J.A. Olivares y A. Arellano, 2008; R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008).

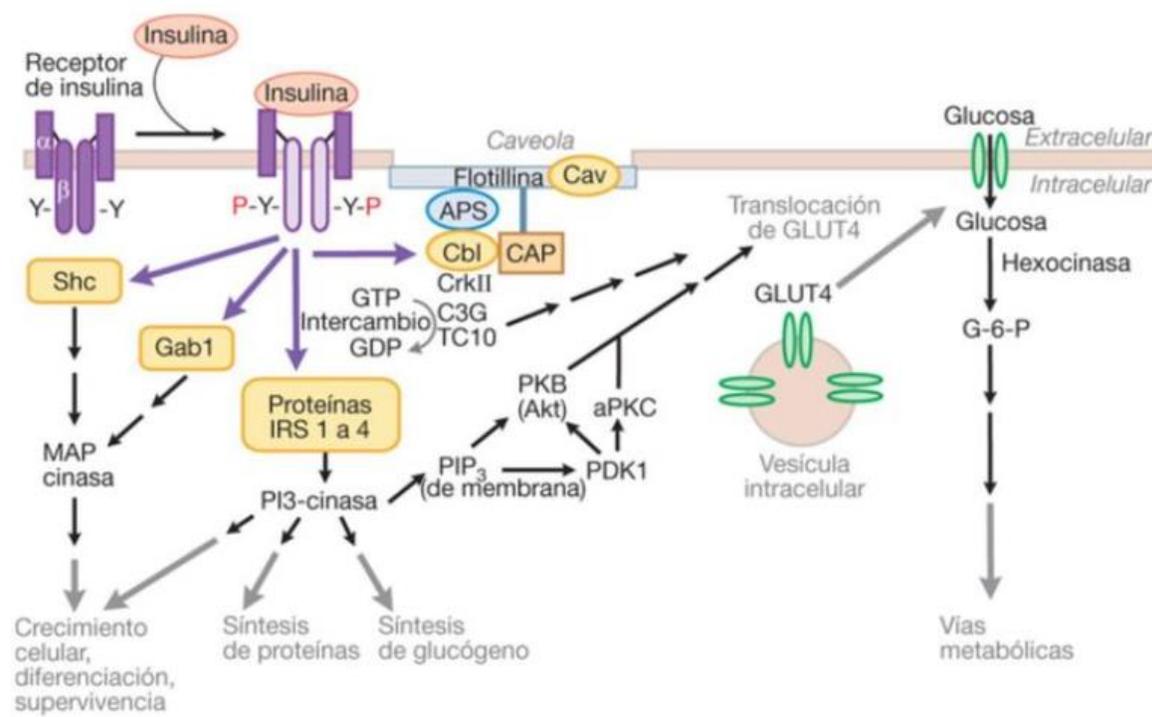


Figura 4: Vía de señalización de la insulina. (R.H. Dandan y L.L. Brunton, 2008).

3.3 Liposomas

La microencapsulación consiste en proporcionar una cubierta a la molécula o al API de interés, que le dé estabilidad, protección y garantice su absorción, así permitir su dosificación en el sitio de acción de interés. (M. Sandoval et al. 2017).

Los liposomas fueron descubiertos por primera vez en la década de 1960 por el hematólogo británico Dr. Alec D. Bangham y sus colaboradores, en el Instituto Babraham de la Universidad de Cambridge, del cual se publica el primer informe en 1964. (B. Almeida et al., 2020).

Los liposomas son estructuras esféricas huecas (vesículas), conformada por una o más bicapas de fosfolípidos que encapsulan un núcleo acuoso, en donde, generalmente se encuentra el principio activo de interés. Son biodegradables, biocompatibles, no tóxicos y no inmunogénicos. (D. Guimarães et al., 2021). Los liposomas pueden transportar sustancias hidrofílicas en la cavidad interna acuosa, compuestos hidrofóbicos en la membrana de fosfolípidos y moléculas anfifílicas en la interfaz agua-bicapa (figura 5). (C. Sebaaly et al., 2016).

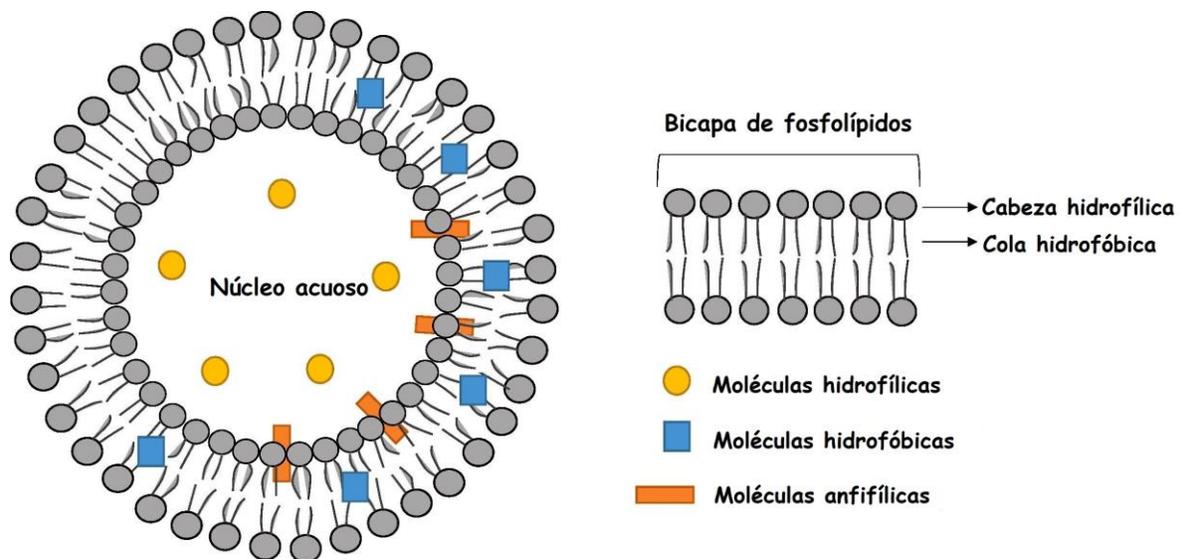


Figura 5: Representación de la estructura general de los liposomas, cargados de moléculas de acuerdo con su solubilidad; **Moléculas hidrofílicas** en el núcleo acuoso interno, **Moléculas hidrofóbicas** en la bicapa lipídica y **Moléculas anfifílicas** en la interfase agua/bicapa lipídica. (D. Guimarães et al., 2021).

Los liposomas son Nanopartículas (NP) con un tamaño general de 100 a 500 nm de diámetro, fabricadas por el autoensamblaje de fosfolípidos como lo es la α -fosfatidilcolina de soja, sin embargo, los liposomas pueden ser susceptibles a modificaciones en su superficie que mejoren su eficacia y aseguren su llegada al

sitio diana de interés, un ejemplo de estas modificaciones es la adición de PEG en la superficie de los liposomas, el cual protege a las NP del aclaramiento renal, aumentando su tiempo en circulación, además, aumenta la hidrofilia del liposoma y por consiguiente su estabilidad en medios acuosos (figura 6). (D. Guimarães et al., 2021).

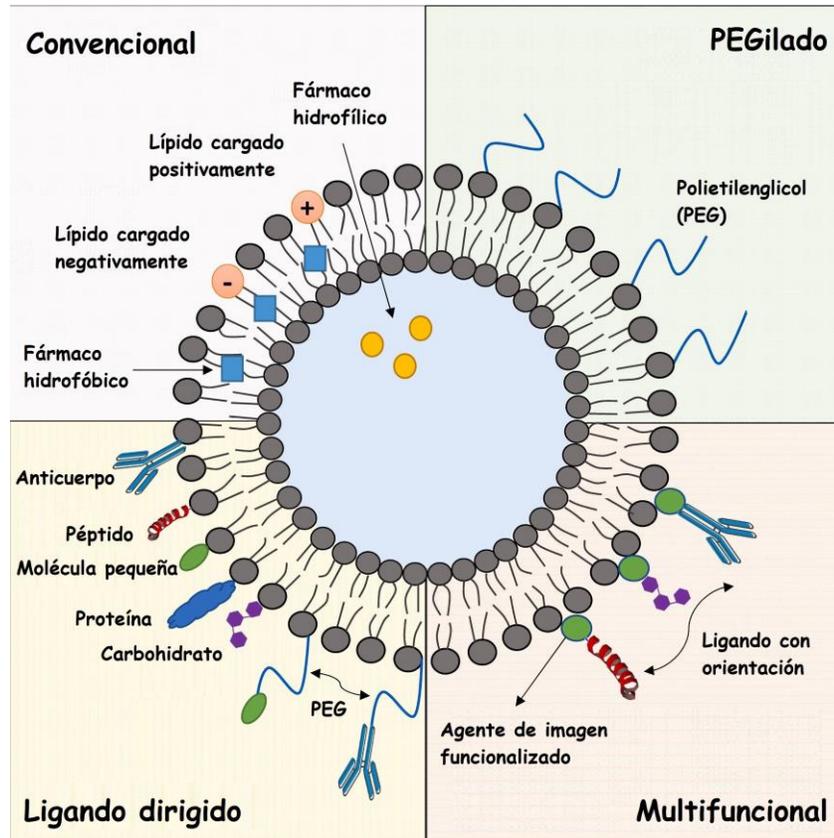


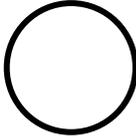
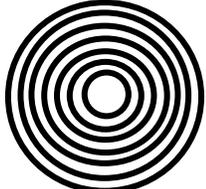
Figura 6: Modificaciones estructurales a los liposomas para ayudar a su estabilidad y/o especificidad. (D. Guimarães et al., 2021).

La clasificación de los liposomas se basa en su tamaño y el número de bicapas que los conforman (cuadro 5), (A. Hernández, 2017).

- Vesículas multilaminares (MLV)
- Vesículas Unilaminares (UV)
 - Vesículas Unilaminares Grandes (LUV)
 - Vesículas Unilaminares Pequeñas (SUV)

Sin embargo, la FDA clasifica los liposomas en dos tipos:

- Convencionales: son preparados de forma neutral con lípidos aniónicos, generando una interacción no específica en su entorno, son ligeramente inestables y por consiguiente, su capacidad de transporte es baja, por otro lado, pierden su forma al entrar en contacto con el plasma y es por eso que se les añade colesterol para incrementar su estabilidad.
- No convencionales: son de tamaño pequeño y modificados para reducir su carga negativa y hacerlos resistentes a la fagocitosis. Son liposomas polimerizados, generalmente con PEG, aumentando su estabilidad.

Número de bicapas	Abreviatura	Diámetro	Propiedades
Unilaminares (liposomas formados por una única bicapa lipídica)	SUV (vesículas unilaminares de pequeñas dimensiones) 	20-80 nm	- Debido a su elevado radio de curvatura, una elevada proporción de fosfolípidos se halla en la monocapa externa. - Presentan una importante relación superficie/lípido. - Dado que el porcentaje de encapsulación es bajo, no se recomienda para moléculas hidrosolubles.
	LUV (vesículas unilaminares de grandes dimensiones) 	80 nm – 1µm	- Presentan una elevada capacidad de encapsulación. - El elevado volumen del compartimiento interno permite la encapsulación de moléculas hidrosolubles con eficacia.
Plurilaminares (liposomas formados por varias bicapas)	MVL (vesículas multilaminares) 	400 nm – varios µm	- Existen variantes de MLV, tales como: * REV (vesículas de evaporación de fase inversa) 

			<p>* SPLV (vesículas plurilamelares estables)</p> 
			<p>* MVL (liposomas multivesiculares)</p> 

Cuadro 5: Clasificación de los Liposomas. (M. Torelló et al., 2002).

4. HIPÓTESIS

Los prototipos de liposomas cargados con insulina de liberación modificada que incluyan en su formulación: PEG 1500, Poloxamer 188, Brij S10 y Brij L23, mejorarán sus características tales como tamaño de partícula, índice de polidispersión (Pdl) y potencial Z, así como su porcentaje de eficiencia de encapsulación con respecto a publicaciones previas.

5. OBJETIVO

Obtener el diseño de un prototipo de formulaciones de liposomas cargados con insulina de liberación modificada, los cuales serán caracterizados para seleccionar los mejores modelos para el tratamiento de Diabetes Mellitus Tipo 1 para uso veterinario.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar la metodología a emplear, para asegurar tener liposomas con características ideales de acuerdo con la vía de administración.
- 2) Caracterizar los liposomas mediante la determinación de: tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z.
- 3) Valorar el porcentaje de encapsulamiento, utilizando el Kit Pierce BCA Protein Assay para cuantificar la cantidad de insulina libre y así obtener el porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE).

6. METODOLOGÍA

6.1 Material

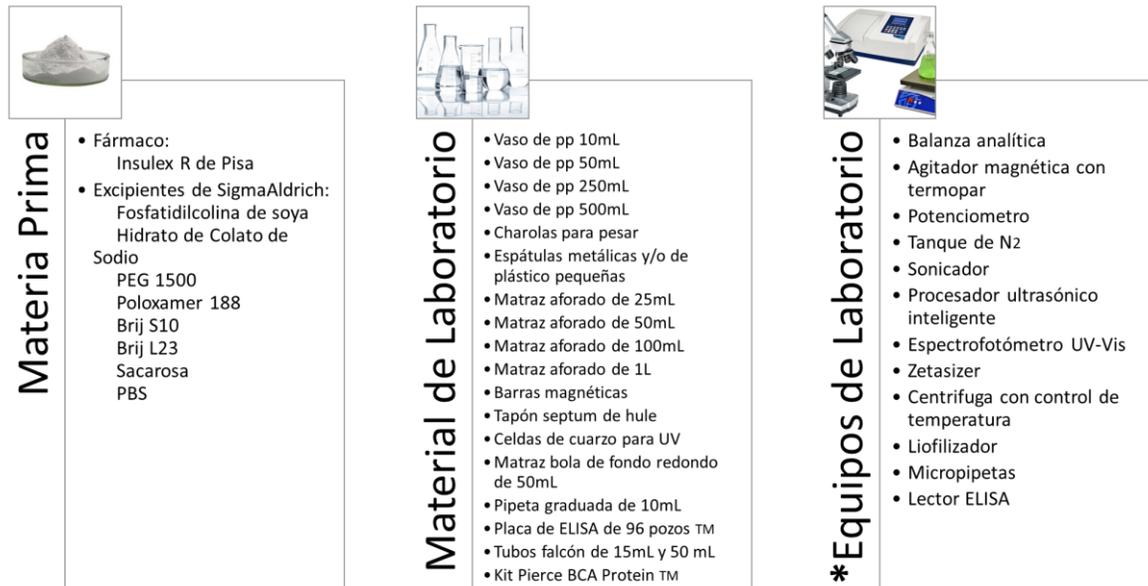


Figura 7: Esquema agrupando Materias primas, Material de Laboratorio y Equipos de Laboratorio utilizados durante el Desarrollo de Prototipos de Liposomas cargados con Insulina.

6.1.1 Materia Prima:

6.1.1.1 Fosfatidilcolina

Nombre comercial: L- α -Fosfatidilcolina de soya

Laboratorio: Sigma Aldrich

Sinónimo: Lecitina, fosfatidilcolina, fosfolípido

CAS: 8002-43-5

Peso molecular: 776 g/mol

Fuente de origen: Soya

Apariencia: Cera de color amarillo-naranja

Temperatura de almacenamiento: -20°C

Pureza: $\geq 30\%$

Se trata de una mezcla compleja de fosfolípidos y triglicéridos, algunos de fosfolípidos más comunes son la fosfatidilcolina y fosfacatidiletanolamina, aunque también se pueden encontrar inositol, serina y ácido fosfatídico.

La Lecitina está constituido por un esqueleto de glicerol esterificado por el ácido fosfórico en la posición C3 (carbono 3, en orden creciente), el cual a su vez está unido con la colina el cual le dará el nombre al fosfolípido, por otro lado, en la posición C1 se encuentra mayoritariamente el ácido esteárico y en posición C2, se encuentran los ácidos grasos insaturados de 18 Carbonos, como son oleico, linoleico o linolénico, (figura 8). (M. Brandl, 2001, R.C. Rowe et al., 2009; S. Furse y A.I.P.M. de Kroon, 2015).

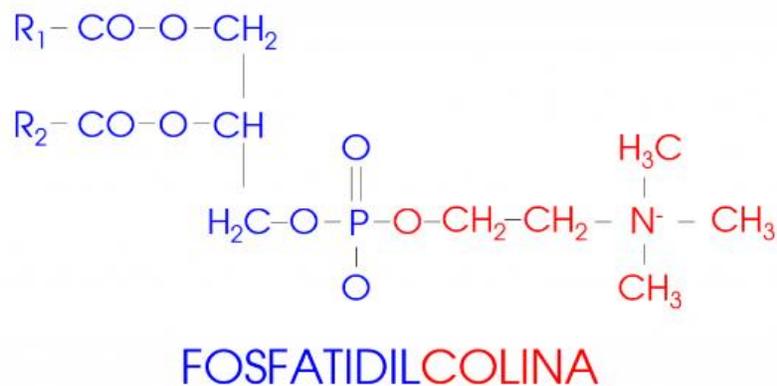


Figura 8: Estructura química de la Fosfatidilcolina. (EQUISALUD.com).

Los fosfolípidos pueden ser obtenidos de la purificación de fuentes naturales como huevo o soya e incluso sintetizados químicamente. Son moléculas anfifílicas y son las principales componentes de las membranas celulares, siendo capaces de autoasociarse y formar una variedad de estructuras como son micelas o liposomas, un gran número de formulaciones farmacéuticas utilizan los fosfolípidos para formar liposomas unilaminares o multilaminares. No obstante, existen fosfolípidos modificados que mejoran las propiedades de los liposomas, algunos ejemplos de estas modificaciones es la unión covalente del PEG a los fosfolípidos o PEGilación, lo cual proporciona un obstáculo estérico a la superficie de los liposomas dando como resultado a la disminución de su absorción fagocítica por el sistema reticuloendotelial y una vida media mayor en circulación al ser administrado por vía intravenosa, otro ejemplo es la conjugación de anticuerpos formando inmunoliposomas, los cuales son capaces de dirigirse específicamente a las células. Los fosfolípidos son estables si están protegidos del Oxígeno, calor y luz. Su toxicidad es de mínima a nula. (M. Brandl, 2001, R.C. Rowe et al., 2009; S. Furse y A.I.P.M. de Kroon, 2015).

6.1.1.2 Hidrato de Colato de Sodio

Nombre comercial: Hidrato de Colato de Sodio

Laboratorio: Sigma Aldrich

Sinónimo: Sal de sodio del ácido colálico

CAS: 206986-87-0

Peso molecular: 448.576 g/mol

Apariencia: Polvo blanco

Temperatura de almacenamiento: 25°C

Es un agente detergente no desnaturizante utilizado para la extracción de proteínas de membrana. Proviene del ácido biliar derivado del colesterol, formado por 24 Carbonos dihidroxilados o trihidroxilados, se caracteriza por tener en el C17 una cadena alifática ramificada de 5 Carbonos, con la cual forma un anillo pentanoperhidro fenantreno con un grupo carboxilo terminal en el cual se encuentra unido el sodio, (figura 9). (D. Voet y J. Voet, 2006; R.C. Rowe et al., 2009).

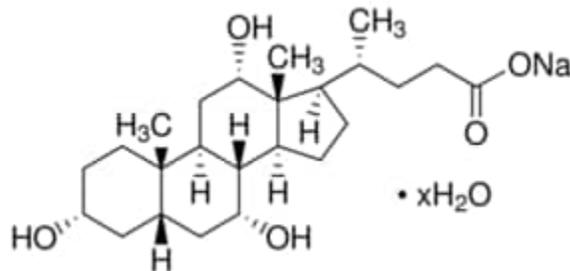


Figura 9: Estructura química del Hidrato de colato de sodio. (SigmaAldrich.com).

6.1.1.3 Polietilenglicol 1500

Nombre comercial: Desconocido

Laboratorio: Desconocido

Sinónimo: PEG, Pluriol E, Lipoxol

CAS: Desconocido

Peso molecular: 1500 g/mol

Apariencia: Laminas de color blanco traslúcido

Temperatura de almacenamiento: 25°C

Se trata de un poliéter con formula general $\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_m\text{CH}_2\text{OH}$, donde **m** (figura 10) representa el número promedio de grupos oxietileno, además este número indica el peso molecular medio del polímero, (cuadro 6). Los polietilenglicoles son ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas, como son, tipo parenteral, tópica, orales, rectales o incluso preparaciones oftálmicas, también en matrices poliméricas biodegradables en sistemas de liberación controlada.

Los PEG son estables e hidrófilos, no causan irritación a la piel, pero pueden penetrarla fácilmente; aunque, al ser solubles en agua se pueden eliminar fácilmente mediante un lavado. Generalmente son considerados no tóxicos y materiales no irritantes, sin embargo, se han reportado reacciones adversas relativamente bajas a los polietilenglicoles de bajo peso molecular (A.A. D'souza y R. Shegokar, 2016; R.C. Rowe et al., 2009).

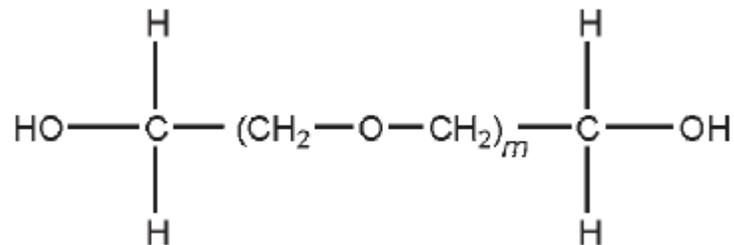


Figura 10: Estructura química general del Polietilenglicol. (R.C. Rowe et al., 2009).

Clasificación	m	Peso molecular promedio	DL₅₀ (g/kg) en Rata vía Oral
PEG 200	4.2	190 – 210	28.0
PEG 300	6.4	285 – 315	27.5
PEG 400	8.7	380 – 420	-
PEG 540 (mezcla)	-	500 – 600	-
PEG 600	13.2	570 – 613	38.1
PEG 900	15.3	855 – 900	-
PEG 1000	22.3	950 – 1050	32.0
PEG 1450	32.5	1300 – 1600	-

PEG 1500	28.0 - 36.0	1300 – 1600	44.2
PEG 2000	40.0 - 50.0	1800 – 2200	-
PEG 3000	60.0 - 75.0	2700 – 3300	-
PEG 3350	75.7	3000 – 3700	-
PEG 4000	69.0 - 84.0	3000 – 4800	50.0
PEG 4600	104.1	4400 – 4800	-
PEG 8000	181.4	7000 – 9000	-

Cuadro 6: Nomenclatura de los polietilenglicoles típicos con sus pesos moleculares y dosis letal 50 vía oral en ratas. (R.C. Rowe et al., 2009).

6.1.1.4 Poloxámero

Nombre comercial: Poloxámero 188

Laboratorio: Sigma Aldrich

Sinónimo: Lutrol, Plurónico, Supronic

CAS: 9003-11-6

Peso molecular: 162.23 g/mol

Apariencia: Gránulos color blanco opaco

Temperatura de almacenamiento: 25°C

Se trata de un polímero conformado por tres bloques compuestos de una cadena hidrofóbica central (polipropileno), y a sus lados por dos cadenas hidrofílicas (polietileno), con fórmula general $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, (figura 11). La variación de la longitud y a su vez del peso molecular del polímero, da lugar a diferentes clases que se diferencian de acuerdo con letras y números, la letra indica el estado físico del poloxámero, como son: P (pasta), F (flake en inglés u hojuela) y L (líquido), el primer y/o el segundo número al ser multiplicado por 1000 da el peso molecular en Daltons (Da) y el último número indica el porcentaje en peso del bloque hidrofílico, (cuadro 7). (J.E. Hernández y E. Rivera).

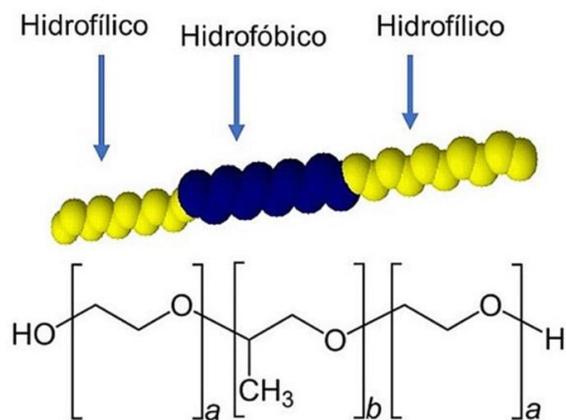


Figura 11: Estructura química general del Poloxámero. (cyd.conacyt.gob.mx).

Poloxámero	Forma física	a	b	Peso molecular promedio (Da)
124	Líquido	12	20	2 090 – 2 360
188	Sólido	80	27	7 680 – 9 510
237	Sólido	64	37	6 840 – 8 830
338	Sólido	141	44	12 700 – 17 400
407	Sólido	101	56	9 840 – 14 600

Cuadro 7: Nomenclatura de Poloxámero típicos. (R.C. Rowe et al., 2009).

Los poloxámeros son copolímeros no iónicos de polioxietileno-polioxipropileno utilizados principalmente en las formulaciones farmacéuticas como emulsionantes o agentes solubilizantes y estabilizantes, (cuadro 8). Todos los poloxámeros son químicamente similares en composición, diferenciándose en las cantidades relativas de óxidos de propileno y etileno. El poloxámero 188 también se ha utilizado como agente emulsionante para fluorocarbonos utilizados como sustitutos artificiales de la sangre y en preparaciones de sistemas de dispersión de sólidos Funciona como agente dispersante, emulsificante, solubilizante, así como lubricante y humectante en tabletas. (R.C. Rowe et al., 2009).

Uso	Concentración %
<i>Emulsionante de grasa</i>	0.3
<i>Solubilizante de sabor</i>	0.3
<i>Emulsionante de fluorocarbono</i>	2.5
<i>Agente felificante</i>	15 – 50
<i>Agente esparcidor</i>	1
<i>Agente estabilizador</i>	1 – 5
<i>Base de supositorios</i>	4 – 6 o 90
<i>Recubrimiento de tabletas</i>	10
<i>Excipiente de tabletas</i>	5 – 10
<i>Agente humectante</i>	0.01 – 5

Cuadro 8: Uso de los Poloxámeros y sus concentraciones. (R.C. Rowe et al., 2009).

6.1.1.5 Éteres de Alquilo de Polioxietileno

Nombre comercial

Brij® S10

Brij® L23

Laboratorio	Sigma Aldrich	Sigma Aldrich
Sinónimo	Polietilenglicol octadecil éter, Polioxietileno (10) lauril éter	Brij® 35 P, Polioxietileno (23) lauril éter
CAS	9005-00-9	9002-92-0
Peso molecular	711 g/mol	1198 g/mol
Apariencia	Pasta color blanco opaco	Lentejas color blanco opaco
Temperatura de almacenamiento	25°C	25°C

Cuadro 9: Especificaciones de cada excipiente utilizado en las formulaciones de liposomas.

Los éteres de alquilo de polioxietileno son tensoactivos no iónicos producidos por la polietoxilación de alcoholes grasos lineales, su fórmula estructural es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_x(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_y\text{OH}$, donde $(x+1)$ es el número de átomos de carbono en la cadena de alquilo, como son:

12 lauril (dodecil)

14 miristilo (tetradecil)

16 cetilo (hexadecil)

18 estearílico (octadecil)

mientras que, y es el número de grupos de óxido de etileno en la cadena hidrofílica, generalmente entre 10-60.

Los éteres de polioxietileno de alquilo tienden a ser mezclas de polímeros de pesos moleculares ligeramente variables, son ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas tópicas y cosméticas, principalmente como agentes emulsionantes para emulsiones de agua en aceite y aceite en agua, para la estabilización de microemulsiones y emulsiones múltiples. También se utilizan como agentes solubilizantes para aceites esenciales, productos químicos de perfumería, aceites vitamínicos e incluso medicamentos. Los éteres de alquilo de polioxietileno, especialmente Lauril 23, han sido utilizado como solubilizante y agente de recubrimiento para proporcionar hidrofiliidad a nanopartículas poliméricas, mientras que los polidocanoles son adecuados para su uso en formulaciones inyectables como solubilizantes o dispersantes. En cuanto a su toxicidad son considerados no tóxicos ni irritantes si se usan en concentraciones bajas, solo en caso de usar altas concentraciones (>20%) pudieran presenta alguna irritación y en estudios con animales, se sugiere una toxicidad por vía oral similar a la de otros tensoactivos. (R.C. Rowe et al., 2009).

6.1.2 Material de Laboratorio:

6.1.2.1 Kit Pierce™ BCA Protein Assay

Absorbancia a una longitud de onda de 562 nm y una variación de lectura de proteína a proteína de 1.08 para el caso de Insulina. La curva de calibración da un intervalo de concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ a 2000 $\mu\text{g/mL}$. (Thermo Fisher Scientific).



Figura 12: Kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific).

6.1.3 Equipos de Laboratorio:

- ✓ AGITADOR MAGNÉTICO: Ceramag Midi, IKA, Modelo 03.168072, Laboratorio 120 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ BALANZA ANÁLITICA 1: Adventurer OHAUS, Modelo AR2140, Laboratorio 120 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ BALANZA ANÁLITICA 2: Balanza electrónica BIOBASE, Modelo BA2204C, Laboratorio 307 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ CENTRIFUGA 1: Right Refrigerated Centrifuge Modelo 1-1, Laboratorio 2207 del Edificio 2, FMVZ-UNAM
- ✓ CENTRIFUGA 2: de alta Velocidad BIOBASE, Modelo BKC-TH1811, Laboratorio 307 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ CENTRIFUGA 3: Intelligent High Speed Refrigerated Centrifuge, Modelo BKC-TH16III, Laboratorio 307 del Edificio F, FQ-UNAM

- ✓ COLORÍMETRO DIFERENCIAL DE BARRIDO: Mettler Toledo, Modelo DSC1/700, de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), FQ-UNAM
- ✓ ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS 1: Ocean Optics, Modelo S2000, Laboratorio 121 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ ESPECTROFOTOMETRO UV-VIS 2: HP, Modelo Agilent 8453, Laboratorio 100 del Edificio B del área de posgrado, FQ-UNAM
- ✓ LECTOR DE ELISA: Actgene, Modelo AMPR750A, Laboratorio de Inmunología de UNIPREC, FQ-UNAM
- ✓ LIOFILIZADORA: LABCONCO, Laboratorio 118 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ POTENCIOMETRO: Thermo, Modelo Orion 3 Star pH Benchtop, Laboratorio 120 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ SONICADOR: Cole-Parmer, Modelo 8890, Laboratorio 118 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ TERMOPAR: IKA, Modelo ETS-D4 fuzzy, Laboratorio 120 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ ULTRASONICADOR: Ultrasonic Homogenizer, Modelo JY92-IIN, Laboratorio 120 del Edificio F, FQ-UNAM
- ✓ ZETASIZER: Malvern Nano ZS, Modelo ZEN 3600, Laboratorio 121 del Edificio F, FQ-UNAM

6.2 Procedimiento

6.2.1 Preparación de Liposomas por el método de calentamiento

Cada formulado se preparó utilizando como medio de disolución Sacarosa al 10% o Solución Buffer de Fosfatos (PBS) a pH de 7.4, en un volumen final de 25 mL, en base a las proporciones correspondientes de cada excipiente para cada formulado como aparece en el (cuadro 10), los cuales fueron pesados y colocados en matraces bola fondo redondo con capacidad de 50 mL para realizar su dispersión a la mitad del volumen final (aproximadamente 12.5 mL), con una agitación constante de 750 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de dispersión esta suspensión se transfirió a matraces aforados de 25 mL donde previamente se colocó 0.714 mL de Insulex R de acuerdo con los cálculos presentados en el (cuadro 11) y, posteriormente se afora con el medio de disolución (Sacarosa al 10% o PBS a pH de 7.4). Al término del

aforo se traspasa nuevamente al matraz bola para inyectar 0.5 bar de N₂ durante 1 minuto y evitar la oxidación de los fosfolípidos. A continuación, los preparados anteriores son llevados a un baño maría a 60°C con una agitación constante de 750 rpm por 40 min. Finalmente, son colocados dentro del Sonicador durante 30 min, cuidando que los matraces no choquen entre sí, ni que toquen las paredes del equipo, por último, los formulados son transferidos a tubos eppendorf de 50 mL para meterlos en un baño de hielo y así someterlos a ondas sonoras en el Procesador Ultrasónico Inteligente con tiempos de encendido y apagado de 50 s por 3 min. (figura 13).

Clave de la Formulación	Excipiente	Proporción %
F1	Fosfatidilcolina	88
	Colato de Sodio	12
	Insulex R	
F2	Fosfatidilcolina	85
	Colato de Sodio	15
	Insulex R	
F3	Fosfatidilcolina	85
	Colato de Sodio	12
	PEG 1500	3
	Insulex R	
F4	Fosfatidilcolina	83
	Colato de Sodio	11
	Poloxamer 188	6
	Insulex R	
F5	Fosfatidilcolina	84
	Colato de Sodio	12
	Brij S10	4
	Insulex R	
F6	Fosfatidilcolina	84
	Colato de Sodio	12
	Brij L23	4
	Insulex R	
F7	Fosfatidilcolina	61
	Colato de Sodio	14
	PEG 1500	2
	Poloxamer 188	18
	Brij S10	3
	Brij L23	2

Cuadro 10: Tabla informativa para la preparación de cada Formulado con sus proporciones correspondientes para un volumen final de 25 mL.

$$\begin{aligned} \text{Dosis en ratas} &= 0.5 \text{ UI} / 100 \text{ g peso} \\ 0.5 \text{ UI Insulina Humana} &- 100 \text{ g peso} \\ \mathbf{X = 1.5 \text{ UI Insulina Humana}} &- \mathbf{300 \text{ g peso}} \end{aligned}$$

Cada frasco de Insulex R contiene 100 UI/mL de Insulina Humana, equivalentes a 3.5 mg de Insulina Humana Anhidra

$$100 \text{ UI Insulina Humana/mL} - 3.5 \text{ mg Insulina anhidra}$$

$$1.5 \text{ UI Insulina Humana/mL} - \mathbf{X = 0.0525 \text{ mg Insulina anhidra}}$$

Se propone una concentración de 0.10 mg/mL ya que el peso estimado en ratas es el mínimo, además de considerar que puede haber pérdida del API y asegurar la mayor cantidad de encapsulamiento posible.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 = 0.10 \text{ mg/mL Insulina en los formulados}$$

$$V_1 = 25 \text{ mL de formulado}$$

$$C_2 = 3.5 \text{ mg/mL Insulina en Insulex R}$$

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2} = \frac{(0.10 \text{ mg/mL})(25 \text{ mL})}{3.5 \text{ mg/mL}} = \mathbf{0.714 \text{ mL de Insulex R}}$$

Cuadro 11: Cálculos para determinar la cantidad de insulina comercial que se agregara a cada formulado de acuerdo con la dosis aproximada para ratas.



Figura 13: Metodología empleada para la fabricación de Liposomas cargados con Insulina (Insulex R) en medio de Sacarosa al 10% o PBS a pH de 7.4.

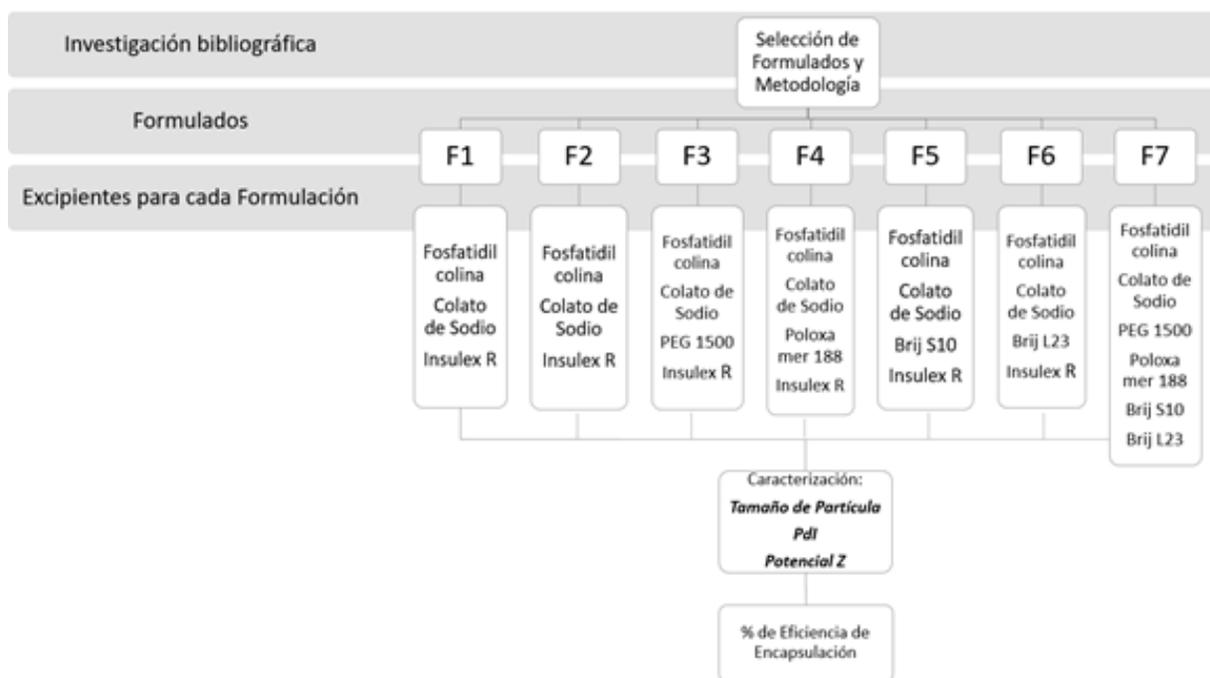


Figura 14: Metodología detallada para cada formulado y los estudios a realizar.

6.2.2 Caracterización de Liposomas cargados con Insulina.

Para cada formulado se toma 100 μ L de muestra y se colocan en matraces aforados de 1 mL para aforar con agua Milli-Q, se mezcla bien con ayuda del vortex para disponer de 750 μ L de esta mezcla dentro de la celda capilar plegada desechable, serie Zetasizer Nano de Malvern. La celda es colocada dentro del equipo Zetasizer para realizar las lecturas correspondientes a Tamaño de partícula, Índice de Polidispersión (Pdl) y Potencial Z.

6.2.3 Cuantificación de Insulina Encapsulada en los Liposomas (% Eficiencia de Encapsulación)

a) Método con diálisis (J. Kim y D.S. Chung, 2012).

En un vaso de precipitados de 600 mL se colocan 500 mL de solución fisiológica junto con una barra magnética que le ayude a mantener el medio en agitación constante a 250 rpm (aproximadamente) a temperatura ambiente. Dentro del medio se coloca un dispositivo de diálisis de la marca Merck modelo Float-A-Lyzer® G2 de 5 mL para su humectación por 5 min. posteriormente se colocan 5 mL del formulado dentro de la membrana y se deja dentro del vaso con solución salina manteniendo la agitación y la temperatura ambiente por 3 horas realizando

un lavado cada hora (se retira la solución cambiándola por solución fisiológica nueva).

b) Método de centrifugación (A.C. Grabski, 2009).

Dentro de un tubo falcón de 15 mL se colocan 12 mL del formulado y se centrifugan a 12 000 rpm durante 12 min. a 4°C, el sobrenadante se deshecha y el botón se vuelve a suspender en 5 mL de medio de PBS a pH de 7.4.

Una vez realizado alguno de los dos métodos anteriores se colocan 5 mL (del dializado o suspensión) en tubos falcón de 15 mL los cuales se colocan dentro del Procesador Ultrasónico Inteligente, programando el equipo: Encendido 90.0, Apagado 50.0 y el tiempo de procesamiento de 15 min. A continuación, los tubos fueron llevados a centrifugar por 10 min. a 12 000 rpm a 4°C.

Para preparar la placa de ELISA de 96 pozos se toman 50 µL de la muestra de interés (figura 15):

1. Soluciones para la curva de calibración (Thermo Fisher Scientific).

En 9 tubos eppendorf se coloca el volumen indicado, de acuerdo con el (cuadro 12) del diluyente (agua milli-Q), a continuación, para los tubos A, B y C se toma el volumen de la ampolleta stock y se agitan con ayuda de un vortex, para los siguientes tubos se toma el volumen correspondiente de las diluciones anteriores como aparecen en el (cuadro 12), agitando siempre para asegurar homogenizar la disolución.

Tubo eppendorf	Volumen del Diluyente (µL)	Volumen y fuente de BCA (µL)	Concentración final BCA (µg/mL)
A	0	300 del Stock	2000
B	125	375 del Stock	1500
C	325	325 del Stock	1000
D	175	175 de la disolución del vial B	750
E	325	325 de la disolución del vial C	500
F	325	325 de la disolución del vial E	250
G	325	325 de la disolución del vial F	125
H	400	100 de la disolución del vial G	25

I	400	0	0 = Blanco
---	-----	---	------------

Cuadro 12: Esquema de diluciones estándar para la curva de calibración del Kit Pierce BCA Protein Assay con rango de concentraciones de 20–2000 µg/mL. (Thermo Fisher Scientific).

2. Sobrenadante para la cuantificación de insulina libre

Ya sea del método de diálisis o del método de centrifugación, en el primer caso sería la muestra de los tres lavados y en caso del segundo método sería el sobrenadante.

3. Solución de los liposomas rotos con ultrasonido

Una vez transcurrido el tiempo en el Procesador Ultrasónico Inteligente se toman los 50 µL para cada formulado que serán analizados.

4. Sobrenadante de los liposomas rotos y centrifugados

Al tomar el sobrenadante final se asegura no encontrar interferencias con los lípidos y/o excipientes para su lectura con el kit.

Una vez agregados los 50 µL de cada muestra se colocan 200 µL de la mezcla de reactivos A y B en proporción 50:1, respectivamente (cuadro 13).

Suponiendo que se tienen 84 pozos para analizar se le suma 1 para tener un volumen extra:

1. – (# de pozos) × 200 µL → 85 * 200 µL = **17 000 µL**

2. – Proporción de las soluciones A y B (50:1)

$$\begin{array}{r}
 17\ 000\ \mu\text{L} \quad - \quad 50 \text{ solución A} \\
 \mathbf{X = 340\ \mu\text{L}} \quad - \quad 1 \text{ solución B}
 \end{array}$$

3. – Al volumen total se le resta la proporción de la solución B para conocer el volumen real de la solución A

$$17\ 000\ \mu\text{L} - 340\ \mu\text{L} = \mathbf{16\ 660\ \mu\text{L}}$$

Cuadro 13: Cálculos para obtener los volúmenes de los reactivos A y B del kit BCA y preparar la mezcla que dará color a las muestras.

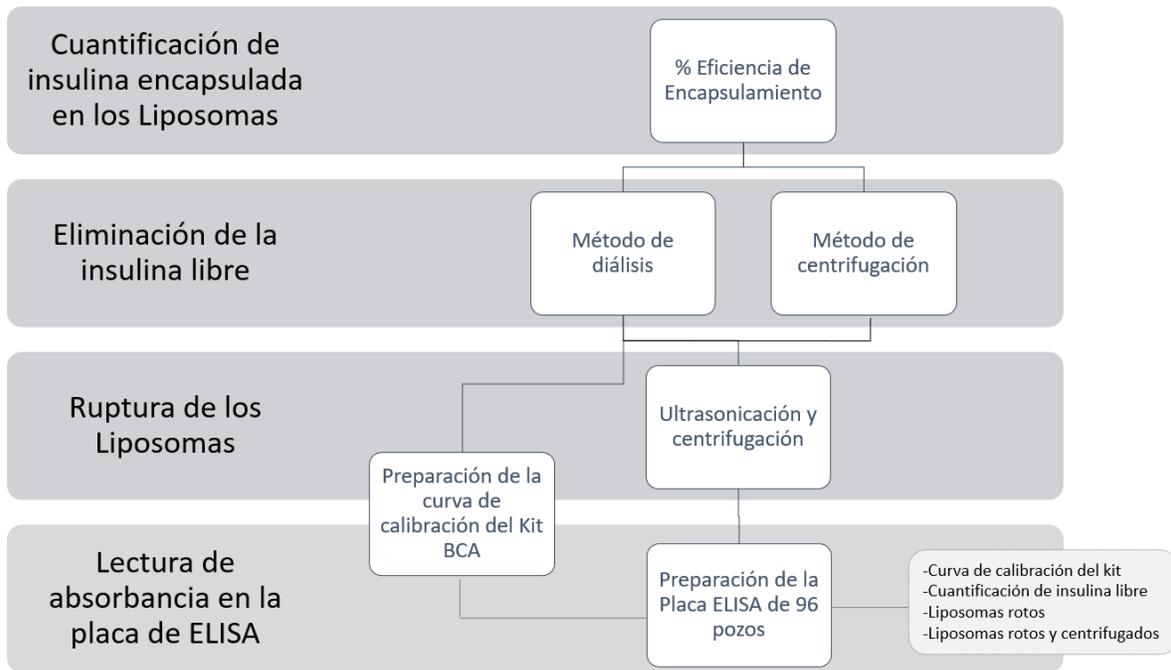


Figura 15: Metodología general para el porcentaje de eficiencia de encapsulación.

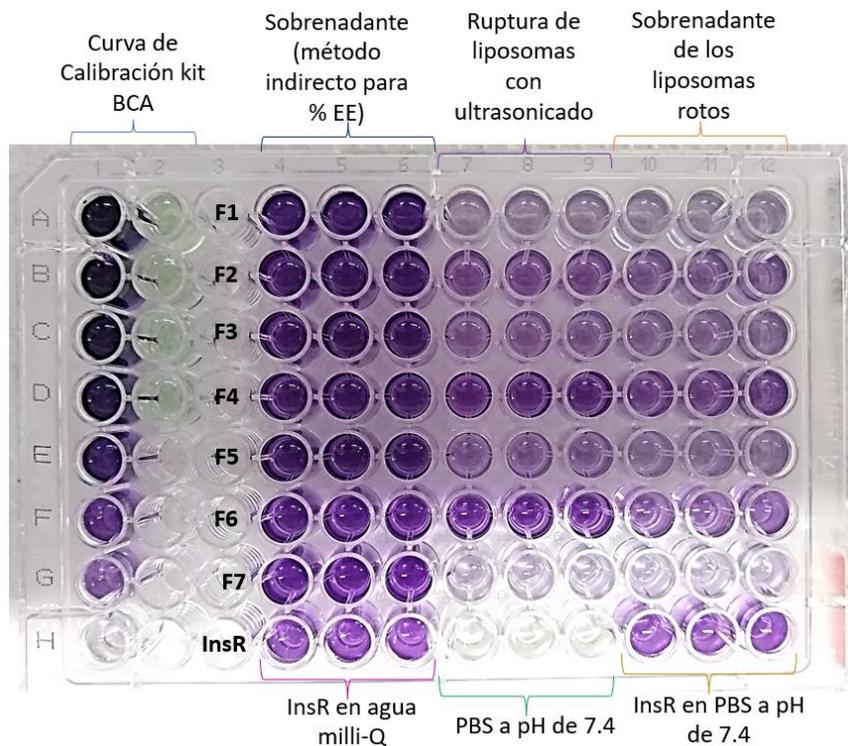


Figura 16: Placa ELISA de 96 pozos para la cuantificación de Insulina con el Kit Pierce BCA Protein Assay.

6.2.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential Scanning Calorimetry) DSC

Es una de las cinco técnicas dentro del Análisis Térmico (Thermal Analysis) TA (cuadro 14) donde se estudian las propiedades térmicas nativas en función al calentamiento constante respecto al tiempo, ya sea de una proteína, API o excipiente de interés.

La DSC da información cualitativa y cuantitativa de la temperatura de transición vítrea (T_g), temperatura de fusión (T_m), temperatura de cristalización (T_c), entalpía (ΔH) y la capacidad calorífica (C_p). El equipo para realizar un DSC consiste en un núcleo con dos celdas, de las cuales una de ellas contiene la solución de referencia y en la otra se coloca la muestra en solución. Posteriormente, se incrementa la temperatura constantemente hasta que la molécula de interés sufra un despliegue que provoque una diferencia de temperatura (ΔT) en las celdas, generando un voltaje que se convierte en potencial, el cual a su vez se utiliza para controlar la unidad de Peltier la cual se encarga de regular la temperatura para regresarla a 0°C (figura 17). (Malvern Panalytical a spectris company).

Técnica TA	Abreviatura	Propiedades representativas medidas
Análisis termogravimétrico	<i>TGA</i>	Descomposición, oxidación o pérdida de disolvente o agua.
Análisis térmico diferencial	<i>DTA</i>	Puntos de fusión, transiciones vítreas, cambios de fase.
Calorimetría diferencial de barrido	<i>DSC</i>	Puntos de fusión, colores de reacción, transición vítrea, capacidad calorífica.
Análisis termomecánico	<i>TMA</i>	Expansión, contracción, penetración, expansión, contracción, penetración, reblandecimiento, transición vítrea.
Microscopía de platina caliente	<i>HSM</i>	Transición térmica/crecimiento de cristales (cambio de color visual).

Cuadro 14: Tabla con las técnicas convencionales de Análisis Térmico y sus propiedades a medir. (S.Y. Lin, 2021).

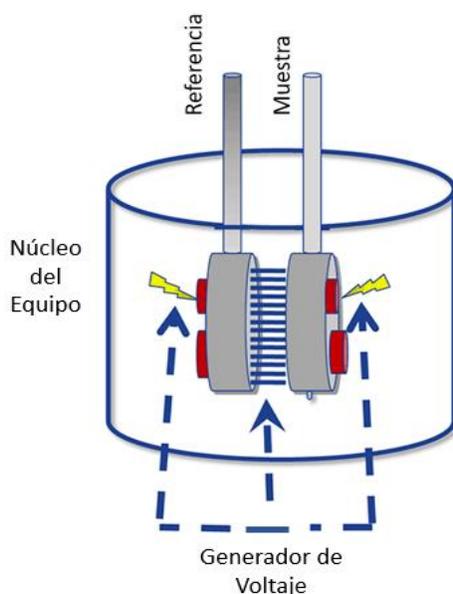


Figura 17: Núcleo del equipo para el análisis térmico DSC. (Malvern Panalytical a spectris company).

6.2.5 Preparación de la Curva de Calibración de Insulex R en medio de Sacarosa al 10% y PBS a pH de 7.4

Se preparó una solución madre de Insulex R en el medio de interés (Sacarosa al 10% o PBS pH 7.4), con una concentración 5.0 UI/mL en un volumen de 25 mL, (cuadro 15). A partir de esta solución se tomaron cinco alícuotas para las diferentes concentraciones planteadas, que se pueden ver en la (cuadro 16) llevando a un volumen final de 5 mL cada una. Se realizaron las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro UV-Vis, a una longitud de onda de 273 nm. Este procedimiento se validó por triplicado para cada medio de disolución.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_1 = 5 \text{ UI/mL} \quad \text{solución madre}$$

$$V_1 = 25 \text{ mL} \quad \text{volumen de aforo}$$

$$C_2 = 100 \text{ UI/mL} \quad \text{InsulexR}$$

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2} = \frac{(5 \text{ UI/mL})(25 \text{ mL})}{100 \text{ UI/mL}} = \mathbf{1.25 \text{ mL de InsulexR}}$$

Cuadro 15: Cálculo del volumen requerido de Insulex R para la preparación de la solución madre en medio de sacarosa al 10% o PBS a pH de 7.4.

Concentración [UI/mL]	Concentración (mg/mL)	Alicuota de la Sol. Madre (mL)	Volumen final (mL) con <i>Sacarosa al 10%</i> o <i>PBS pH 7.4</i>
0.8	0.028	0.8	5
1.6	0.056	1.6	
2.4	0.084	2.4	
3.2	0.112	3.2	
4.0	0.140	4.0	

Cuadro 16: Tabla de concentraciones y volúmenes para preparar las curvas de calibración de Insulex R.

6.2.6 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico con el software IBM® SPSS®, determinando la normalidad de los datos a través de la prueba de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas a través de la prueba de Levene.

Las diferencias de: Tamaño de partícula, Índice de polidispersión, Potencial Z, Estabilidad, Método de preparación y finalmente, entre los diferentes formulados, se evaluaron a través de un análisis de varianza y prueba Posthoc de Tukey-Kramer, considerando un valor de **p<0.05** para la significancia estadística, es decir, valores de $p<0.05$ significa que la hipótesis nula planteada es falsa y no se encuentran diferencias significativas en el estudio, por el contrario, valores de $p>0.05$ significa que la hipótesis nula es cierta y se encuentra diferencias significativas, es así que mientras el valor de p sea más pequeño se consideran fiables los resultados obtenidos. (M. Molina, 2017; Software IBM® SPSS®; Soporte de Minitab® 21).

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preparación de Liposomas sin Insulina

Se planteó una serie de formulaciones de liposomas que fueron evaluados en el equipo Zetasizer Nano ZS 3600 para poder generar un criterio de exclusión y seleccionar las estructuras lipídicas que tengan mejores resultados para ser cargadas con Insulex R más adelante (cuadro 17).

Al utilizar el método de calentamiento para la fabricación de los liposomas, se podría generar una cierta inquietud, ya que se recomienda el almacenamiento en refrigeración de la Insulina Humana a 8°C aproximadamente, sin embargo, en el artículo de la Dra. Arciniegas demuestra que la insulina expuesta a 60°C no presenta ningún cambio en el efecto terapéutico, durante un estudio de 420 min comparada con la insulina a 4-8°C, en cambio, la insulina expuesta a 100 °C presenta efectos terapéuticos significativos a los 180 y 240 min de haber sido administrada en ratas wistar diabéticas, sin embargo, esto va de la mano con una prueba DSC (figura 18) en donde se indica un cambio estructural entre el intervalo de temperatura de 62-70°C. Por lo cual, el calentar a 60 °C no generaría algún riesgo, tanto a los fosfolípidos, así como a la Insulina Humana. (S.M. Arciniegas et al. 2017).

Con el análisis DSC realizado en la USAII de la FQ, se puede corroborar que la metodología planteada para la fabricación de liposomas, por el método de calentamiento utilizado a 60°C, no le causa problemas a la Insulina.

Estructuras Lipídicas	Fosfatidilcolina	Colato de Sodio	Colesterol	PEG 1500	Poloxamer 188	Poloxamer 407	Brij S10	Brij L23
LS1	94%	6%	2-3	-	-	-	-	-
LS2	94%	6%	-	-	-	-	-	-
LS3	88%	12%	-	-	-	-	-	-
LS4	85%	15%	-	-	-	-	-	-
FL-C	88%	12%	-	-	-	-	-	-
FL-PEG1	88%	12%	-	1%	-	-	-	-
FL-PEG2	88%	12%	-	5%	-	-	-	-
FL-PEG3	88%	12%	-	10%	-	-	-	-
FL-PEG4	88%	12%	-	12.50%	-	-	-	-
FL-PEG5	88%	12%	-	15%	-	-	-	-
FL /P188 (1)	83.30%	11.40%	-	-	5.30%	-	-	-
FL /P188 (2)	79.20%	10.80%	-	-	10%	-	-	-
FL / P407 (1)	83.30%	11.40%	-	-	-	5.30%	-	-
FL / P407 (2)	79.20%	10.80%	-	-	-	10%	-	-
FL / Brij S10 (1)	84.20%	11.50%	-	-	-	-	4.30%	-
FL / Brij S10 (2)	80.80%	11%	-	-	-	-	8.20%	-
FL / Brij L23 (1)	84.20%	11.50%	-	-	-	-	-	4.30%
FL / Brij L23 (2)	80.80%	11%	-	-	-	-	-	8.20%
FL 1	98%	2%	-	-	-	-	-	-
FL 2	80%	20%	-	-	-	-	-	-
FL 3	60%	40%	-	-	-	-	-	-
FL 4	50%	50%	-	-	-	-	-	-
FL 5	40%	60%	-	-	-	-	-	-

Cuadro 17: Lista de las 23 formulaciones inicialmente preparadas SIN INSULINA para ser analizadas y comparadas estadísticamente en base a su Tamaño de partícula, Pdl y Potencial Z para generar un criterio de selección y reducir el número de preparaciones a 6 formulaciones (color azul).

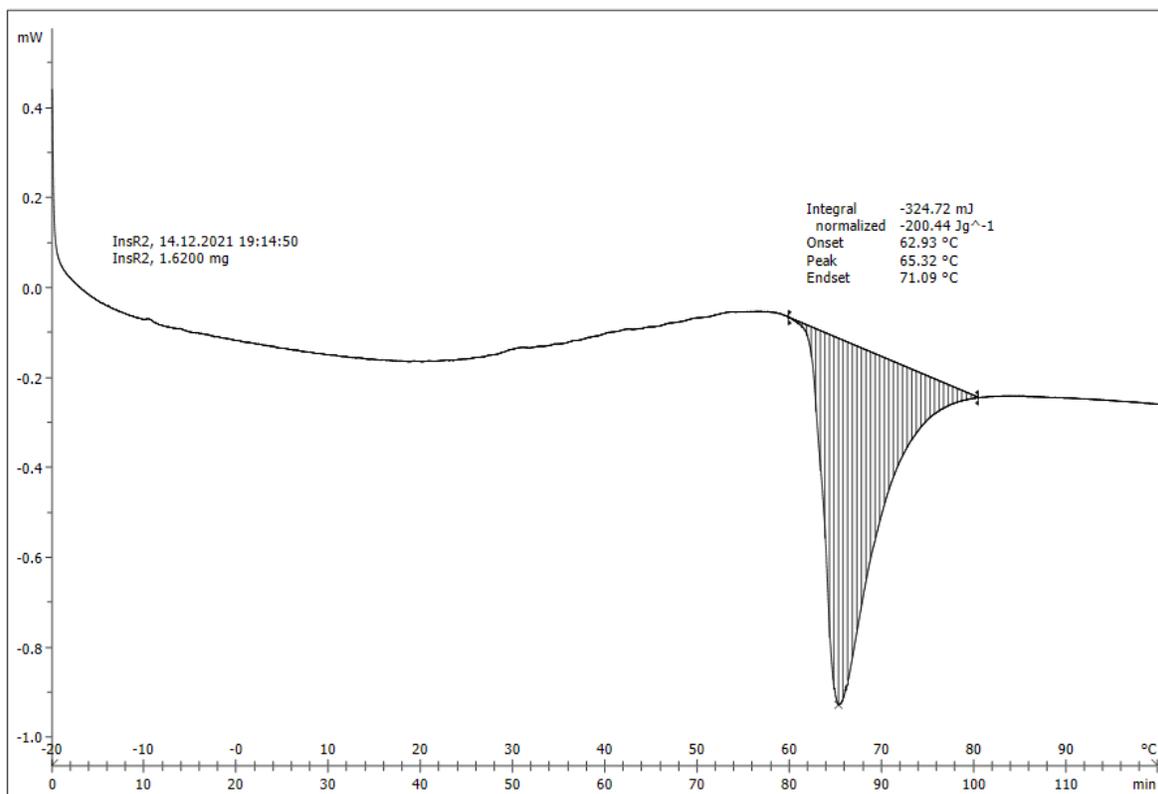


Figura 18: Análisis DSC para Insulex R, durante 120 min. con un cambio de calor constante gradual en mW, realizado en la *Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII)* de la FQ.

Para plantear la metodología adecuada, se hicieron lecturas en el zetasizer de los mismos preparados SIN INSULINA, pero considerando la sonicación sin ser filtradas y la sonicación con filtración, para elegir el método adecuado (cuadro 18).

De las 23 formulaciones propuestas, se seleccionaron las marcadas en azul, ya que con ambos métodos de preparación se obtuvieron resultados que cumplen los criterios de validación por parte del equipo, las mismas 6 formulaciones seleccionadas se procedieron a elaborarlas por triplicado, para observar su repetibilidad SIN INSULINA (cuadro 19) y se compararon tres métodos de preparación: Sin filtrar ni sonicar (**SF/SS**), Sin filtrar pero sonicadas (**SF/S**) y finalmente, Filtradas y sonicadas (**F/S**).

Una vez analizadas sin el fármaco se procede a preparar las formulaciones agregando 0.714 mL de Insulex R, a cada formulación, y realizar la misma caracterización en el zetasizer (cuadro 20). Sin embargo, para fines prácticos se renombraron los preparados en F1 a F6, realizándose por triplicado para ver su repetibilidad. Las lecturas comparan los mismos tres métodos de preparación: Sin filtrar ni sonicar (**SF/SS**), Sin filtrar, pero sonicadas (**SF/S**) y finalmente, Filtradas y sonicadas (**F/S**).

Estructuras Lipídicas	Sin filtrar y Sonicado					Filtrado y Sonicado				
	Z-Average (d.nm)	Pdl	Expert Advice	Potencial Z (mV)	Expert Advice	Z-Average (d.nm)	Pdl	Expert Advice	Potencial Z (mV)	Expert Advice
LS1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LS2	303.0 ± 3.64	0.431 ± 0.004	No cumple	(-73.8) ± 2.31	Cumple	137.5 ± 1.002	0.276 ± 0.006	Cumple	(-42.4) ± 3.16	No cumple
LS3	96.87 ± 0.258	0.235 ± 0.004	Cumple	(-65.3) ± 3.89	Cumple	95.33 ± 1.27	0.238 ± 0.013	Cumple	(-41.5) ± 2.44	Cumple
LS4	149.3 ± 1.24	0.347 ± 0.044	Cumple	(-49.3) ± 1.45	Cumple	122.4 ± 0.306	0.264 ± 0.008	Cumple	(-63.2) ± 1.41	Cumple
FL-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FL-PEG1	173.3 ± 7.57	0.410 ± 0.050	No cumple	(-50.6) ± 2.18	Cumple	140.9 ± 0.45	0.378 ± 0.022	Cumple	(-57.9) ± 1.77	No cumple
FL-PEG2	133.4 ± 2.52	0.359 ± 0.014	Cumple	(-78.5) ± 4.73	Cumple	122.5 ± 0.26	0.323 ± 0.034	Cumple	(-60.8) ± 1.05	Cumple
FL-PEG3	124.8 ± 1.88	0.310 ± 0.026	Cumple	(-69.0) ± 0.32	No cumple	122.8 ± 1.25	0.291 ± 0.033	Cumple	(-58.6) ± 3.27	No cumple
FL-PEG4	103.0 ± 1.47	0.276 ± 0.004	Cumple	(-49.9) ± 1.83	No cumple	108.3 ± 1.17	0.278 ± 0.014	Cumple	(-33.9) ± 1.71	No cumple
FL-PEG5	64.3 ± 0.66	0.263 ± 0.004	Cumple	(-26.8) ± 21.4	No cumple	73.3 ± 1.08	0.306 ± 0.008	Cumple	(-32.5) ± 1.54	No cumple
FL /P188 (1)	144.9 ± 1.97	0.299 ± 0.016	Cumple	(-37.5) ± 3.05	Cumple	136.7 ± 1.30	0.260 ± 0.017	Cumple	(-57.3) ± 1.30	Cumple
FL /P188 (2)	113.0 ± 0.44	0.257 ± 0.010	Cumple	(-53.0) ± 48.6	No cumple	117.4 ± 1.40	0.267 ± 0.002	Cumple	(-49.6) ± 1.12	Cumple
FL / P407 (1)	267.0 ± 16.04	0.711 ± 0.014	No cumple	(-55.1) ± 1.14	No cumple	200.6 ± 2.02	0.401 ± 0.010	Cumple	(-46.3) ± 3.90	No cumple
FL / P407 (2)	110.3 ± 0.72	0.273 ± 0.005	Cumple	(-26.3) ± 1.62	No cumple	106.7 ± 0.64	0.263 ± 0.005	Cumple	(-16.1) ± 9.69	No cumple
FL / Brij S10 (1)	75.92 ± 0.087	0.234 ± 0.013	Cumple	(-39.0) ± 1.21	Cumple	81.64 ± 0.825	0.253 ± 0.005	Cumple	(-19.1) ± 0.76	No cumple
FL / Brij S10 (2)	98.77 ± 0.532	0.240 ± 0.007	Cumple	(-15.2) ± 9.54	No cumple	96.68 ± 0.306	0.245 ± 0.007	Cumple	(-7.66) ± 5.41	No cumple
FL / Brij L23 (1)	105.1 ± 1.91	0.288 ± 0.006	Cumple	(-34.9) ± 3.18	No cumple	90.38 ± 0.51	0.256 ± 0.007	Cumple	(-59.2) ± 30.2	Cumple
FL / Brij L23 (2)	101.5 ± 2.24	0.262 ± 0.014	Cumple	(-48.3) ± 7.31	No cumple	96.57 ± 0.60	0.255 ± 0.010	Cumple	(-35.7) ± 0.721	No cumple
FL 1	104.9 ± 2.25	0.245 ± 0.004	Cumple	(-52.6) ± 8.60	No cumple	130.8 ± 11.0	0.351 ± 0.035	Cumple	(-31.5) ± 2.56	No cumple
FL 2	197.7 ± 9.8	0.454 ± 0.053	No cumple	(-77.1) ± 1.05	No cumple	139.1 ± 3.25	0.300 ± 0.031	Cumple	(-66.5) ± 3.01	Cumple
FL 3	278.7 ± 14.0	0.641 ± 0.053	No cumple	(-95.7) ± 19.4	No cumple	289.4 ± 9.5	0.415 ± 0.020	No cumple	(-67.3) ± 0.26	Cumple
FL 4	137.7 ± 0.35	0.413 ± 0.008	Cumple	(-71.8) ± 2.73	No cumple	166.2 ± 4.7	0.488 ± 0.085	Cumple	(-72.2) ± 12.7	Cumple
FL 5	115.7 ± 1.95	0.395 ± 0.009	Cumple	(-73.9) ± 8.29	Cumple	113.8 ± 2.6	0.361 ± 0.014	Cumple	(-51.0) ± 1.2	No cumple

Cuadro 18: Resultados de las 23 formulaciones SIN INSULINA considerando la *sonicación sin ser filtradas* y la *sonicación con filtración* en el Zetasizer para medir Tamaño de partícula, Pdl y Potencial Z.

Sin filtrar y Sin sonicar (19 Nov 2021)					Sin filtrar y Sonicado					Filtrado y Sonicado							
R1	Información no considerada				Z-Average (d.nm)	PdI	Expert Advice	Potencial Z (mV)	Expert Advice	Z-Average (d.nm)	PdI	Expert Advice	Potencial Z (mV)	Expert Advice			
F1										Cumple	(-65.3) ± 3.89	Cumple	95.33 ± 1.27	0.238 ± 0.013	Cumple	(-41.5) ± 2.44	Cumple
F2										Cumple	(-49.3) ± 1.45	Cumple	122.4 ± 0.306	0.264 ± 0.008	Cumple	(-63.2) ± 1.41	Cumple
F3										Cumple	(-78.5) ± 4.73	Cumple	122.5 ± 0.26	0.323 ± 0.034	Cumple	(-60.8) ± 1.05	Cumple
F4										Cumple	(-37.5) ± 3.05	Cumple	136.7 ± 1.30	0.260 ± 0.017	Cumple	(-57.3) ± 1.30	Cumple
F5										Cumple	(-39.0) ± 1.21	Cumple	81.64 ± 0.825	0.253 ± 0.005	Cumple	(-19.1) ± 0.76	No cumple
F6										Cumple	(-34.9) ± 3.18	No cumple	90.38 ± 0.51	0.256 ± 0.007	Cumple	(-59.2) ± 30.2)	Cumple
R2																	
F1	383.9 ± 22.9	0.584 ± 0.019	(-75.2) ± 4.11	No cumple	146.5 ± 4.8	0.396 ± 0.006	Cumple	(-70.9) ± 4.29	Cumple	134.3 ± 0.87	0.308 ± 0.030	Cumple	(-65.1) ± 2.40	Cumple			
F2	404.7 ± 16.2	0.562 ± 0.056	(-72.7) ± 4.07	No Cumple / Cumple	101.2 ± 0.818	0.258 ± 0.009	Cumple	(-65.1) ± 2.75	Cumple	102.3 ± 0.55	0.255 ± 0.007	Cumple	(-33.8) ± 0.850	No cumple			
F3	452.1 ± 26.4	0.569 ± 0.054	(-70.4) ± 1.27	No Cumple / Cumple	139.0 ± 6.67	0.392 ± 0.013	Cumple	(-67.7) ± 1.31	No cumple	127.3 ± 0.84	0.267 ± 0.007	Cumple	(-57.4) ± 2.26	No cumple			
F4	397.1 ± 18.9	0.594 ± 0.027	(-83.7) ± 10.7	No cumple	138.4 ± 1.8	0.366 ± 0.020	Cumple	(-68.3) ± 3.14	No cumple	153.7 ± 1.5	0.359 ± 0.002	Cumple	(-65.8) ± 1.28	Cumple			
F5	488.3 ± 33.5	0.603 ± 0.062	(-78.0) ± 3.58	No Cumple / Cumple	117.6 ± 1.55	0.295 ± 0.040	Cumple	(-64.0) ± 1.35	No cumple	112.6 ± 1.59	0.249 ± 0.006	Cumple	(-56.4) ± 0.513	Cumple			
F6	373.1 ± 4.7	0.643 ± 0.105	(-118.0) ± 76.7	No cumple	101.4 ± 0.55	0.256 ± 0.008	Cumple	(-55.7) ± 1.27	Cumple	114.9 ± 0.46	0.294 ± 0.008	Cumple	(-50.1) ± 1.0	Cumple			
R3																	
F1	381.2 ± 16.2	0.500 ± 0.015	(-68.1) ± 2.63	No cumple	114.4 ± 1.1	0.249 ± 0.006	Cumple	(-69.9) ± 1.6	Cumple	118.9 ± 0.6	0.270 ± 0.010	Cumple	(-50.4) ± 0.6	Cumple			
F2	448.3 ± 32.9	0.577 ± 0.059	(-84.2) ± 3.9	No cumple	96.6 ± 0.87	0.256 ± 0.002	Cumple	(-55.2) ± 5.8	No cumple	98.0 ± 1.2	0.264 ± 0.019	Cumple	(-45.9) ± 0.58	No cumple			
F3	359.9 ± 44.7	0.565 ± 0.055	(-79.6) ± 3.2	No cumple	83.8 ± 1.05	0.265 ± 0.006	Cumple	(-78.7) ± 48.3	Cumple	79.7 ± 0.11	0.254 ± 0.013	Cumple	(-37.9) ± 0.3	Cumple			
F4	371.5 ± 31.7	0.628 ± 0.108	(-74.9) ± 2.6	No cumple	79.3 ± 0.68	0.252 ± 0.014	Cumple	(-46.0) ± 5.3	No cumple	79.4 ± 2.6	0.268 ± 0.010	Cumple	(-38.1) ± 1.6	No cumple			
F5	335.7 ± 20.5	0.574 ± 0.083	(-83.6) ± 5.5	No cumple	101.8 ± 0.78	0.295 ± 0.006	Cumple	(-52.1) ± 0.85	No cumple	96.6 ± 1.2	0.266 ± 0.002	Cumple	(-44.6) ± 0.3	No cumple			
F6	441.8 ± 40.0	0.588 ± 0.057	(-77.1) ± 4.0	No Cumple / Cumple	95.3 ± 0.7	0.336 ± 0.012	Cumple	(-50.3) ± 3.1	Cumple	90.2 ± 0.7	0.255 ± 0.011	Cumple	(-45.2) ± 1.2	No cumple			

Cuadro 19: Formulaciones seleccionadas SIN INSULINA, para observar su REPETIBILIDAD respecto al Tamaño de partícula, PdI y Potencial Z, con tres métodos de preparación: Sin Filtrar y Sin Sonicar (SF/SS) // Sin Filtrar y Sonicado (SF/S) // Filtrado y Sonicado (F/S).

	Estructuras Lipídicas	Sin filtrar y Sin sonicar					Sin filtrar y Sonicado					Filtrado y Sonicado				
		Z-Average (d.nm)	Pdl	Expert Advice	Potencial Z (mV)	Expert Advice	Z-Average (d.nm)	Pdl	Expert Advice	Potencial Z (mV)	Expert Advice	Z-Average (d.nm)	Pdl	Expert Advice	Potencial Z (mV)	Expert Advice
Ronda 1	F1	421.7 ± 48.9	0.642 ± 0.140	No cumple	(-73.5) ± 3.7	Cumple	175.4 ± 6.5	0.500 ± 0.105	Cumple	(-85.3) ± 7.3	Cumple	157.6 ± 1.3	0.404 ± 0.016	Cumple	(-71.0) ± 3.2	Cumple
	F2	458.1 ± 29.7	0.591 ± 0.022	No cumple	(-77.3) ± 1.4	Cumple	165.7 ± 3.8	0.454 ± 0.078	Cumple	(-80.6) ± 2.3	Cumple	139.0 ± 1.0	0.284 ± 0.021	Cumple	(-76.9) ± 27.7	Cumple
	F3	440.4 ± 47.6	0.697 ± 0.056	No cumple	(-85.2) ± 4.1	Cumple	112.0 ± 1.6	0.284 ± 0.025	Cumple	(-70.8) ± 2.6	Cumple	116.1 ± 1.6	0.300 ± 0.001	Cumple	(-59.7) ± 1.6	Cumple
	F4	466.6 ± 12.4	0.578 ± 0.011	No cumple	(-79.7) ± 8.3	Cumple	118.4 ± 0.79	0.265 ± 0.014	Cumple	(-106.0) ± 50.1	No cumple	118.1 ± 2.0	0.267 ± 0.004	Cumple	(-59.2) ± 1.0	Cumple
	F5	379.2 ± 28.4	0.719 ± 0.062	No cumple	(-74.7) ± 4.3	No cumple	126.8 ± 3.0	0.342 ± 0.023	Cumple	(-102.0) ± 48.9	No cumple	118.7 ± 0.52	0.285 ± 0.005	Cumple	(-74.1) ± 30.3	Cumple
	F6	461.4 ± 43.4	0.622 ± 0.033	No cumple	(-77.9) ± 5.0	Cumple	186.5 ± 7.6	0.511 ± 0.086	Cumple	(-77.1) ± 1.2	Cumple	166.2 ± 1.4	0.402 ± 0.014	Cumple	(-67.3) ± 1.0	Cumple
Ronda 2	F1	436.6 ± 5.9	0.606 ± 0.074	No cumple	(-82.0) ± 0.4	Cumple	105.7 ± 0.75	0.328 ± 0.004	Cumple	(-70.8) ± 24.5	Cumple	95.5 ± 0.96	0.244 ± 0.005	Cumple	(-48.4) ± 17.9	No cumple
	F2	562.5 ± 81.1	0.689 ± 0.056	No cumple	(-96.9) ± 28.9	No cumple	94.0 ± 1.2	0.308 ± 0.036	Cumple	(-53.2) ± 5.5	Cumple	88.3 ± 0.31	0.257 ± 0.005	Cumple	(-46.0) ± 0.55	Cumple
	F3	452.9 ± 25.2	0.594 ± 0.092	No cumple	(-75.0) ± 1.8	Cumple	115.3 ± 1.9	0.320 ± 0.028	Cumple	(-60.5) ± 4.1	Cumple	102.5 ± 0.46	0.240 ± 0.008	Cumple	(-55.1) ± 0.8	Cumple
	F4	537.8 ± 45.5	0.661 ± 0.064	No cumple	(-77.1) ± 4.2	Cumple	108.4 ± 1.6	0.294 ± 0.003	Cumple	(-63.7) ± 3.1	No cumple	97.4 ± 1.2	0.259 ± 0.009	Cumple	(-47.1) ± 1.1	Cumple
	F5	386.6 ± 39.9	0.642 ± 0.081	No cumple	(-78.2) ± 3.7	No cumple	113.1 ± 2.1	0.335 ± 0.031	Cumple	(-80.2) ± 28.5	No cumple	100.6 ± 0.06	0.252 ± 0.008	Cumple	(-52.5) ± 1.0	Cumple
	F6	481.3 ± 64.8	0.616 ± 0.033	No cumple	(-79.9) ± 5.9	Cumple	105.6 ± 1.6	0.257 ± 0.003	Cumple	(-90.3) ± 36.1	Cumple	104.7 ± 0.63	0.260 ± 0.009	Cumple	(-52.1) ± 1.2	Cumple
Ronda 3	F1	408.0 ± 41.3	0.610 ± 0.042	No cumple	(-103.0) ± 40.7	Cumple	106.7 ± 0.97	0.289 ± 0.028	Cumple	(58.0) ± 1.3	No cumple	99.9 ± 1.1	0.233 ± 0.010	Cumple	(-50.3) ± 0.7	Cumple
	F2	474.4 ± 31.3	0.607 ± 0.024	No cumple	(-84.7) ± 2.9	No cumple	272.1 ± 4.5	0.580 ± 0.105	No cumple	(-79.9) ± 2.6	No cumple	251.7 ± 25.7	0.535 ± 0.065	No cumple	(-93.3) ± 35.3	Cumple
	F3	516.8 ± 26.3	0.619 ± 0.031	No cumple	(-83.7) ± 4.8	Cumple	115.5 ± 0.9	0.353 ± 0.008	Cumple	(-58.3) ± 1.5	Cumple	96.5 ± 1.3	0.234 ± 0.004	Cumple	(-49.2) ± 0.5	Cumple
	F4	497.3 ± 18.1	0.609 ± 0.046	No cumple	(-80.4) ± 4.5	No cumple	123.4 ± 1.4	0.359 ± 0.006	Cumple	(-64.9) ± 3.1	Cumple	109.9 ± 0.9	0.258 ± 0.007	Cumple	(-70.6) ± 22.6	Cumple
	F5	498.4 ± 64.2	0.619 ± 0.015	No cumple	(-77.0) ± 1.8	No cumple	132.6 ± 2.6	0.394 ± 0.014	Cumple	(-69.5) ± 2.8	Cumple	108.8 ± 1.3	0.268 ± 0.013	Cumple	(-53.7) ± 1.0	Cumple
	F6	620.9 ± 12.3	0.624 ± 0.024	No cumple	(-62.4) ± 0.6	Cumple	104.7 ± 2.6	0.365 ± 0.060	Cumple	(-60.4) ± 17.0	Cumple	86.8 ± 0.52	0.245 ± 0.006	Cumple	(-42.1) ± 1.9	No cumple

Cuadro 20: Resultados de las formulaciones seleccionadas adicionando 0.714 mL de Insulex R y su REPETIBILIDAD por triplicado, para cada método de preparación: SF/SS, SF/S, F/S.

Con los datos obtenidos se realiza una diferencia estadísticamente significativa de Tukey, para facilitar la comparación entre los diferentes tratamientos utilizados.

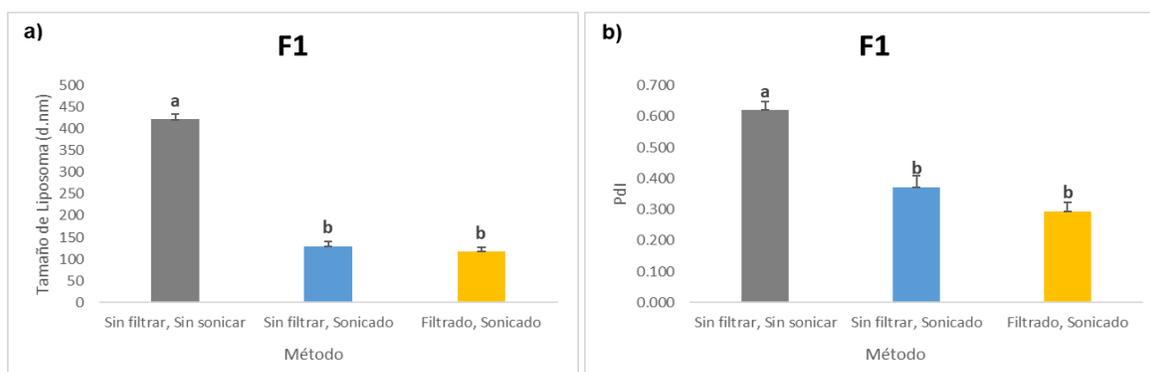


Figura 19 a): Tamaño de partícula del F1 (Lecitina + Colato de Na + InsR), por los métodos de: SF/SS: $\bar{X}= 422.9 \pm 11.5$; SF/S: $\bar{X}= 129.3 \pm 11.6$; F/S: $\bar{X}= 117.7 \pm 10.0$
19 b): Pdl del F1 comparando los tres métodos de preparación: SF/SS: $\bar{X}= 0.619 \pm 0.028$; SF/S: $\bar{X}= 0.372 \pm 0.037$; F/S: $\bar{X}= 0.294 \pm 0.027$.

En las gráficas 19 a) y 19 b), se observa que el método **Sin Filtrar/Sin Sonicar** presenta diferencia significativa respecto a los otros métodos Sin Filtrar/Sonicado y Filtrado/Sonicado, teniendo un valor más grande de $p < 0.05$ para el Tamaño de partícula de 0.7 y en el caso del Pdl de 0.2.

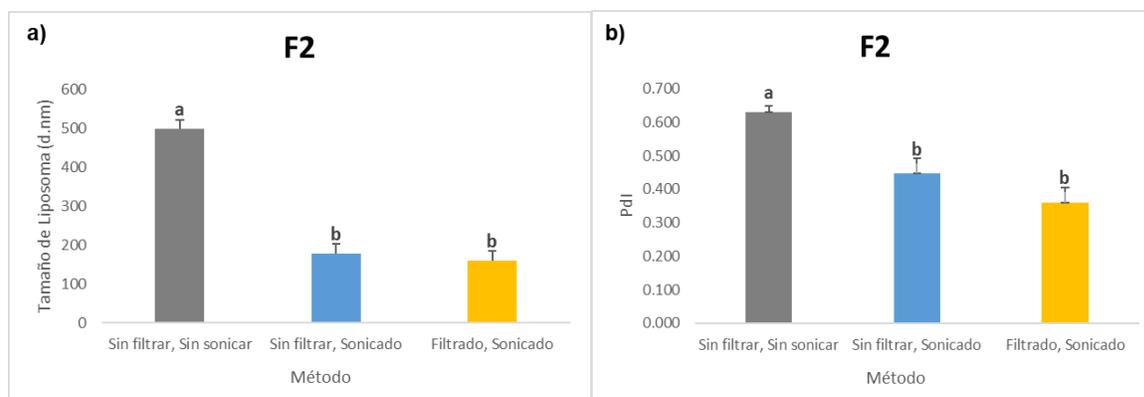


Figura 20 a): Tamaño de partícula del F2 (Lecitina + Colato de Na + InsR) por los métodos de: SF/SS: $\bar{X}= 498.3 \pm 22.3$; SF/S: $\bar{X}= 177.3 \pm 25.9$; F/S: $\bar{X}= 159.7 \pm 24.5$
20 b): Pdl del F2 comparando los tres métodos de preparación: SF/SS: $\bar{X}= 0.629 \pm 0.019$; SF/S: $\bar{X}= 0.447 \pm 0.045$; F/S: $\bar{X}= 0.359 \pm 0.046$.

Las gráficas 20 a) y 20 b), se observa que el método **Sin Filtrar/Sin Sonicar** presenta diferencia significativa respecto a los otros métodos Sin Filtrar/Sonicado y Filtrado/Sonicado, teniendo un valor más grande de $p < 0.05$ para el Tamaño de partícula de 0.9 y en el caso del Pdl de 0.3.

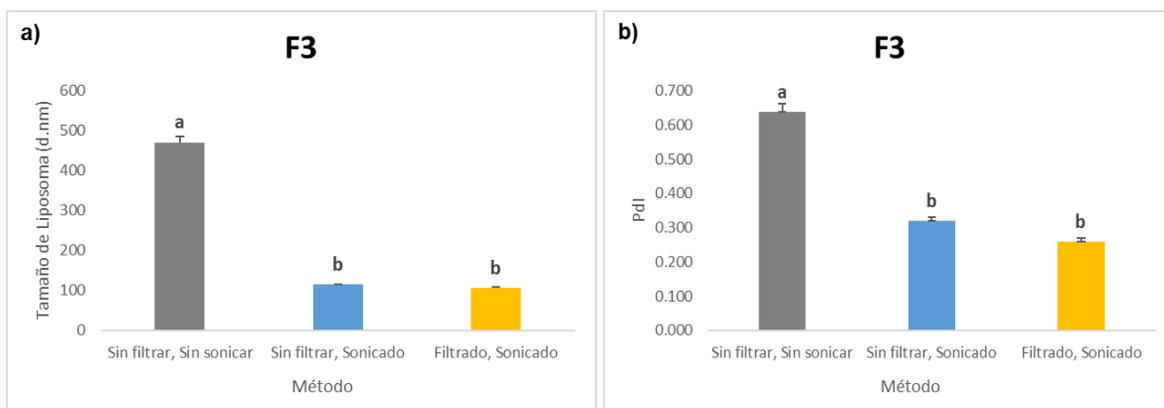


Figura 21 a): Tamaño de partícula del F3 (Lecitina + Colato de Na + PEG 1500 + InsR), por los métodos de: SF/SS: $\bar{X}= 470.0 \pm 15.5$; SF/S: $\bar{X}= 114.3 \pm 0.7$; F/S: $\bar{X}= 105.0 \pm 2.9$ **21 b):** Pdl del F3 comparando los tres métodos de preparación: SF/SS: $\bar{X}= 0.637 \pm 0.024$; SF/S: $\bar{X}= 0.319 \pm 0.012$; F/S: $\bar{X}= 0.258 \pm 0.011$.

En las gráficas 21 a) y 21 b), se observa que para el Tamaño de partícula y el Pdl el método **Sin Filtrar/Sin Sonicar** presenta diferencia significativa respecto a los otros métodos Sin Filtrar/Sonicado y Filtrado/Sonicado, teniendo un valor más grande de $p < 0.05$ de 0.8 y 0.7, respectivamente.

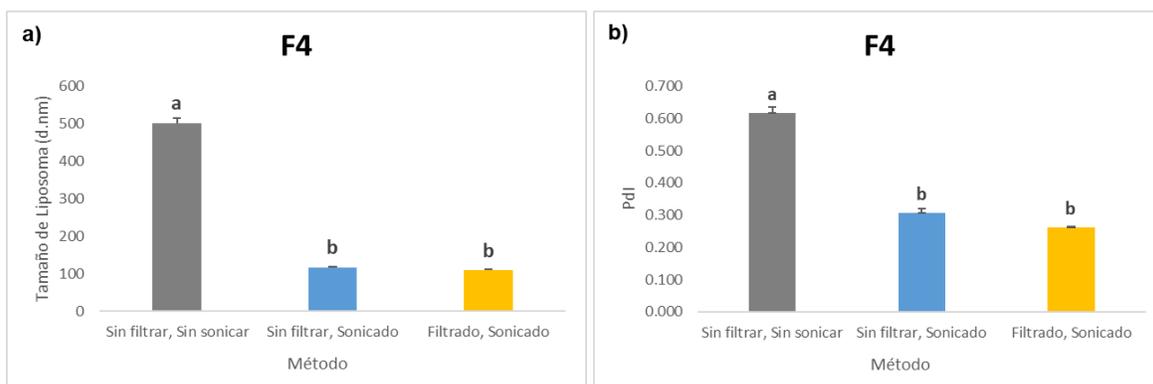


Figura 22 a): Tamaño de partícula del F4 (Lecitina + Colato de Na + Poloxámero 188 + InsR), por los métodos de: SF/SS: $\bar{X}= 500.6 \pm 13.3$; SF/S: $\bar{X}= 116.7 \pm 2.2$; F/S: $\bar{X}= 108.5 \pm 3.0$ **22 b):** Pdl del F4 comparando los tres métodos de preparación: SF/SS: $\bar{X}= 0.616 \pm 0.018$; SF/S: $\bar{X}= 0.306 \pm 0.014$; F/S: $\bar{X}= 0.262 \pm 0.002$.

En las gráficas 22 a) y 22 b), se observa que el método **Sin Filtrar/Sin Sonicar** presenta diferencia significativa respecto a los otros métodos Sin Filtrar/Sonicado y Filtrado/Sonicado, teniendo un valor más grande de $p < 0.05$ para el Tamaño de partícula de 0.7 y en el caso del Pdl de 0.06.

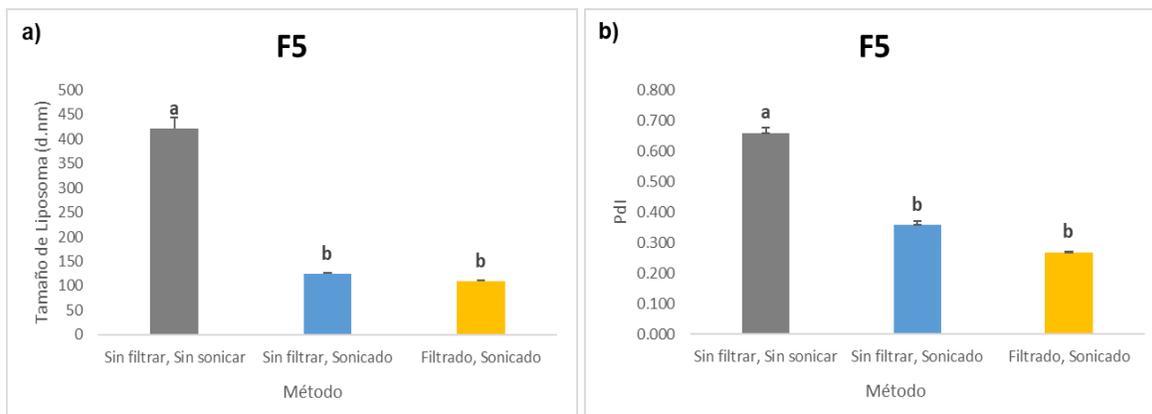


Figura 23 a): Tamaño de partícula del F5 (Lecitina + Colato de Na + Brij S10 + InsR), por los métodos de: SF/SS: $\bar{X}= 421.4 \pm 23.5$; SF/S: $\bar{X}= 124.2 \pm 3.0$; F/S: $\bar{X}= 109.3 \pm 2.6$ **23 b):** PDI del F5 comparando los tres métodos de preparación: SF/SS: $\bar{X}= 0.660 \pm 0.023$; SF/S: $\bar{X}= 0.357 \pm 0.011$; F/S: $\bar{X}= 0.268 \pm 0.005$.

En las gráficas 23 a) y 23 b), se observa que para el Tamaño de partícula y el PDI el método **Sin Filtrar/Sin Sonicar** presenta diferencia significativa respecto a los otros métodos Sin Filtrar/Sonicado y Filtrado/Sonicado, teniendo un valor más grande de $p < 0.05$ de 0.7 y 0.6, respectivamente.

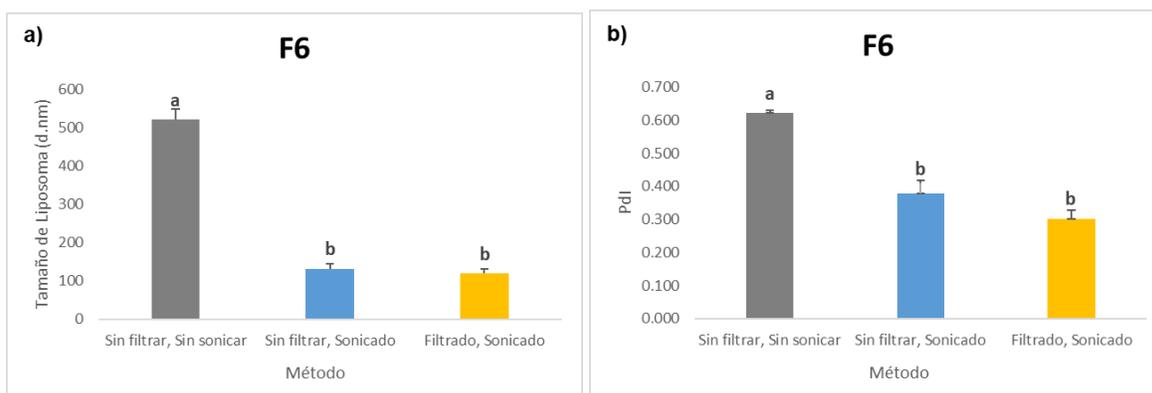


Figura 24 a): Tamaño de partícula del F6 (Lecitina + Colato de Na + Brij L23 + InsR), por los métodos de: SF/SS: $\bar{X}= 521.2 \pm 28.3$; SF/S: $\bar{X}= 132.2 \pm 13.6$; F/S: $\bar{X}= 119.2 \pm 12.0$ **24 b):** PDI del F6 comparando los tres métodos de preparación: SF/SS: $\bar{X}= 0.620 \pm 0.009$; SF/S: $\bar{X}= 0.377 \pm 0.041$; F/S: $\bar{X}= 0.302 \pm 0.025$.

Las gráficas 24 a) y 24 b), se observa que el método **Sin Filtrar/Sin Sonicar** presenta diferencia significativa respecto a los otros métodos Sin Filtrar/Sonicado y Filtrado/Sonicado, teniendo un valor más grande de $p < 0.05$ para el Tamaño de partícula de 0.9 y en el caso del PDI de 0.2.

A continuación, se presenta el mismo análisis estadístico, prueba Posthoc de Tukey-Kramer, considerando un valor de $p < 0.05$ para la significancia estadística, por cada método de preparación entre las formulaciones seleccionadas.

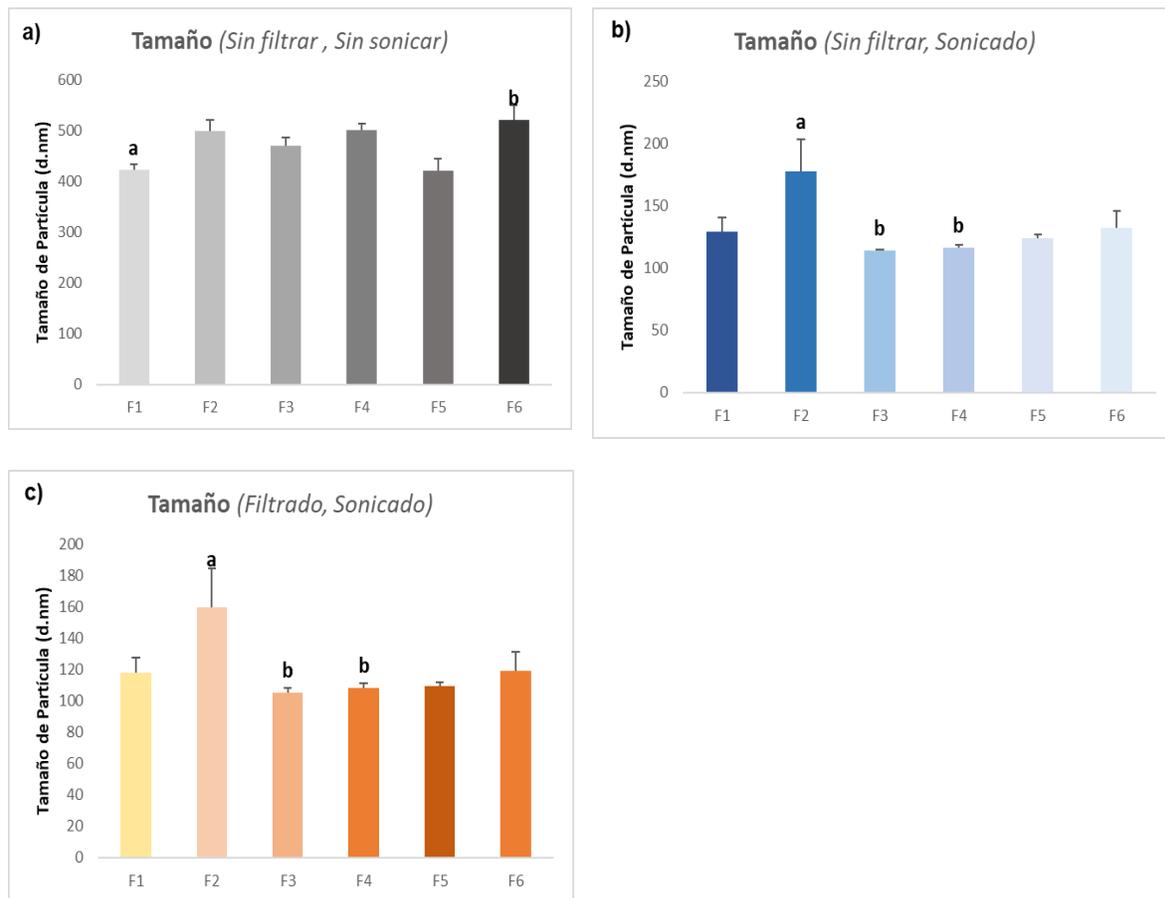


Figura 25 a): Tamaño de partícula SF/SS entre las formulaciones: F1: $\bar{X} = 422.1 \pm 11.5$; F2: $\bar{X} = 498.3 \pm 22.3$; F3: $\bar{X} = 470.0 \pm 15.5$; F4: $\bar{X} = 500.6 \pm 39.9$; F5: $\bar{X} = 421.4 \pm 23.5$; F6: $\bar{X} = 521.2 \pm 28.3$. **25 b):** Tamaño de partícula SF/S: F1: $\bar{X} = 129.3 \pm 11.6$; F2: $\bar{X} = 177.3 \pm 25.9$; F3: $\bar{X} = 114.3 \pm 0.71$; F4: $\bar{X} = 116.7 \pm 2.4$; F5: $\bar{X} = 124.2 \pm 3.0$; F6: $\bar{X} = 132.2 \pm 13.6$. **25 c):** Tamaño de partícula F/S: F1: $\bar{X} = 117.7 \pm 10.0$; F2: $\bar{X} = 159.7 \pm 24.5$; F3: $\bar{X} = 105.0 \pm 2.9$; F4: $\bar{X} = 108.5 \pm 3.0$; F5: $\bar{X} = 109.3 \pm 2.6$; F6: $\bar{X} = 119.2 \pm 12.0$.

En la gráfica **25 a)** Tamaño de partícula **Sin Filtrar/Sin Sonicar** las literales diferentes muestran evidencia de diferencia significativa entre el F1 y F6 vs las demás formulaciones, ya que presenta un valor más grande de $p < 0.05$ de 0.075 y 0.47 respectivamente.

La gráfica **25 b)** Tamaño de partícula **Sin Filtrar/ Sonicado** donde la diferencia significativa se encuentra en F2 vs las demás formulaciones y F3 junto con F4 respecto al resto de las formulaciones, esto porque su valor de p es de 0.9 para la F2 y 0.06 para F3 y F4.

Finalmente, la gráfica **25 c)** Tamaño de partícula **Filtrado/Sonicado** las literales diferentes que muestran la diferencia significativa son la F2 respecto al resto de las formulaciones y los F3 y F4 vs las demás formulaciones, teniendo un valor más grande de $p < 0.05$ de 1.0 para F2 y 0.055 para F3 junto con F4.

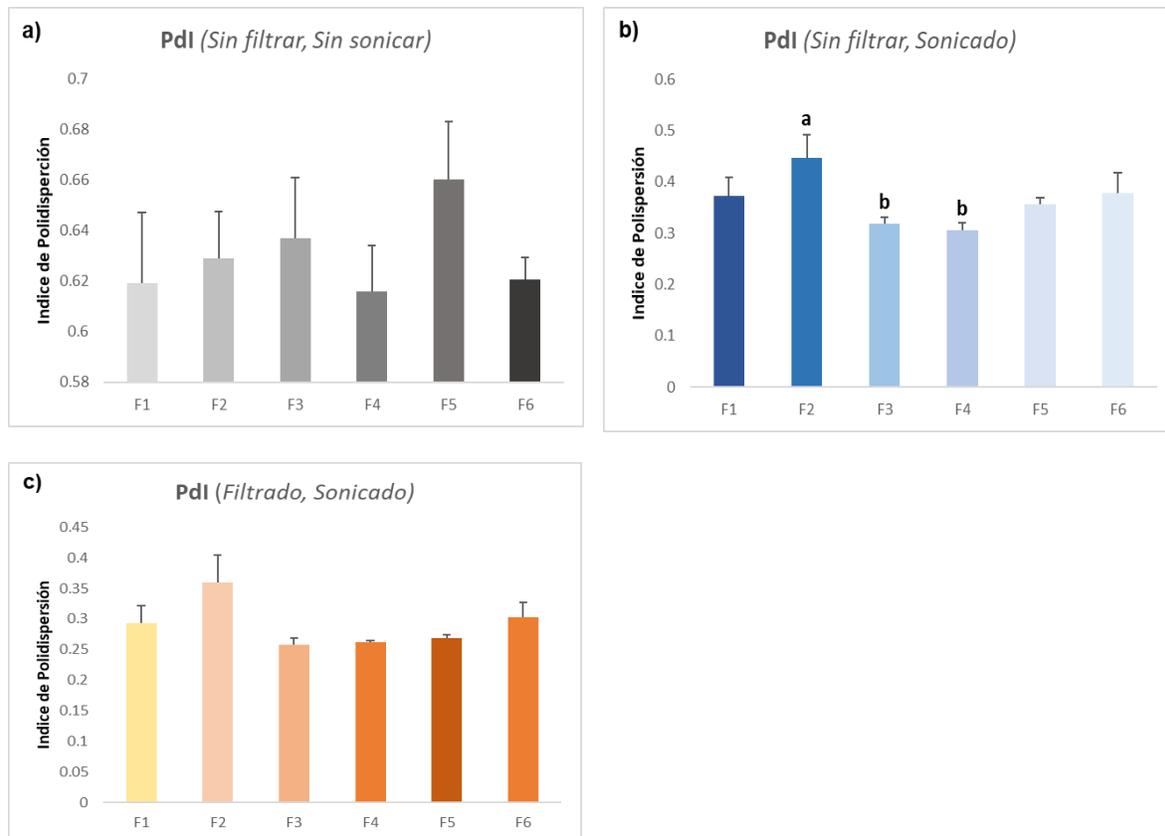


Figura 26 a): Tamaño de partícula SF/SS entre las formulaciones: F1: $\bar{X} = 0.619 \pm 0.03$; F2: $\bar{X} = 0.629 \pm 0.02$; F3: $\bar{X} = 0.637 \pm 0.02$; F4: $\bar{X} = 0.616 \pm 0.02$; F5: $\bar{X} = 0.660 \pm 0.02$; F6: $\bar{X} = 0.620 \pm 0.01$. **26 b):** Tamaño de partícula SF/S: F1: $\bar{X} = 0.372 \pm 0.04$; F2: $\bar{X} = 0.447 \pm 0.05$; F3: $\bar{X} = 0.319 \pm 0.01$; F4: $\bar{X} = 0.306 \pm 0.01$; F5: $\bar{X} = 0.357 \pm 0.01$; F6: $\bar{X} = 0.377 \pm 0.04$. **26 c):** Tamaño de partícula F/S: F1: $\bar{X} = 0.294 \pm 0.03$; F2: $\bar{X} = 0.359 \pm 0.05$; F3: $\bar{X} = 0.258 \pm 0.01$; F4: $\bar{X} = 0.261 \pm 0.002$; F5: $\bar{X} = 0.268 \pm 0.005$; F6: $\bar{X} = 0.302 \pm 0.03$.

Las gráficas **26 a)** Tamaño de partícula **Sin Filtrar/Sin Sonicar** y **26 c)** Tamaño de partícula **Filtrado/Sonicado**, no se encuentra ninguna literal diferente que muestre evidencia de diferencia significativa entre los formulados, ya que sus valores de p son menores a 0.05.

Por otro lado, en la gráfica **26 b)** Tamaño de partícula **Sin Filtrar/ Sonicado** donde la diferencia significativa se encuentra en F2 vs las demás formulaciones y

F3 junto con F4 respecto al resto de las formulaciones, debido a que sus valores de p son de 0.6 para la F2 y 0.3 para F3 y F4.

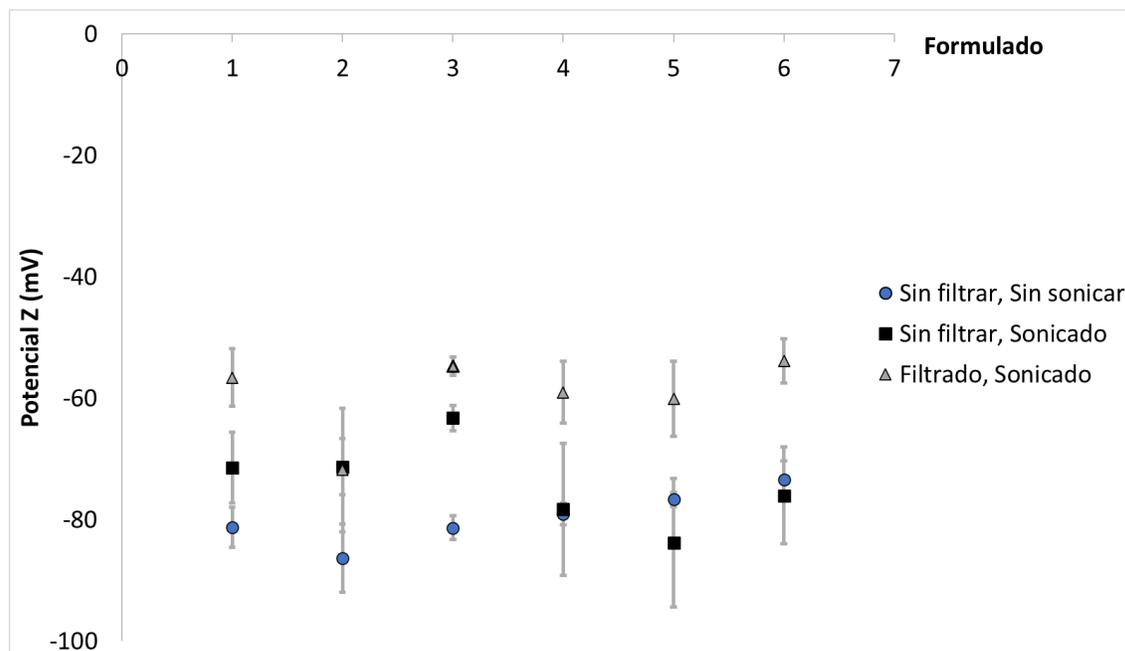


Figura 27: Análisis con barras de error para cada formulado con respecto al método de preparación **SF/SS**, **SF/S** y **F/S** respecto al Potencial Z.

La comparación entre formulaciones por cada método es más complejo ya que aquí se refleja el impacto que tiene cada excipiente con respecto a la formulación, sin embargo, claramente se aprecia una reducción en el tamaño de partícula de 500 d.nm a casi 200 d.nm, así como el Pdl el cual pasa de estar en 0.66 a 0.45, tan sólo en los métodos Sin Filtrar/Sin Sonicar vs Sin Filtrar/Sonicado, por otro lado, el potencial Z también se reduce sin dejar de ser menor a -50 mV.

La Dra. Arciniegas realizó una investigación similar a esta tesis, haciendo formulaciones de liposomas por el método de calentamiento cargados con insulina, sin embargo, la diferencia de proporciones de los excipientes, así como la metodología que empleó le dan unos formulados con tamaño de partícula mayores de aproximadamente 1 d.µm, el incremento en el tamaño de los liposomas va de la mano con el aumento de su Pdl alrededor de 0.700 y un Potencial Z muy variado que va de -30 mV a los -70 mV. (S.M. Arciniegas et al. 2019; S.M. Arciniegas et al. 2020).

Cabe resaltar que el uso de la nanotecnología está siendo de gran relevancia en la actualidad para la administración de una gran variedad de fármacos, además de

buscar alternativas nuevas para su vía de administración, esto con la ventaja de disminuir la toxicidad y direccionar el API a su diana de interés. El variar los tamaños “pequeños” de las nanopartículas <100 nm y relativamente grandes, entre 100 nm a 1µm, será de utilidad, ya que pudieran cruzar diferentes barreras biológicas dentro del cuerpo, por ejemplo, al cruzar la barrera hematoencefálica se puede considerar una nueva vía de administración de fármacos que actúen en el cerebro (W.H. de Jong y P.J.A. Borm, 2008).

Para conocer un poco más de la estabilidad de las formulaciones, se realizó un seguimiento por 3 semanas del Tamaño de partícula, Pdl y Potencial Z (Filtrados y Sonicados) con ayuda del equipo zetasizer, presentando los siguientes resultados, una vez analizados con una prueba estadística Poshoc de Tukey-Kramer, considerando un valor de $p < 0.05$.

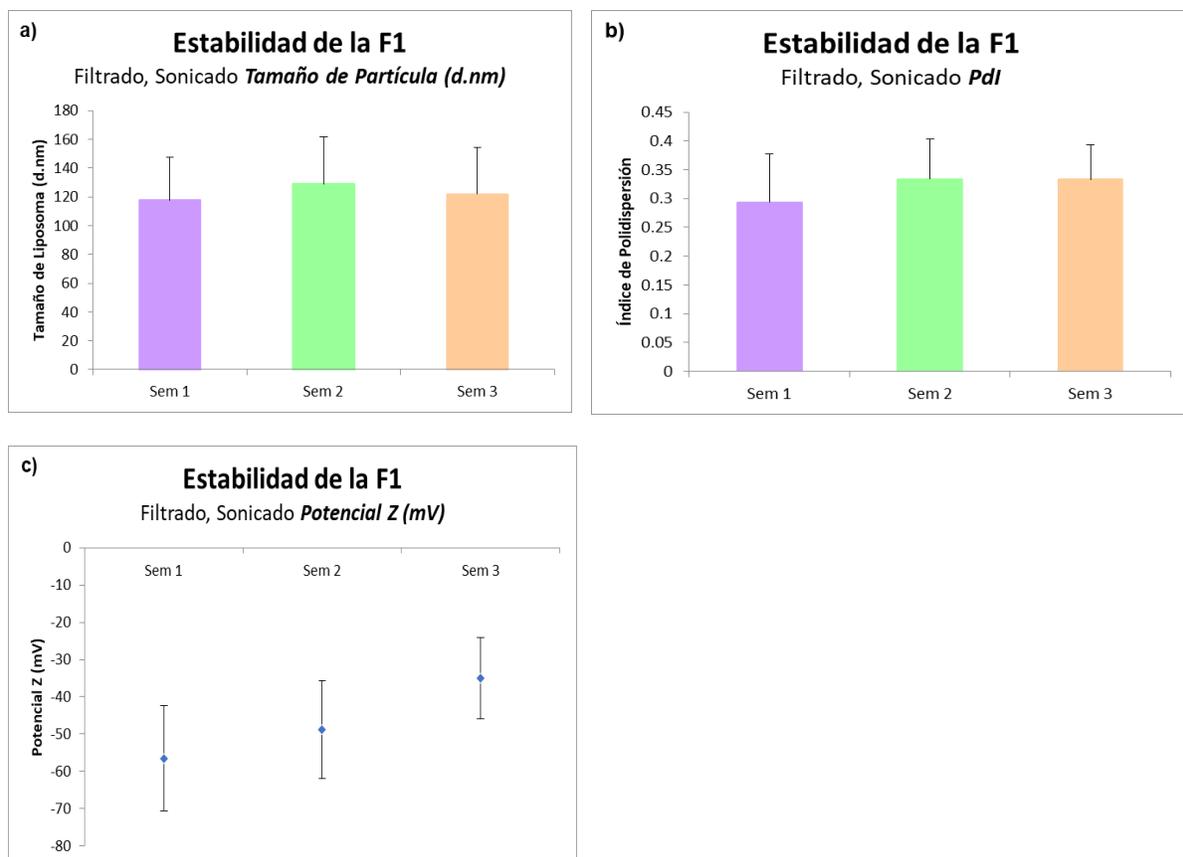


Figura 28 a): Tamaño de partícula del F1 (Lecitina + Colato de Na + InsR) durante tres semanas para observar su estabilidad: Sem 1: $\bar{X} = 117.7 \pm 10.0$; Sem 2: $\bar{X} = 129.0 \pm 10.9$; Sem 3: $\bar{X} = 122.1 \pm 10.8$ **28 b):** Pdl del F1: Sem 1: $\bar{X} = 0.294 \pm 0.03$; Sem 2: $\bar{X} = 0.334 \pm 0.07$; Sem 3: $\bar{X} = 0.333 \pm 0.06$ **28 c):** Potencial Z del F1: Sem 1: $\bar{X} = -56.6 \pm 4.7$; Sem 2: $\bar{X} = -48.8 \pm 4.4$; Sem 3: $\bar{X} = -35.0 \pm 3.6$.

En ninguna de las gráficas 28 a), 28 b) y 28 c), se observa alguna literal con evidencia de diferencia significativa, durante las tres semanas de estudio para la F1.

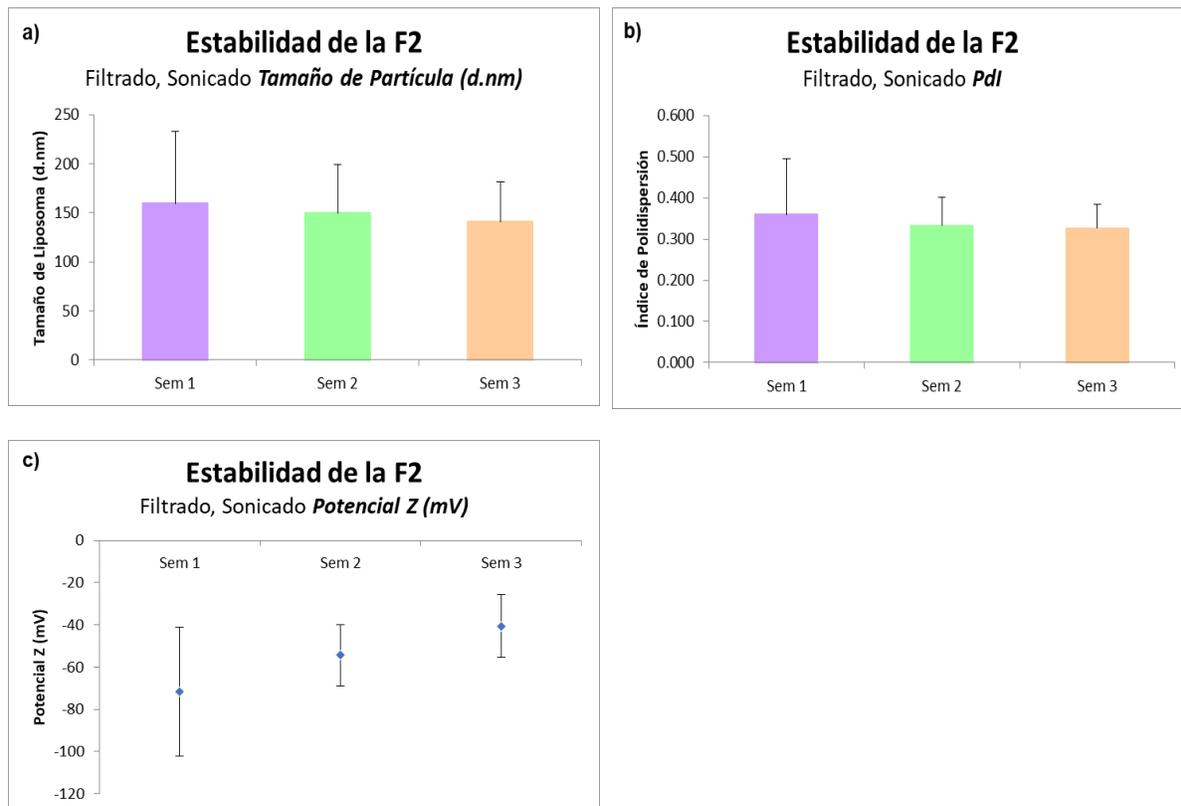


Figura 29 a): Tamaño de partícula del F2 (Lecitina + Colato de Na + InsR) durante tres semanas para observar su estabilidad: Sem 1: $\bar{X}= 159.7 \pm 24.5$; Sem 2: $\bar{X}= 149.8 \pm 16.6$; Sem 3: $\bar{X}= 141.0 \pm 13.3$ **29 b):** Pdl del F2: Sem 1: $\bar{X}= 0.400 \pm 0.05$; Sem 2: $\bar{X}= 0.300 \pm 0.02$; Sem 3: $\bar{X}= 0.300 \pm 0.02$ **29 c):** Potencial Z del F2: Sem 1: $\bar{X}= -71.8 \pm 10.2$; Sem 2: $\bar{X}= -54.4 \pm 4.8$; Sem 3: $\bar{X}= -40.6 \pm 4.9$.

En ninguna de las gráficas 29 a), 29 b) y 29 c), se observa alguna literal con evidencia de diferencia significativa, durante las tres semanas de estudio para la F2.

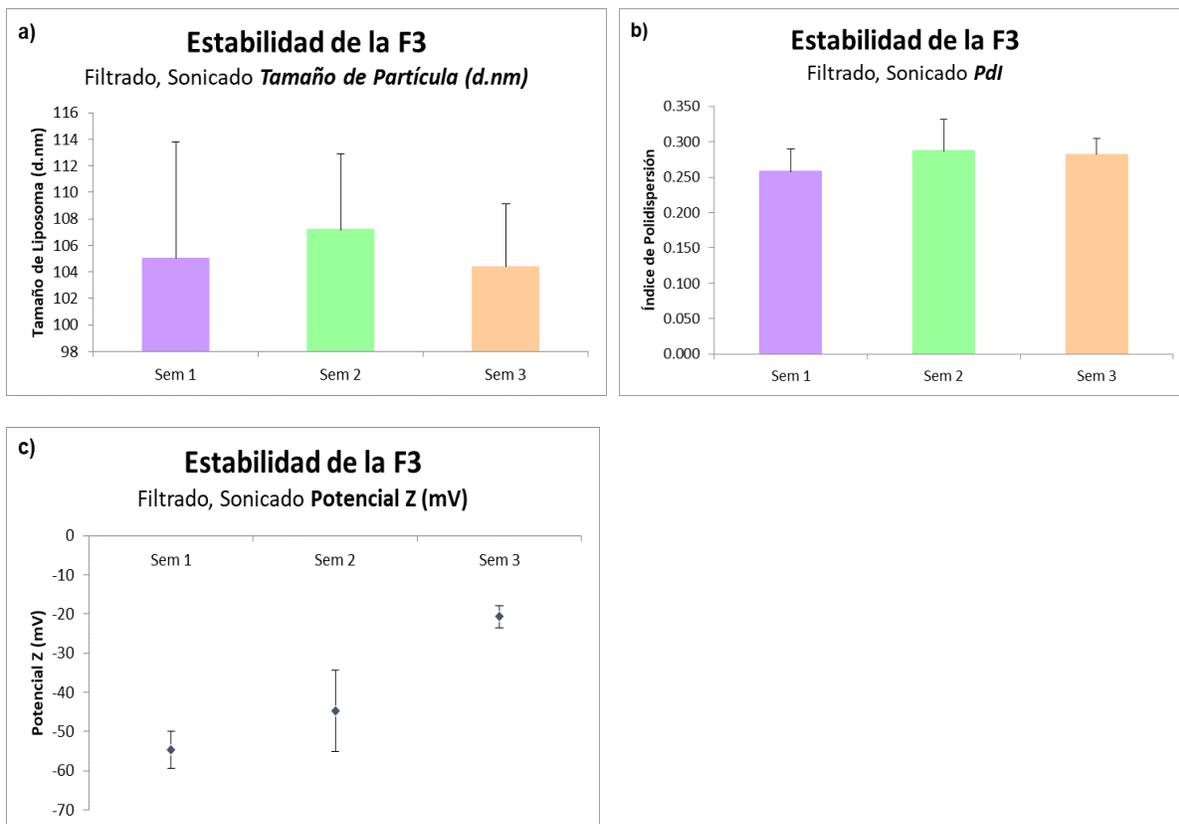
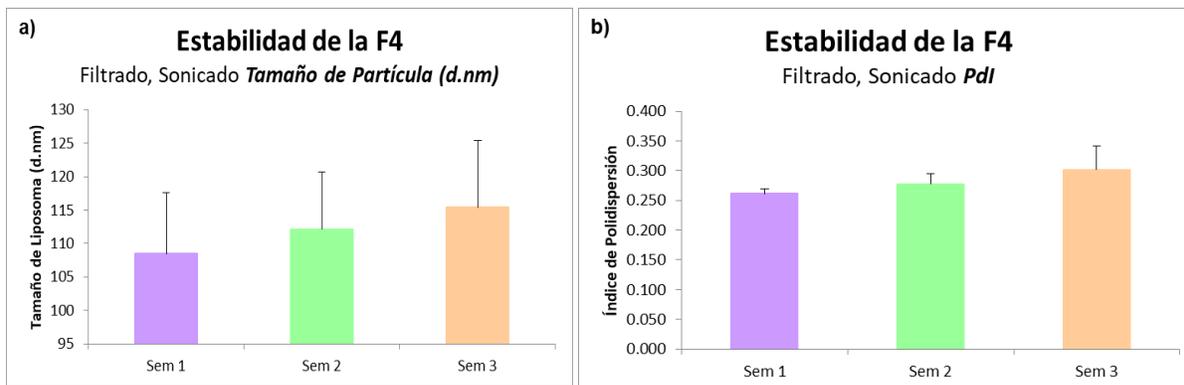


Figura 30 a): Tamaño de partícula del F3 (Lecitina + Colato de Na + PEG 1500 + InsR) durante tres semanas para observar su estabilidad: Sem 1: \bar{X} = 105.0 ± 2.9; Sem 2: \bar{X} = 107.2 ± 1.9; Sem 3: \bar{X} = 104.4 ± 1.6 **30 b):** Pdl del F3: Sem 1: \bar{X} = 0.258 ± 0.01; Sem 2: \bar{X} = 0.287 ± 0.01; Sem 3: \bar{X} = 0.282 ± 0.01 **30 c):** Potencial Z del F3: Sem 1: \bar{X} = -54.7 ± 1.5; Sem 2: \bar{X} = -44.7 ± 3.5; Sem 3: \bar{X} = -20.7 ± 1.0.

En ninguna de las gráficas 30 a), 30 b) y 30 c), se observa alguna literal con evidencia de diferencia significativa, durante las tres semanas de estudio para la F3.



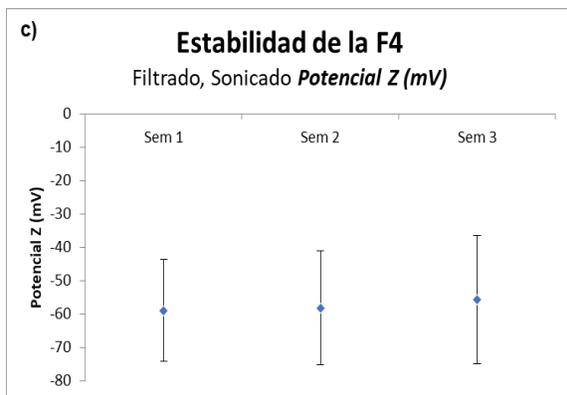


Figura 31 a): Tamaño de partícula del F4 (Lecitina + Colato de Na + Poloxámero 188 + InsR) durante tres semanas para observar su estabilidad: Sem 1: \bar{X} = 108.5 ± 3.0; Sem 2: \bar{X} = 112.1 ± 2.8; Sem 3: \bar{X} = 115.4 ± 3.4 **31 b):** Pdl del F4: Sem 1: \bar{X} = 0.262 ± 0.002; Sem 2: \bar{X} = 0.278 ± 0.005; Sem 3: \bar{X} = 0.301 ± 0.01 **31 c):** Potencial Z del F4: Sem 1: \bar{X} = -59.0 ± 5.1; Sem 2: \bar{X} = -58.2 ± 5.7; Sem 3: \bar{X} = -55.8 ± 6.4.

En ninguna de las gráficas 31 a), 31 b) y 31 c), se observa alguna literal con evidencia de diferencia significativa, durante las tres semanas de estudio para la F4.

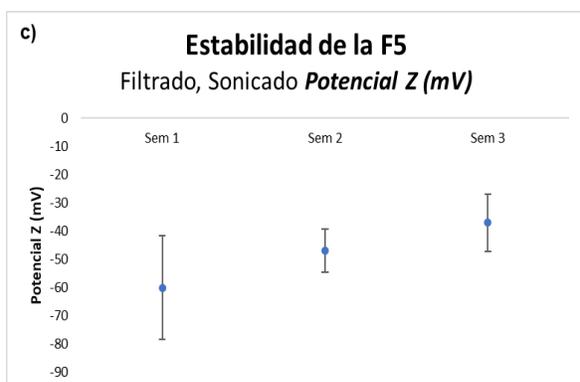
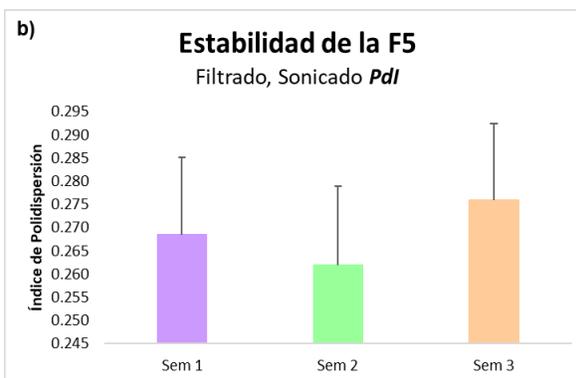
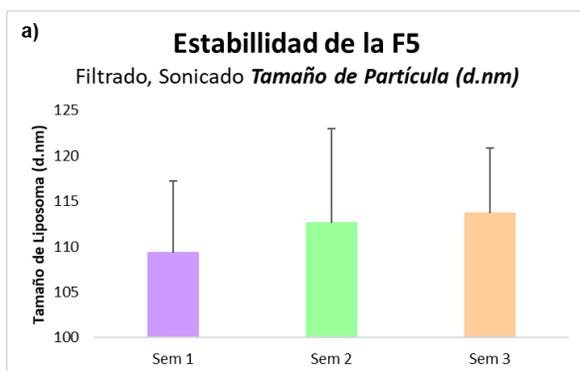


Figura 32 a): Tamaño de partícula del F5 (Lecitina + Colato de Na + Brij S10 + InsR) durante tres semanas para observar su estabilidad: Sem 1: $\bar{X}= 109.3 \pm 2.6$; Sem 2: $\bar{X}= 112.6 \pm 3.5$; Sem 3: $\bar{X}= 113.7 \pm 2.4$ **32 b):** Pdl del F5: Sem 1: $\bar{X}= 0.268 \pm 0.006$; Sem 2: $\bar{X}= 0.262 \pm 0.006$; Sem 3: $\bar{X}= 0.276 \pm 0.006$ **32 c):** Potencial Z del F5: Sem 1: $\bar{X}= -60.1 \pm 6.1$; Sem 2: $\bar{X}= -46.9 \pm 2.6$; Sem 3: $\bar{X}= -37.1 \pm 3.3$.

En ninguna de las gráficas 32 a), 32 b) y 32 c), se observa alguna literal con evidencia de diferencia significativa, durante las tres semanas de estudio para la F5.

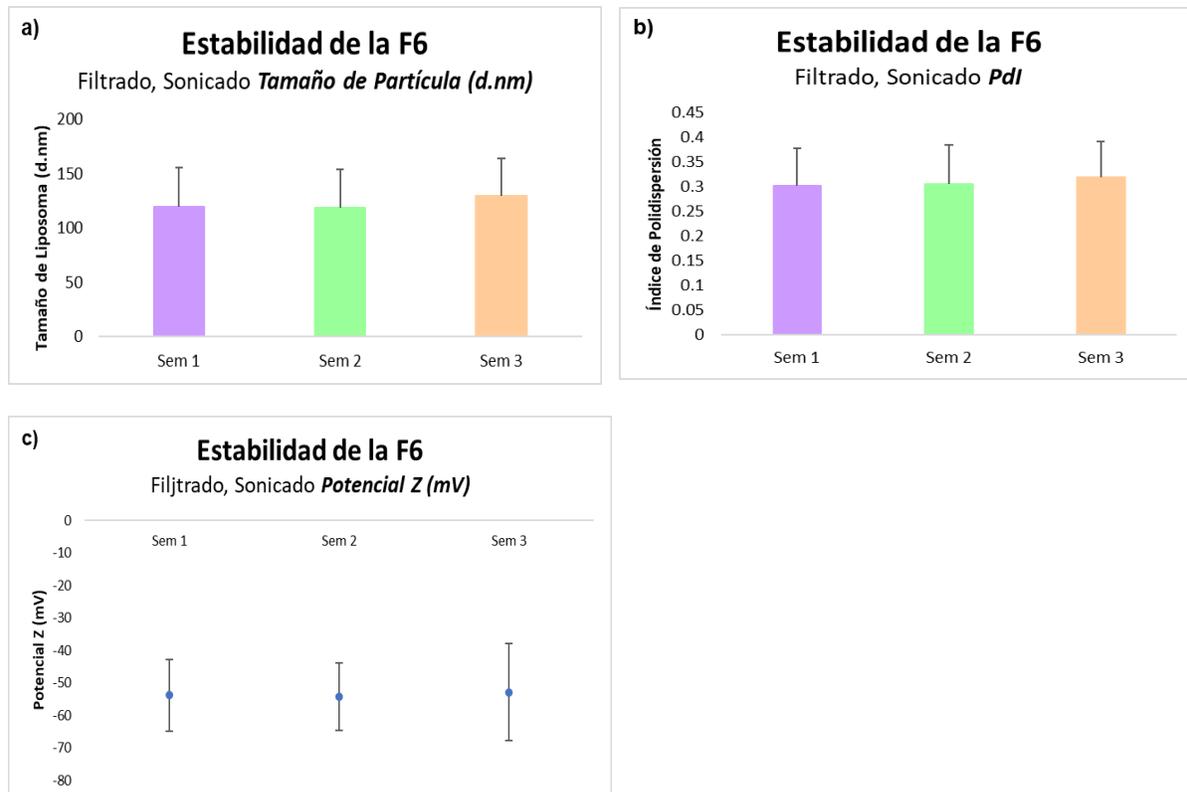


Figura 33 a): Tamaño de partícula del F6 (Lecitina + Colato de Na + Brij L23 + InsR) durante tres semanas para observar su estabilidad: Sem 1: $\bar{X}= 119.2 \pm 12.0$; Sem 2: $\bar{X}= 118.3 \pm 11.9$; Sem 3: $\bar{X}= 129.9 \pm 11.3$ **33 b):** Pdl del F6: Sem 1: $\bar{X}= 0.302 \pm 0.03$; Sem 2: $\bar{X}= 0.305 \pm 0.03$; Sem 3: $\bar{X}= 0.319 \pm 0.02$ **33 c):** Potencial Z del F6: Sem 1: $\bar{X}= -53.8 \pm 3.7$; Sem 2: $\bar{X}= -54.2 \pm 3.5$; Sem 3: $\bar{X}= -52.9 \pm 5.0$.

En ninguna de las gráficas 33 a), 33 b) y 33 c), se observa alguna literal con evidencia de diferencia significativa, durante las tres semanas de estudio para la F6.

Respecto a la estabilidad estudiada durante 3 semanas, se observa que se mantiene para todos los formulados, aunque en el caso de F2, F4 y F6 se observa

más esta característica de estabilidad tanto en Tamaño de partícula, Pdl y Potencial Z.

Las formulaciones fueron preparadas en medio de Sacarosa al 10% y PBS a pH de 7.4, haciéndose los mismos análisis estadístico (prueba Poshoc de Tukey-Kramer) comparando el medio utilizado, sin embargo, el Tamaño de partícula y el Pdl aumentaron considerablemente al utilizar el medio de PBS, por lo que como paso extra en la metodología se propone realizar ultrasonificación en baño de hielo por 3 min. con periodos de encendido y apagado del equipo de 50 s.

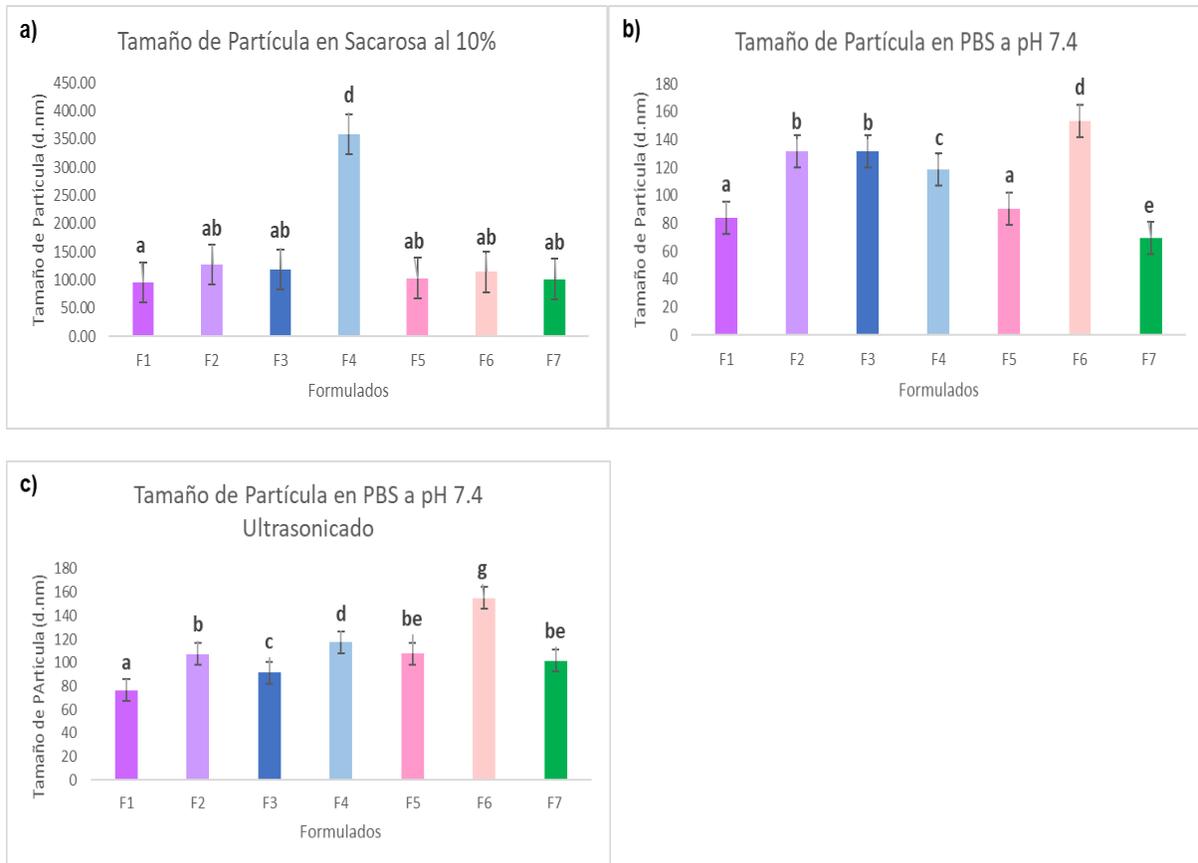


Figura 34 a): Tamaño de partícula en Sacarosa al 10%: F1: $\bar{X}= 96.0 \pm 0.49$; F2: $\bar{X}= 127.1 \pm 0.52$; F3: $\bar{X}= 118.9 \pm 0.95$; F4: $\bar{X}= 358.8 \pm 17.15$; F5: $\bar{X}= 103.4 \pm 0.74$; F6: $\bar{X}= 114.2 \pm 1.44$; F7: $\bar{X}= 101.5 \pm 0.76$ **34 b):** Tamaño de partícula en PBS a pH 7.4: F1: $\bar{X}= 84.2 \pm 0.40$; F2: $\bar{X}= 131.8 \pm 1.70$; F3: $\bar{X}= 131.6 \pm 1.05$; F4: $\bar{X}= 118.9 \pm 5.53$; F5: $\bar{X}= 90.5 \pm 1.66$; F6: $\bar{X}= 153.8 \pm 0.85$; F7: $\bar{X}= 69.5 \pm 1.39$ **34 c):** Tamaño de partícula en PBS a pH 7.4 Ultrasonicado: F1: $\bar{X}= 76.6 \pm 0.40$; F2: $\bar{X}= 107.2 \pm 1.55$; F3: $\bar{X}= 91.3 \pm 0.38$; F4: $\bar{X}= 117.5 \pm 4.52$; F5: $\bar{X}= 107.6 \pm 2.05$; F6: $\bar{X}= 155.0 \pm 1.22$; F7: $\bar{X}= 101.8 \pm 0.30$.

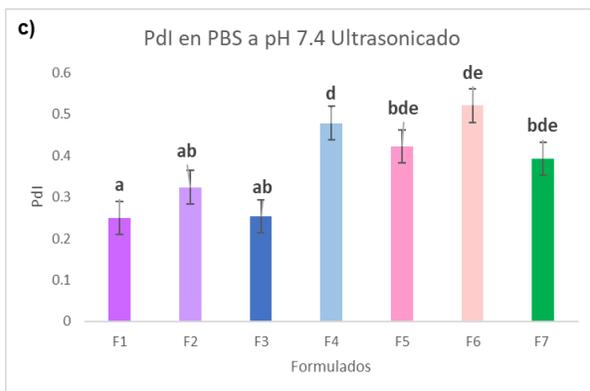


Figura 35 a): Pdl en Sacarosa al 10%: F1: \bar{X} = 0.259 ± 0.002; F2: \bar{X} = 0.339 ± 0.008; F3: \bar{X} = 0.339 ± 0.010; F4: \bar{X} = 0.521 ± 0.023; F5: \bar{X} = 0.260 ± 0.003; F6: \bar{X} = 0.374 ± 0.002; F7: \bar{X} = 0.250 ± 0.003 **35 b): Pdl en PBS a pH 7.4:** F1: \bar{X} = 0.337 ± 0.023; F2: \bar{X} = 0.348 ± 0.003; F3: \bar{X} = 0.450 ± 0.025; F4: \bar{X} = 0.393 ± 0.005; F5: \bar{X} = 0.439 ± 0.008; F6: \bar{X} = 0.441 ± 0.004; F7: \bar{X} = 0.369 ± 0.004 **35 c): Pdl en PBS a pH 7.4 Ultrasonificado:** F1: \bar{X} = 0.250 ± 0.003; F2: \bar{X} = 0.324 ± 0.028; F3: \bar{X} = 0.253 ± 0.008; F4: \bar{X} = 0.478 ± 0.047; F5: \bar{X} = 0.422 ± 0.006; F6: \bar{X} = 0.520 ± 0.021; F7: \bar{X} = 0.393 ± 0.021.

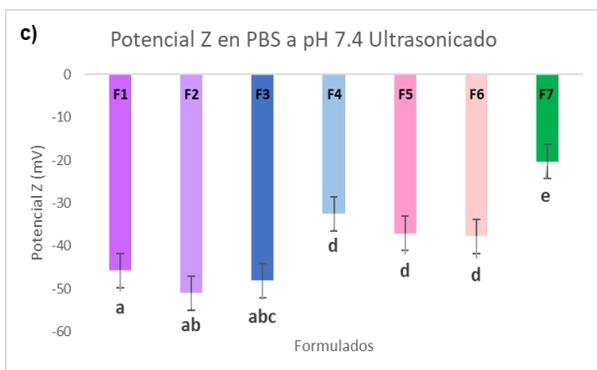
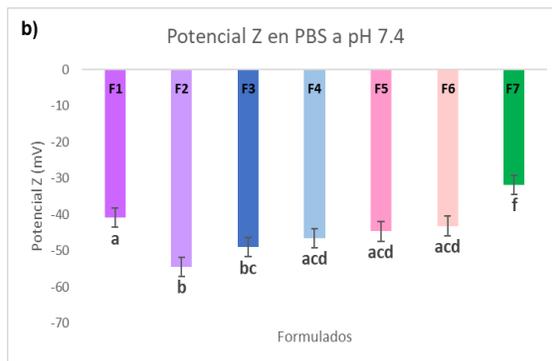
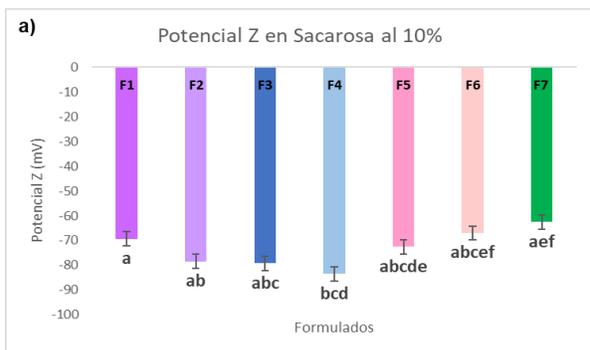


Figura 36 a): Potencial Z en Sacarosa al 10%: F1: \bar{X} = -69.3 ± 2.13; F2: \bar{X} = -78.4 ± 5.49; F3: \bar{X} = -79.2 ± 3.50; F4: \bar{X} = -83.5 ± 0.94; F5: \bar{X} = -72.6 ± 2.35; F6: \bar{X} = -67.0 ±

1.60; F7: $\bar{X} = -62.5 \pm 1.79$ **36 b**): Potencial Z en PBS a pH 7.4: F1: $\bar{X} = -40.9 \pm 0.7$; F2: $\bar{X} = -54.5 \pm 1.58$; F3: $\bar{X} = -49.1 \pm 1.96$; F4: $\bar{X} = -46.6 \pm 1.26$; F5: $\bar{X} = -44.7 \pm 1.93$; F6: $\bar{X} = -43.2 \pm 1.34$; F7: $\bar{X} = -31.8 \pm 0.43$ **36 c**): Potencial Z en PBS a pH 7.4 Ultrasonificado: F1: $\bar{X} = -45.8 \pm 1.35$; F2: $\bar{X} = -51.0 \pm 1.76$; F3: $\bar{X} = -48.1 \pm 1.62$; F4: $\bar{X} = -32.5 \pm 1.25$; F5: $\bar{X} = -37.1 \pm 1.68$; F6: $\bar{X} = -37.7 \pm 1.68$; F7: $\bar{X} = -20.3 \pm 1.27$.

Absorbancia a 273 nm	
x	y
UI/mL	Absorbancia
0.8	0.286
0.8	0.286
0.8	0.283
1.6	0.586
1.6	0.545
1.6	0.578
2.4	0.835
2.4	0.819
2.4	0.854
3.2	1.058
3.2	1.070
3.2	1.125
4.0	1.327
4.0	1.306
4.0	1.464
r2	0.990834219
m	0.3353
b	0.024

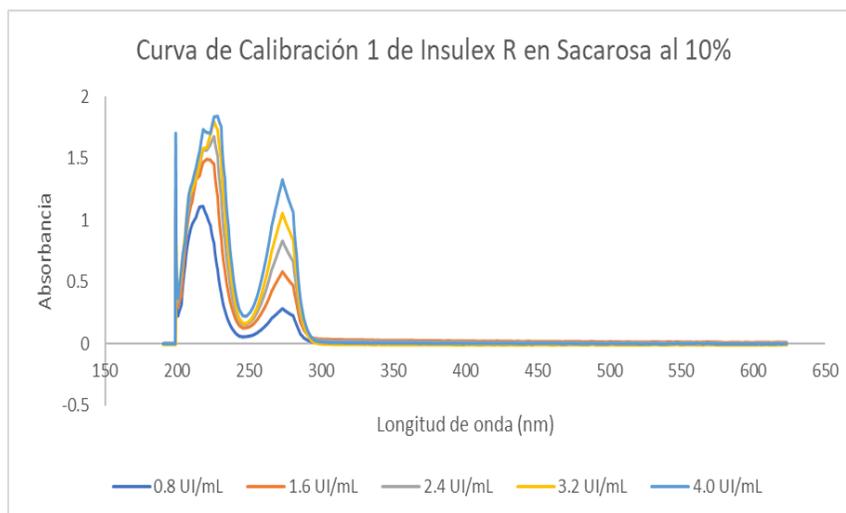


Figura 37: Curva de calibración 1 de Insulex R en medio de Sacarosa al 10%.

Cuadro 21: Tabla acumulativa de las absorbancias obtenidas en el Espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 273 nm, respecto a las concentraciones de Insulex R (UI/mL), para las tres curvas de calibración en Sacarosa al 10%.

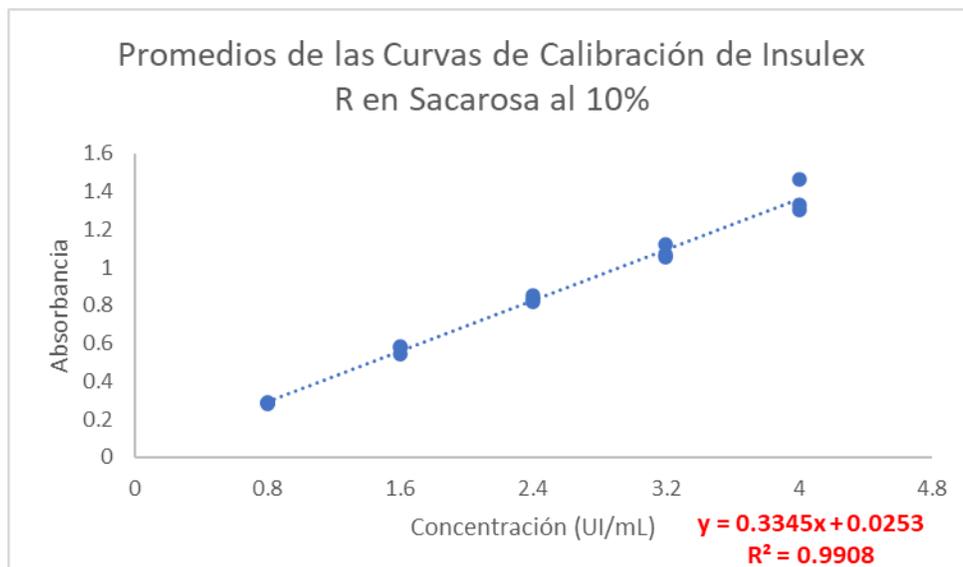


Figura 38: Promedios de las absorbancias para las tres curvas de calibración de Insulex R en medio de Sacarosa al 10%.

Absorbancia a 273 nm	
x	y
UI/mL	Absorbancia
0.8	0.284
0.8	0.285
0.8	0.288
1.6	0.555
1.6	0.543
1.6	0.572
2.4	0.831
2.4	0.814
2.4	0.834
3.2	1.067
3.2	1.086
3.2	1.052
4	1.317
4	1.288
4	1.304
r2	0.998
m	0.3183
b	0.0441

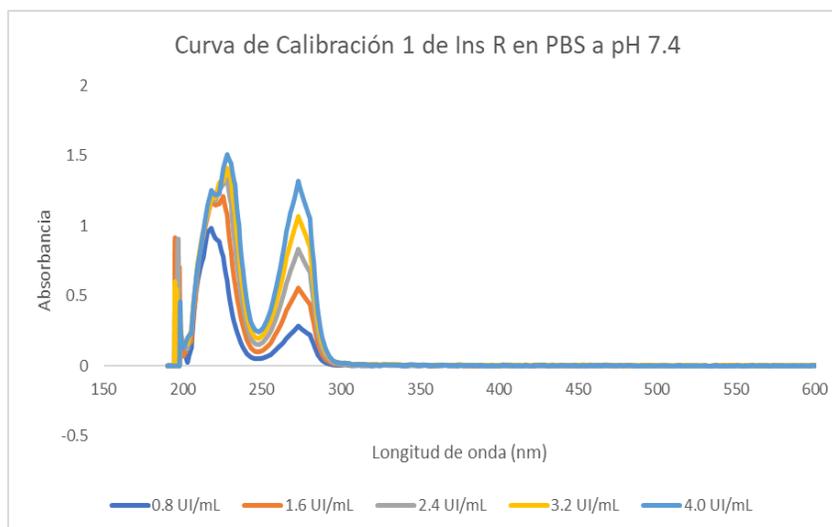


Figura 39: Curva de calibración 1 de Insulex R en medio de PBS a pH 7.4.

Cuadro 22: Tabla acumulativa de las absorbancias obtenidas en el Espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 273 nm, respecto a las concentraciones de Insulex R (UI/mL), para las tres curvas de calibración en PBS a pH de 7.4.

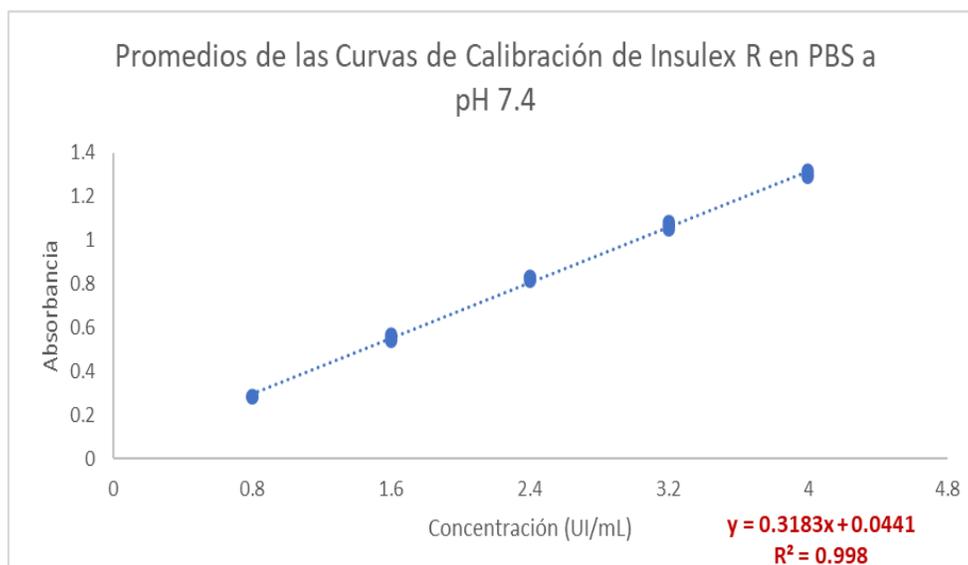


Figura 40: Promedios de las absorbancias para las tres curvas de calibración de Insulex R en medio de PBS a pH de 7.4.

Curva de Calibración Kit BCA			
Concentración µg/mL	Abs C1	Abs C2	Abs C3
0	0.000	0.000	0.000
25	0.050	0.049	0.049
125	0.266	0.265	0.264
250	0.461	0.458	0.458
500	0.800	0.795	0.795
750	1.125	1.123	1.122
1000	1.415	1.411	1.414

Cuadro 23: Tabla acumulativa de las absorbancias obtenidas para la curva de calibración del Kit Pierce BCA Protein Assay.

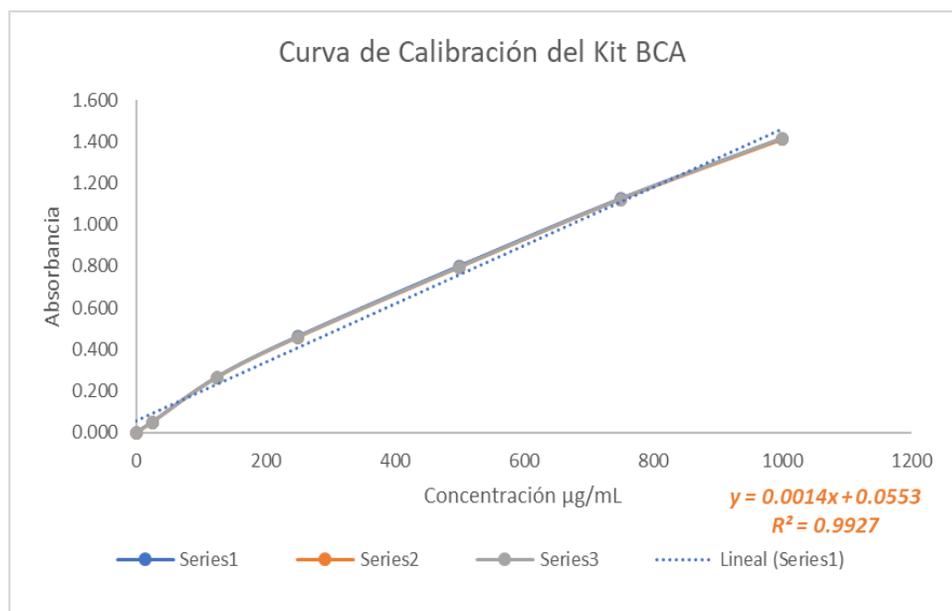


Figura 41: Promedios de las absorbancias para las tres curvas de calibración del Kit Pierce BCA Protein Assay.

Cálculos para la insulina encapsulada							
Nomenclatura	y (Abs) 1	y (Abs) 2	y (Abs) 3	MEDIA	DS	x (µg/mL) ENCAP	%EE
F1	0.109	0.107	0.109	0.108	0.00115	39.10	17.61
F2	0.215	0.212	0.213	0.213	0.00153	114.10	51.41
F3	0.167	0.163	0.167	0.166	0.00231	80.05	36.07
F4	0.289	0.290	0.291	0.290	0.00100	168.86	76.08
F5	0.142	0.143	0.148	0.144	0.00321	64.81	29.20
F6	0.244	0.245	0.249	0.246	0.00265	137.43	61.92
F7	0.075	0.076	0.080	0.000	0.00000	0.00	0.00

Cuadro 24: Tabla con las absorbancias obtenidas con un análisis de ELISA con ayuda del Kit Pierce BCA Protein Assay, de todos los formulados al romperse con el método de ultrasonificado para la cuantificación de insulina encapsulada en cada uno.

Nomenclatura	Tamaño de Partícula(d.nm)	Pdl	Potencial Z (mV)	x (µg/mL) ENCAPSULADA	%EE
F1	76.6	0.249	-45.76	39.10	17.61
F2	107.2	0.324	-51.00	114.10	51.41
F3	91.3	0.253	-48.13	80.05	36.07
F4	117.5	0.393	-32.50	168.86	76.08
F5	107.6	0.259	-37.06	64.81	29.20
F6	155.0	0.373	-37.73	137.43	61.92
F7	101.8	0.393	-20.30	0.00	0.00

Cuadro 25: Resumen de la caracterización y porcentaje de eficiencia de encapsulación de cada formulado, utilizando como medio de disolución PBS a pH de 7.4.

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se diseñó la metodología adecuada para la fabricación de liposomas unilaminares cargados con Insulex R.
- ✓ La elaboración de liposomas cargados con insulina por el método de calentamiento es una técnica eficiente, sencilla y fácil de realizar.
- ✓ La adición de Poloxamer 188 y Brij L23 mejoraron las características físicas de los liposomas, como son: el Tamaño de Partícula entre 100-200 d.nm, Índice de Polidispersión no mayor a 0.400 y el Potencial Z de -30 a -50 mV.
- ✓ Los formulados con las mejores caracterizaciones van de la mano con los mejores valores de eficiencia de encapsulación de la insulina, siendo los formulados F4 y F6 con 76% y 61% respectivamente, de la insulina total encapsulada.
- ✓ La ultrasonificación con ondas sonoras bajo un control de temperatura ayudó a la homogenización y con esto la caracterización de las formulaciones.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ A.A. D'souza y R. Shegokar, "Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016, URL: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17425247.2016.1182485?journalCode=iedd20>
- ❖ A.C. Grabski, "Chapter 18 Advances in preparation of biologicval extracts for protein purification", *Methods in Enzymology*, 2009, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687909630184>
- ❖ A. de Leiva, E. Brugués y A. de Leiva-Pérez, "El descubrimiento de la insulina: continúan las controversias después de noventa años", *Endocrinología y Nutrición*, 2011, URL: <https://www.elsevier.es/es-revista-endocrinologia-nutricion-12-articulo-el-descubrimiento-insulina-continuan-controversias-S1575092211003172>
- ❖ American Diabetes Association, 2013, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537273/>
- ❖ A. Hernández, "El pequeño mundo de los liposomas", *Biol. On-line*, 2017
- ❖ American Veterinary Medical Association, URL: <https://www.avma.org/>
- ❖ B. Almeida, O.K. Nag, K.E. Rogers y J.B. Delehanty, "Recent progress in bioconjugation strategies for liposome-mediated drug delivery", *Molecules*, 2020, URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/23/5672>
- ❖ B. Catchpole, J.P. Adams, A.L. Holder, A.D. Short, W.E.R. Ollier y L.J. Kennedy, "Genetics of canine diabetes mellitus: are the diabetes susceptibility genes identified in humans involved in breed susceptibility to diabetes mellitus in dogs?", *The Veterinary Journal*, 2013, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023312004856?via%3Dihub>
- ❖ B. Catchpole, L.J. Kennedy, L.J. Davison y W.E.R. Ollier, "Canine Diabetes Mellitus: from phenotype to genotype", *Journal of Small Animal Practice*, 2008, URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1748-5827.2007.00398.x>
- ❖ B. Catchpole, J.M. Ristic, L.M. Fleeman y L.J. Davison, "Canine diabetes mellitus: can old dogs teach us new tricks?", *Endocrinology*, 2005, URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00125-005-1921-1>
- ❖ C. Gilor, S.J.M. Niessen, E. Furrow y S.P. DiBartola, "What's in a name? Classification of Diabetes Mellitus in Veterinary Medicine and Why it matters",

- Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2016, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5108445/>
- ❖ C. Sebaaly, H. Greige, S. Stainmesse, H. Fessi y C. Charcosset, “Effect of composition, hydrogenation of phospholipids and lyophilization on the characteristics of eugenol-loaded liposomes prepared by ethanol injection method”, *Food Bioscience*, 2016, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429216300219>
 - ❖ D. Guimarães, A. Cavaco y E. Nogueira, “Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications”, *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517321003768>
 - ❖ D. Voet y J. Voet, “Bioquímica” Editorial Medica Panamericana, 2006.
 - ❖ J.A. Olivares y A. Arellano, “Bases moleculares de las acciones de la insulina”, *Facultad de Medicina*, 2008, URL: http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/01/f_Articulo2.pdf
 - ❖ J.E. Hernández y E. Rivera, “El poloxámero, un material fuera de lo ordinario”, *Ciencia y Desarrollo CONACyT*, URL: <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=492>
 - ❖ J. Kim y D.S. Chung, “Sample preparation for capillary electrophoretic applications”, *Analytical Techniques for Scientists*, 2012, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123813732001101?via%3Dihub>
 - ❖ Malvern Panalytical a spectris company, “Calorimetría de barrido diferencial (DSC)”, URL: <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/microcalorimetry/differential-scanning-calorimetry>
 - ❖ M. Brandl, “Liposomes as drug carriers: a technological approach”, *Biotechnology Annual Review*, 2001, URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1387265601070338?via%3Dihub>
 - ❖ M. Molina, “¿Qué significa realmente el valor de p?”, *Pediatría Atención Primaria*, 2017, URL: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1139-76322017000500014#:~:text=El%20valor%20de%20p%20nos%20indica%20la

[%20importancia%20del%20resultado,cl%C3%ADnico%20la%20establece%20el%20investigador.](#)

- ❖ M. Moshref, B. Tangey, C. Gilor, K.K. Papas, P. Williamson, L. Loomba-Albrecht, P. Sheehy y A. Kol, “Concise Review: Canine Diabetes Mellitus as a Translational Model for Innovative Regenerative Medicine Approaches”, *Stem Cells Translational Medicine*, 2019, URL: <https://academic.oup.com/stcltm/article/8/5/450/6403719>
- ❖ M. Sandoval, T. Cu, G. Peraza y P.O. Acereto, “Introducción en los procesos de encapsulación de moléculas nutraceuticas”, *Universidad Autónoma del Estado de Morelos*, 2017, URL: https://www.researchgate.net/publication/314105292_Introduccion_en_los_procesos_de_encapsulacion_de_moleculas_nutraceuticas
- ❖ M. Torelló, A. Viscasillas y A. del Pozo, “Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas”, *Offarm*, 2002, URL: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-liposomas-i-conceptos-generales-relacion-13038745>
- ❖ O. Andrade, E. Galarza, J. Narváez y M. Pesántez, “Prevalencia de Diabetes Mellitus en perros adultos con sobrepeso en Cuenca, Ecuador”, *Maskana*, 2017, URL: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1203>
- ❖ Organización Mundial de la Salud, *Diabetes*, 2021, URL: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- ❖ R.H. Dandan y L.L. Brunton, “Goodman y Gilman, Manual de farmacología y TERAPÉUTICA”, *Mc Graw Hill*, pp. 787-815, 2008.
- ❖ Royal Veterinary College, *University of London*, 2010, URL: <https://www.rvc.ac.uk/diabetesvet/>
- ❖ R.C. Rowe, P.J. Sheskey y M.E. Quinn, “Handbook of Pharmaceutical Excipients”, 6ta edición de *Pharmaceutical Press*, 2009.
- ❖ S. Furse y A.I.P.M. de Kroon, “Phosphatidylcholine’s functions beyond that of a membrane brick”, *Molecular Membrane Biology*, 2015, URL: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/09687688.2015.1066894>
- ❖ S.J.M. Niessen, K. Hazuchova, S.L.Powney, J. Guitian, A.P.M. Niessen, P.D. Pion, J.A. Shaw y D.B. Church, “The Big Pet Diabetes Survey: Perceived frequency and triggers for euthanasia”, *Veterinary Sciences*, 2017, URL: <https://www.mdpi.com/2306-7381/4/2/27/htm>

- ❖ S.M. Arciniegas, M.J. Bernad, S.C. Caballero, D. Vargas, “Glucose Response in Animals Induced with Experimental Diabetes Type 1 after Treatment with Human Insulin Exposed to High Temperatures”, *Transylvanian Review*, 2017, URL: https://www.researchgate.net/publication/322897497_Glucose_Response_in_Animals_Induced_with_Experimental_Diabetes_Type_1_after_Treatment_with_Human_Insulin_Exposed_to_High_Temperatures
- ❖ S.M. Arciniegas, M.J. Bernad, R. López, R. Díaz, S.C. Caballero, D. Vargas, “In Vitro and In Vivo Profiles and Characterization of Insulin Nanocarriers Based in Flexible Liposomes Designed for Oral Administration”, *Letters in Drug Design & Discovery*, 2012, URL: <https://www.eurekaselect.com/article/95657>
- ❖ S.M. Arciniegas, S.A. Saavedra, D. Balderas, S.C. Caballero, M.J. Bernad, J.C. Sánchez, M.I. Gracia, H.A. Rico, D. Vargas, “Comparison in the Glucose Response of Flexible Liposomes Loaded with Insulin with the Addition of Different Surfactants in a Experimental Diabetes Model”, *Letters in Drug Design & Discovery*, 2020, URL: <http://www.eurekaselect.com/article/101845>
- ❖ Software IBM® SPSS® URL: <https://www.ibm.com/mx-es/analytics/spss-statistics-software>
- ❖ Soporte de Minitab® 21, “¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples?”, URL: <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistical-modeling/anova/supporting-topics/multiple-comparisons/what-is-tukey-s-method/>
- ❖ S.Y. Lin, “Current and potential applications of simultaneous DSC-FTIR microspectroscopy for pharmaceutical analysis”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 2021, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9261823/>
- ❖ T. Donner y S. Sarkar, “Insulin-Pharmacology, Therapeutic regimens, and Principles of intensive insulin therapy”, *Endotext*, 2019, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278938/>
- ❖ Thermo Fisher Scientific, Manual “Pierce™ BCA Protein Assay Kit”.
- ❖ W.H. de Jong y P.J.A. Borm, “Drug, “Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards”, *International Journal of Nanomedicine*, 2008, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2527668/>