



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Desarrollo de un sistema auto-nanoemulsificable (SNEDDS)
para la administración de insulina por vía oral**

P R E S E N T A:

Diego Alberto Bravo Alfaro

ASESORES:

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dra. Cynthia Cano Sarmiento

Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez

H. VERACRUZ, VER. MÉXICO.

Mayo 2018

RESUMEN

Bravo Alfaro, Diego Alberto. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Abril del 2018. Desarrollo de un sistema auto-nanoemulsificable (SNEDDS) para la administración de insulina por vía oral. Asesores Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dra. Cynthia Cano Sarmiento, Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez.

El actual método para la administración de insulina se realiza por vía subcutánea, lo cual lo hace un método doloroso e incómodo. En la actualidad no se cuenta con un método efectivo para la administración oral de insulina; sin embargo, en los últimos años, se han estudiado diversos tipos de sistemas nanoestructurados para lograr dicho objetivo. Los sistemas de liberación de fármacos auto-nanoemulsificables (SNEDDS, por sus siglas en inglés) se definen como mezclas de aceite, fármaco, tensoactivo y co-tensoactivo, los cuales pueden formar nanoemulsiones al ser mezcladas en medios acuosos. En investigaciones recientes se ha logrado incorporar insulina dentro de estos sistemas mediante la formación de complejos con fosfatidilcolina (PC); sin embargo, en la actualidad estos sistemas han mostrado una buena bioaccesibilidad, pero muy poca absorción. En el presente trabajo, se ha propuesto la incorporación de ácidos grasos de cadena media (AGCM) a los fosfolípidos formadores del complejo para aumentar la biodisponibilidad oral de la insulina, puesto que los AGCM no son buenos sustratos para las lipasas y son absorbidos más fácilmente por el epitelio intestinal. Para lograrlo se evaluó la formación de SNEDDS utilizando Lauroglycol FCC como aceite, Cremophor EL como tensoactivo y Labrafil M1944CS como co-tensoactivo a tres distintas concentraciones. Por otra parte, se utilizó fosfolipasa A1 (PLA1) para modificar enzimáticamente la PC, incorporando ácidos grasos de cadena media (PCM). Posteriormente se formaron complejos insulina-PC e insulina-PCM. Para estudiar el efecto de la incorporación de los complejos en los SNEDDS se evaluaron dos concentraciones de complejo en la fase oleosa del sistema (2.5 y 5%) y su bioaccesibilidad se estimó mediante un sistema *in vitro*. Por último, la biodisponibilidad y la bioactividad se evaluaron en un modelo murino con diabetes inducida. Los resultados mostraron la formación de SNEDDS con tamaños de

partícula de entre 20 a 48 nm bajo agitación de 300 rpm en un tiempo de 3 min. Por otro lado, se logró la incorporación molar de un 57.4% de AGCM a la PC y se encontró que a concentraciones de 2.5% de complejo dentro de la SNEDDS no se alteraron las propiedades de la nanoemulsión, logrando la incorporación del 67% de la insulina. Los estudios de bioaccesibilidad *in vitro* demostraron que hasta el 35.7% de la hormona llegó bioaccesible hasta las condiciones finales del intestino delgado; y por último se observó una reducción de los niveles de glucosa de hasta el 35.6% a las 4 h de administración del tratamiento, alcanzando una bioaccesibilidad del 1.8% con respecto a la inyección subcutánea.

ABSTRACT

Bravo Alfaro, Diego Alberto. M. Sc. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. April 2018. Development of a self-nanoemulsifying system (SNEDDS) for oral administration of insulin. Advisors: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dr. Cynthia Cano Sarmiento, Dr. Jorge Fernando Toro Vázquez.

The current method for the administration of insulin is carried out subcutaneously, which makes it a painful and uncomfortable method. Currently there is no effective method for the oral administration of insulin; however, in recent years, various types of nanostructured systems have been studied to achieve this goal. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) are defined as mixtures of oil, drug, surfactant and co-surfactant which can form nanoemulsions when mixed in aqueous media. Recent studies have managed to incorporate insulin into these systems through the formation of complexes with phosphatidylcholine (PC). However, at present these systems have demonstrated good bioavailability, but poor absorption. In the present work we thrived to increase the oral bioavailability of insulin via the incorporation of medium chain fatty acids (MCFA) to the phospholipids forming the complex, since the MCFA are not good substrates for lipases and are more easily absorbed by the intestinal epithelium. To achieve this, the formation of SNEDDS was evaluated using Lauroglycol FCC as an oil, Cremophor EL as a surfactant and Labrafil M1944CS as a co-surfactant at three different concentrations. Phospholipase A1 (PLA1) was used to modify PC incorporating medium chain fatty acids and subsequently insulin-PC complexes were formed. To study the effect of the incorporation of the complexes on the SNEDDS, two concentrations of complex in the oil phase of the system (2.5 and 5%) were evaluated, and their bioavailability was estimated by an *in vitro* system. Finally, the bioavailability and bioactivity of the preparations were evaluated in a murine model with chemically-induced diabetes. The results showed the formation of SNEDDS with particle sizes between 20 to 48 nm under agitation of 300 rpm in 3 min. Furthermore, a molar incorporation of 57.4% of MCFA to the PC was achieved and it was found that at concentrations of 2.5% of complex within the SNEDDS the properties of the nanoemulsion were not altered. Thus, the incorporation of 67% of insulin was achieved. *In vitro* bioaccessibility

studies showed that up to 35.7% of the hormone reached bioavailability until the final conditions of the small intestine and finally a reduction of glucose levels was observed in up to 35.6% at 4h of treatment administration, reaching a bioaccessibility of 1.8% with respect to the subcutaneous injection.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
1 ANTECEDENTES	3
1.1 Diabetes mellitus.....	3
1.1.1 Diabetes tipo 1	5
1.1.2 Diabetes tipo 2	6
1.1.3 Diabetes mellitus gestacional	7
1.2 Páncreas endocrino	8
1.3 Insulina	10
1.3.1 Mecanismo de acción de la insulina	11
1.3.2 Efectos metabólicos de la insulina.....	13
1.3.3 Administración subcutánea de insulina	15
1.3.4 Complicaciones en la administración subcutánea de insulina.....	16
1.4 Administración oral de fármacos proteicos	16
1.5 Nanosistemas basados en lípidos.....	18
1.6 Incorporación de péptidos en nanosistemas para su administración por vía oral.....	19
1.7 Fosfolípidos.....	21
1.7.1 Modificación enzimática de fosfolípidos	22
1.8 Ácidos grasos de cadena media	24
1.9 Nanoemulsiones	26
1.9.1 Tipos de nanoemulsiones	28
1.9.2 Formación de nanoemulsiones.....	29

1.10.1 Sistemas de Liberación de Fármacos Auto-nanoemulsificables (SNEDDS)	33
1.11 Propiedades de las nanoemulsiones	35
1.12 Emulsificantes	36
1.12.1 Tipos de emulsificantes	37
1.12.2 Valor HLB	37
1.13 Digestión de emulsiones	38
1.13.1 Boca	39
1.13.2 Estómago	39
1.13.3 Intestino delgado	40
1.13.4 Absorción de emulsiones	41
2 JUSTIFICACIÓN	45
3 HIPÓTESIS	46
4 OBJETIVOS	47
4.1 Objetivo general	47
4.2 Objetivos específicos	47
5 MATERIALES Y MÉTODOS	48
5.1 Materiales y reactivos	48
5.2 Obtención de fosfatidilcolina modificada con ácidos grasos de cadena media a partir de fosfatidilcolina de soya mediante modificación enzimática	48
5.2.1 Inmovilización de enzima fosfolipasa en Duolita	48
5.2.2 Cuantificación de la retención de enzima en Duolita	49
5.2.3 Síntesis de fosfatidilcolina modificada rica en AGCM a partir de PC de soya	49
5.2.4 Determinación de la incorporación de los ácidos grasos de cadena media a la fosfatidilcolina	50

5.2.5 Determinación del rendimiento de la reacción de acidólisis de PC-modificada.....	50
5.2.6 Purificación de PC-modificada por cromatografía en columna.....	51
5.3 Elaboración del complejo insulina-PC e insulina-PCM.....	51
5.4 Pre-formulación del SNEDDS	52
5.4.1 Caracterización de las pre-formulaciones	53
5.5 Elaboración de diagrama de fases ternario	55
5.6 Elección del SNEDDS.....	55
5.7 Evaluación de los efectos y porcentaje de incorporación del complejo en los SNEDDS.....	55
5.8 Evaluación de la bioaccesibilidad en un sistema de digestión <i>in vitro</i>	56
5.9 Evaluación de la biodisponibilidad de la insulina de forma oral en un modelo murino.....	57
5.9.1 Inducción de diabetes experimental a ratas Wistar.....	57
5.9.2 Determinación de los niveles de glucosa en sangre	58
5.9.3 Evaluación de la biodisponibilidad oral de insulina en un modelo murino	59
5.9.4 Medición de la bioactividad oral de insulina en un modelo murino	59
5.9.5 Cuantificación de concentración de insulina en sangre	60
5.10 Análisis estadístico	60
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
6.1 Modificación de fosfatidilcolina con ácidos grasos de cadena media.....	61
6.1.1 Inmovilización de enzima PLA ₁ en Duolita.....	61
6.1.2 Síntesis de Fosfatidilcolina modificada rica en AGCM utilizando PLA ₁ inmovilizada en Duolita.....	62
6.2 Preparación y caracterización de pre-formulaciones de SNEDDS.....	66

6.3 Incorporación del complejo insulina-fosfatidilcolina en los SNEDDS	73
6.3.1 Porcentaje de encapsulación de insulina	77
6.4 Bioaccesibilidad en un sistema de digestión <i>in vitro</i>	79
6.4.1 Porcentaje de bioaccesibilidad en sistema <i>in vitro</i>	85
6.5 Evaluación de la biodisponibilidad y bioactividad en un modelo murino	86
6.5.1 Inducción de diabetes experimental	86
6.5.2 Evaluación de la bioactividad en un modelo murino	87
6.5.3 Evaluación de la biodisponibilidad en un modelo murino	90
7 CONCLUSIONES.....	94
8 BIBLIOGRAFÍA.....	95

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tipos celulares en los islotes de Langerhans del páncreas humano adulto	8
Tabla 2. Efectos endócrinos de la insulina	14
Tabla 3. Fenómenos de inestabilidad de nanoemulsiones.....	27
Tabla 4. Valores de HLB en relación con las características físicas	38
Tabla 5. Diseño factorial para las formulaciones de las SNEDDS	53
Tabla 6. Composición de solución salival simulada	56
Tabla 7. Análisis de los efectos de variables independientes sobre las características de las pre-formulaciones de SNEDDS	67
Tabla 8. Formulaciones de SNEDDS monomodales con tamaños menores a 200nm	68
Tabla 9. Efectos de la concentración del complejo insulina-PC y PCM sobre el sistema 3.....	74
Tabla 10. Efecto de la concentración del complejo insulina-PC y PCM sobre el sistema 9.....	74
Tabla 11. Efecto de la concentración del complejo insulina-PC y PCM sobre el sistema 12.....	74
Tabla 12. Resultados obtenidos para la encapsulación de insulina en nanosistemas en otros trabajos publicados	78
Tabla 13. Influencia de las etapas del sistema <i>in vitro</i> sobre el PDI del SNEDDS del T3	81
Tabla 14. Influencia de las etapas del sistema <i>in vitro</i> sobre el PDI del SNEDDS del T9	82
Tabla 15. Influencia de las etapas del sistema <i>in vitro</i> sobre el PDI del SNEDDS del T12	83
Tabla 16. Efecto hipoglucémico de la administración oral de los distintos tratamientos	89
Tabla 17. Parámetros farmacocinéticas después de las dosis de los diferentes tratamientos	92

Tabla 18. Resultados obtenidos de biodisponibilidad en otros trabajos publicados y en el presente trabajo..... 93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de diabetes mellitus en población adulta entre 20 y 79 años de edad en los países de la OCDE 2010.	4
Figura 2. Anatomía y fisiología de las células β pancreáticas	9
Figura 3. Estructura primaria y secundaria de la insulina	10
Figura 4. Síntesis de insulina	11
Figura 5. Receptores insulínicos localizados en la membrana celular.....	12
Figura 6 Administración de insulina subcutánea.....	15
Figura 7. Principales nanosistemas basados en lípidos	18
Figura 8. Estrategias para mejorar la incorporación de péptidos hidrofílicos en nanosistemas.....	20
Figura 9. Estructura de un fosfolípido.....	21
Figura 10. Sitio de acción de las fosfolipasas	24
Figura 11. Estructura de los Ácidos Grasos de Cadena Media (AGCM)	25
Figura 12. Tipo de emulsión según la fase.....	29
Figura 13. Representación esquemática de la preparación de nanoemulsiones mediante métodos de alta energía	30
Figura 14. Mecanismo de formación de nanoemulsiones espontáneas	32
Figura 15. Condiciones fisiológicas y fisicoquímicas de las distintas regiones del sistema gastrointestinal.....	41
Figura 16. Mecanismos de absorción de emulsiones a través del epitelio intestinal	44
Figura 17. Cinética de la inmovilización de la enzima PLA1 en Duolita.....	61
Figura 18. Cromatograma obtenido para la composición de ácidos grasos de fosfatidilcolina sin modificar	63
Figura 19. Porcentaje molar de incorporación de AGCM en PC por la enzima PLA1	64
Figura 20. Cromatograma de la composición de ácidos grasos en PCM	64
Figura 21. Cinética de incorporación de AGCM, rendimiento de PC y PCM en la reacción de acidólisis catalizada por PLA1	65

Figura 22. Cromatogramas de los productos de la reacción de acidólisis: (A) tiempo cero de la reacción donde el pico (1) corresponde a AG, (2) a PC y (B) el tiempo a las 24 h de reacción, donde el pico (1) corresponde a AG, (2) PC, (3) PCM y (4) LPC	65
Figura 23. Diagrama de fases ternario de la zona de nanoemulsificación espontánea	68
Figura 24. Efecto de la fase oleosa, surfactante y co-surfactante sobre el PDI: (a) Efecto de la fase oleosa vs surfactante, (b) efecto de la fase oleosa vs co- surfactante, (c) efecto del surfactante vs co-surfactante	70
Figura 25. Efecto de la fase oleosa, tensoactivo y co-tensoactivo sobre el tamaño de partícula: (a) Efecto de fase oleosa vs tensoactivo, (b) efecto de fase oleosa vs co-tensoactivo, (c) efecto del tensoactivo vs co-tensoactivo.....	71
Figura 26. Efecto de la fase oleosa, surfactante y co-surfactante sobre el potencial Z: (a) Efecto de la fase oleosa vs surfactante, (b) efecto de la fase oleosa vs co- surfactante, (c) efecto del surfactante vs co-surfactante	72
Figura 27. Distribución de tamaños de nanoemulsiones: (A) Tratamiento 3, (B) Tratamiento 9, (C) Tratamiento 12, (D) Tratamiento 25, (E) Tratamiento 22, (F) Tratamiento 13.....	73
Figura 28. Distribución de tamaños de partícula de las distintas concentraciones de complejo en el sistema 3: complejo con PC a) y complejo con PCM b)	75
Figura 29. Distribución de tamaños de partícula de las distintas concentraciones de complejo en el sistema 9: complejo con PC a) y complejo con PCM b)	76
Figura 30. Distribución de tamaños de partícula de las distintas concentraciones de complejo en el sistema 12: complejo con PC a) y complejo con PCM b)	76
Figura 31. Porcentajes de encapsulación de insulina logrados en los T3, T9 y T9 con complejos de PC y PCM	77
Figura 32. Influencia de las etapas del sistema <i>in vitro</i> sobre el tamaño promedio de partícula del SNEDDS del T3.....	81
Figura 33. Influencia de las etapas del sistema <i>in vitro</i> sobre el tamaño promedio de partícula del SNEDDS del T9.....	82

Figura 34. Influencia de las etapas del sistema <i>in vitro</i> sobre el tamaño promedio de partícula del SNEDDS del T12.....	83
Figura 35. Distribución de tamaños de partícula del sistema 3 al ser sometido a las condiciones <i>in vitro</i> : (a) SNEDDS inicial, (b) fase de boca, (c) fase de estómago, (d) fase de intestino	84
Figura 36. Bioaccesibilidad <i>in vitro</i> final de los diferentes tratamientos	86
Figura 37. Niveles de glucosa postprandial de ratas Wistar 6 días posteriores a la dosificación de estreptozotocina.....	87
Figura 38. Efecto hipoglucémico de la administración subcutánea de insulina (sc), insulina oral en solución acuosa (Libre), insulina oral en complejo con PC modificada y SNEDDS (SNEDDS CIPCm) e insulina oral en complejo con PC y SNEDDS (SNEDDS CIPC). Los resultados se expresan como promedio \pm DS, n=5	89
Figura 39. Niveles de insulina en sangre posteriores a la aplicación de insulina sc (1.5UI/kg), administración oral de solución de insulina (50 UI/kg), SNEDDS con complejo PC (50 UI/kg) y SNEDDS con complejo PCM(50 UI/kg). Los puntos representan el promedio \pm DS (n=5).	92

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades más comunes y en mayor aumento en el siglo XXI, según estimaciones de la organización mundial de la salud, alrededor del mundo hay 366 millones de personas que se ven afectadas por este padecimiento, y solo en nuestro país según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la cifra asciende a 9.2% de la población adulta. La DM se define como un conjunto de trastornos metabólicos, cuya característica principal son los altos niveles de glucosa en sangre. Es provocada por un defecto en la producción de insulina y/o a la resistencia de su acción. El principal tratamiento para esta enfermedad consiste en la aplicación de inyecciones constantes; sin embargo, esto resulta muy doloroso para los pacientes, pueden resultar infecciones si no le lleva una buena asepsia y, además, a largo plazo se pueden desarrollar afecciones en la piel como las lipodistrofias que disminuyen la absorción de la hormona. Para resolver los problemas que trae consigo el suministro de insulina subcutánea, se han buscado otras vías de administración, siendo la forma oral una de las más tentativas, por su fácil provisión y liberación controlada.

En los últimos años los sistemas de liberación de fármacos auto-nanoemulsificables (SNEDDS) han despertado el interés de las industrias farmacéuticas debido a su capacidad de formar nanoemulsiones en cuestión de segundos y sin la aplicación de energía. Las SNEDDS se definen como mezclas de aceite, fármaco, tensoactivo y co-tensoactivo, los cuales forman nanoemulsiones al entrar en contacto con el agua y en medios de agitación suave como la proporcionada por la motilidad del estómago o los movimientos peristálticos del intestino. En los últimos años los SNEDDS han recibido mucha atención para su aplicación en la liberación controlada de fármacos proteicos de forma oral como la ciclosporina. Por lo anterior, se ha probado la aplicación de SNEDDS en varios estudios para el suministro de insulina oral. Sin embargo, hasta hoy los mejores resultados muestran una eficiencia muy poco alentadora del 7.7% en comparación con el método subcutáneo. Una de las técnicas más recientes y prometedoras consiste en rodear de micelas inversas de fosfatidilcolina (PC) a las moléculas de

insulina, y posteriormente incorporarla como fase oleosa en SNEDDS. Sin embargo, la PC posee ácidos grasos de cadena larga, que son muy poco permeables al epitelio intestinal y además son muy susceptibles a lipasas pancreáticas. Los ácidos grasos de cadena media por el contrario pueden ingresar fácilmente a la mucosa intestinal, además de que no son un buen sustrato de las lipasas pancreáticas.

El objetivo de este trabajo consiste en rodear a la insulina con micelas inversas de fosfatidilcolina modificada (PCM) rica en ácidos grasos de cadena media y posteriormente aplicarla como fase oleosa en un SNEDDS, con el fin de mejorar la biodisponibilidad del fármaco en un modelo murino de ratas Wistar con diabetes inducida. Para esto se han planteado los siguientes objetivos específicos: Modificar enzimáticamente PC con ácidos grasos de cadena media; formar un complejo insulina-PCM; Caracterizar, evaluar y seleccionar un SNEDDS cargado del complejo insulina-PCM, y, por último, evaluar la bioaccesibilidad en un sistema de digestión *in vitro*, así como la biodisponibilidad de la insulina cargada en el SNEDDS en un modelo de ratas Wistar con diabetes inducida.

1 ANTECEDENTES

1.1 Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento que está asociado a estilos de vida poco saludables (obesidad y/o sobrepeso; vida sedentaria y alimentación rica en azúcares y grasas) y a la predisposición de factores genéticos. Desde el punto de vista clínico es un grupo heterogéneo de procesos cuya característica común es la hiperglucemia, como resultado de defectos de secreción de insulina, habitualmente por la destrucción de las células beta pancreáticas de origen autoinmunitario en la DM tipo 1, o una progresiva resistencia a la acción periférica de la insulina, con o sin déficit asociado en la secreción, en la DM tipo 2 (Ruiz *et al.*, 2006). Sus efectos incluyen daños a largo plazo, disfunción y fallo de múltiples órganos. Cuando no se trata, la DM se reconoce por el aumento crónico de la concentración de glucosa en sangre. Esto va acompañado algunas veces de síntomas de sed intensa, micción profusa, pérdida de peso y estupor, que culminan en coma y muerte cuando no se administra un tratamiento efectivo. Con más frecuencia, los síntomas observados son mucho menos graves y no despiertan sospechas; y a veces estos síntomas nunca se presentan.

Varios procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la DM. Estos procesos incluyen la destrucción de las células β del páncreas con una consecuente deficiencia de la producción de insulina, y algunas otras que resultan en la resistencia a la acción de la insulina. Las anomalías en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas se deben principalmente a la acción deficiente de la insulina sobre los tejidos, resultado de una insensibilidad o falta de insulina (Alberti *et al.*, 1998).

Estimaciones de la organización mundial de la salud indican que, a nivel mundial, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con diabetes. De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes, China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México son, en ese orden, las naciones con mayor número de pacientes diabéticos (Hernández *et al.*, 2013). Datos recientes estiman

que alrededor de 366 millones de personas en el mundo han sido diagnosticadas con diabetes (tipo 1 y tipo 2), y el número de casos aumenta continuamente (Li *et al.*, 2014). En nuestro país este problema muestra una dimensión más crítica, toda vez que la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) ubica a México en el primer lugar en la prevalencia de DM en la población de entre 20 y 79 años.

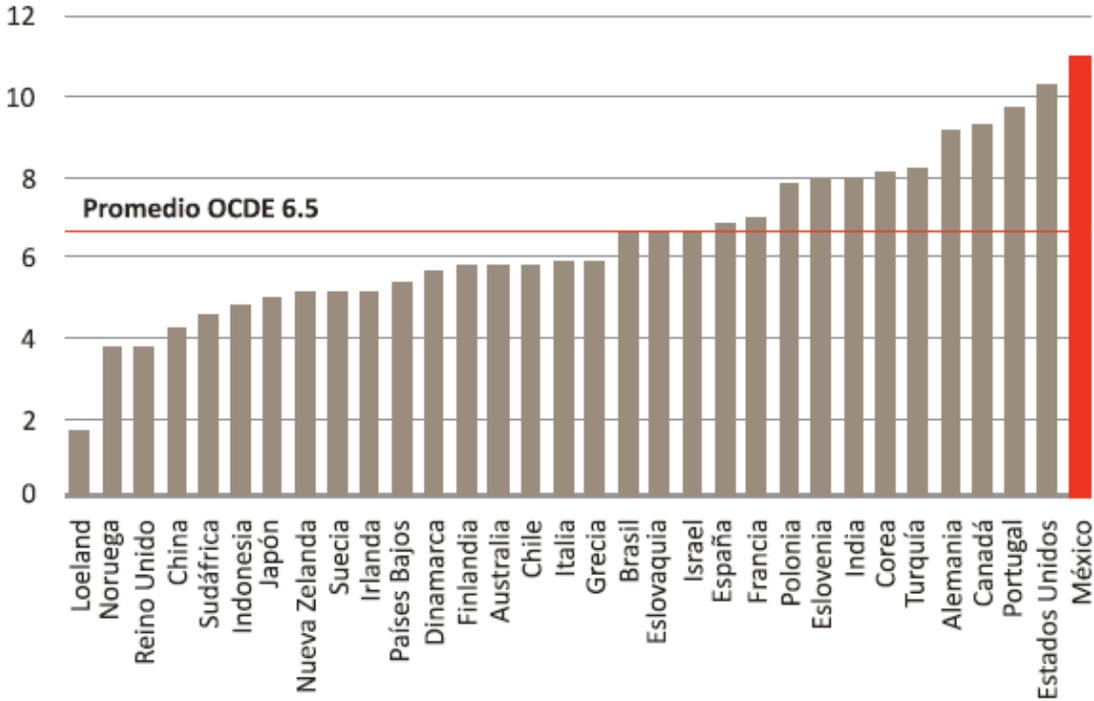


Figura 1. Prevalencia de diabetes mellitus en población adulta entre 20 y 79 años de edad en los países de la OCDE 2010. (D.R. Secretaría de Salud, 2013)

Desde 1940 en la república mexicana la diabetes ya se encontraba dentro de las 20 causas de mortalidad, con una tasa de 4.2 por 100,000 habitantes. Pese a ello, se le consideraba una enfermedad poco frecuente (1% de la población adulta). Las consecuencias de la enfermedad crecieron a partir de 1970, cuando la diabetes ocupó el 15° lugar como causa de muerte. Diez años después ocupó el noveno lugar, y para 1990 alcanzó el cuarto lugar como causa de mortalidad general. A partir del siglo XXI, la diabetes es ya la primera causa de mortalidad en mujeres y la segunda en hombres (Fernández *et al.*, 2007).

1.1.1 Diabetes tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es conocida como DM insulino-dependiente. Se cree que es el resultado de una compleja interacción entre la predisposición genética y trastornos del sistema autoinmune (causados por una reacción auto-antigénica de los linfocitos T, los cuales atacan y destruyen las células β de los islotes de Langerhans) (Yeung *et al.*, 2010). Una vez que las células β son destruidas, la capacidad de producir insulina cuando los niveles de glucosa en el cuerpo aumentan se anula, lo que conduce a un diagnóstico clínico de hiperglucemia (Liu *et al.*, 2015). En la DM1, la susceptibilidad genética se ha asociado a varios genes del sistema antígeno leucocitario humano. La concordancia entre gemelos idénticos es cercana al 50%, y la probabilidad de desarrollar DM1 en hijos de padres con el padecimiento es de 15 a 30 veces mayor que en la población general sin DM (Ruiz *et al.*, 2006).

Más del 50% de los enfermos afectados con DM1 son diagnosticados durante los primeros años de vida. Hay una extrema varianza en la incidencia de esta patología en las distintas regiones del mundo que alcanza una amplitud de hasta 350 veces. Esta incidencia puede variar, por ejemplo, de 0.1/100,000 habitantes por año en países asiáticos como China, a más de 45/100,000 habitantes al año en países nórdicos como Finlandia. En líneas generales, la incidencia es mayor en poblaciones de origen europeo y caucásico, y la incidencia es baja en países con una proporción elevada de grupos étnicos como China, Perú o México (Libman, 2009). Los mecanismos de estas incidencias geográficas y aumento en la tasa de personas diagnosticadas con DM1 siguen siendo hoy en día muy poco comprendidos (Atkinson *et al.*, 2014).

- Tratamiento

Hasta la fecha, no se ha encontrado un tratamiento clínico efectivo contra la diabetes tipo 1. Las terapias actuales se basan en la administración subcutánea de insulina para regular los niveles de glucosa. Sin embargo, este tratamiento requiere de múltiples inyecciones al día que resultan incómodas y dolorosas, e incluso en algunas ocasiones puede llevar a la infección del sitio de punción. Este tratamiento

a base de insulina, permite al paciente controlar sus niveles de glucosa en sangre, a través de la administración diaria de la hormona (Liu *et al.*, 2015).

1.1.2 Diabetes tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) frecuentemente llamada diabetes mellitus no insulino-dependiente, es una enfermedad grave y costosa que afecta al 9.2% de la población de México y se espera que siga aumentando hasta un 15.2% para el año 2035. Estos porcentajes no toman en cuenta a los pacientes que no han sido diagnosticados (Salinas *et al.*, 2016); es el tipo de DM más común y suele representar el 90% de los casos. Su tratamiento previene algunas de sus complicaciones devastadoras, pero no suele restaurar los niveles de glucosa normales. El diagnóstico a menudo se retrasa hasta que las complicaciones están presentes. Dado que los métodos actuales de tratamiento de la DM2 siguen siendo insuficientes, su prevención es preferible. La hipótesis de que la diabetes tipo 2 es prevenible está respaldada por diversos estudios con personas con riesgo a padecer la enfermedad que llevan una vida saludable con dieta y ejercicios (Golden *et al.*, 2016). La DM2 resulta de la interacción entre la predisposición genética y los factores conductuales como la alimentación y el ejercicio. A pesar de que las bases genéticas de la DM2 siguen sin identificarse, hay una fuerte evidencia de que los principales factores de riesgo como la obesidad, son modificables (Tuomilehto *et al.*, 2012).

En cuanto a la resistencia a la insulina en este tipo de diabetes, existen múltiples causas; algunas, las menos frecuentes, se deben a defectos intrínsecos hereditarios en la función de las células diana, ya sean por defectos desconocidos o debido a mutaciones en el receptor de la insulina. Las más frecuentes son las causas secundarias debido a anticuerpos frente a la insulina o a su receptor (Tébar, 2009).

- **Tratamiento**

En personas con DM2 se recomienda la realización de ejercicio físico regular y continuado y una dieta rigurosa; sin embargo, se ha observado que un tratamiento

a base de actividad física y buena alimentación no permiten en la mayoría de los pacientes un buen control más allá de un año, requiriendo la ayuda de fármacos antidiabéticos orales, que según su mecanismo de acción actúan sobre los diversos factores causantes de la hiperglucemia. Unos intervienen sobre el déficit de secreción de insulina por agotamiento de la célula pancreática, otros actúan sobre la resistencia a la insulina, otros a la sobreproducción hepática de glucosa y unos más ejercen sus efectos reduciendo la velocidad de absorción de glucosa a nivel intestinal (Turner, 1998).

- Metformina: es el fármaco de elección para el inicio de la terapia farmacológica en personas con DM2. Su principal efecto es disminuir la producción hepática de glucosa con lo que disminuye la glucemia en ayunas (Salpeter *et al.*, 2010).
- Sulfonilureas: reducen la glicemia al aumentar la secreción de insulina (Turner *et al.*, 1999).
- Repaglidinas: es un derivado del ácido carbamoilmetilbenoil, que actúa aumentando el calcio intracelular, lo cual provoca un rápido aumento en la secreción de insulina por parte del páncreas (Rizzo *et al.*, 2004).
- Inhibidores de α -glucosidasas: actúan inhibiendo las α -glucosidasas intestinales retrasando la absorción de glucosa procedente de los alimentos (Lebovitz, 1997).
- Insulina: No suele ser necesaria al inicio, sin embargo, puede utilizarse de forma transitoria en aquellas personas en las que se precise una estabilización inicial de la enfermedad o con pacientes con sintomatología importante o niveles de glucosa muy elevados.

1.1.3 Diabetes mellitus gestacional

La diabetes mellitus gestacional (DMG) es definida como la intolerancia a la glucosa que se detecta por primera vez durante el embarazo. La DMG afecta aproximadamente al 3-5% de los embarazos, dando como resultado más de 200,000 casos por año (Bellamy *et al.*, 2009). Consiste en un embarazo

diabetogénico caracterizado por la resistencia a la insulina y que tiene como resultado un aumento en la respuesta de las células β y una consecuente hiperinsulinemia (S.K., 2008). Esta condición se asocia a efectos negativos en el embarazo como macrosomía fetal, muerte fetal, alteraciones metabólicas neonatales; además se ha demostrado que los descendientes de madres con DMG tienen un mayor riesgo de contraer obesidad y DM. De igual forma las mujeres que han padecido el trastorno tienen mayores posibilidades de desarrollar DM posterior al embarazo (Coustan, 2013).

1.2 Páncreas endocrino

El páncreas es un órgano complejo que mide alrededor de 10 cm de largo y pesa unos 100 g; comprende dos tipos de glándulas funcionalmente distintas: exocrinas, las principales glándulas digestivas del cuerpo (productoras de enzimas); y las glándulas endocrinas, llamadas islotes de Langerhans, fuente de insulina y glucagón entre otras hormonas. El páncreas endocrino consiste en cerca de un millón de islotes de Langerhans, cada uno de los cuales es un agregado de decenas a miles de células (Cade *et al.*, 2017). El volumen de los islotes representa entre 1 y 1.5% de la masa total del páncreas, y pesa alrededor de 1 a 2 gramos en los humanos adultos. Se han identificado al menos cinco tipos celulares α , β , δ , ϵ y pp en los islotes. Cada uno de estos tipos celulares produce una hormona peptídica distintiva: glucagón, insulina, somatostatina, grelina y polipéptido pancreático respectivamente, como se muestra en la Tabla 1 (Gardner, 2012).

Tabla 1. Tipos celulares en los islotes de Langerhans del páncreas humano adulto (Gardner, 2012)

Tipo celular	Porcentaje aproximado del volumen en el islote	Productos secretorios
Célula α	25%	Glucagón, proglucagón
Célula β	55%	Insulina, péptido C, proinsulina
Célula δ	10%	Somatostatina
Célula ϵ	3%	Grelina
Célula PP	5%	Polipéptido pancreático

El páncreas del adulto medio contiene aproximadamente 200 unidades de insulina (equivalentes a aproximadamente 8 mg). La secreción diaria de insulina se estima entre 35 y 50 Unidades Internacionales (UI). Aunque muchos acontecimientos fisiológicos pueden alterar la secreción de insulina, el factor regulador más importante es la concentración de glucosa en sangre que riega el páncreas. Cuando la glucemia excede de aproximadamente 100 mg por 100 mL, se estimula la liberación de insulina de las células β hacia el torrente sanguíneo como se ilustra en la Figura 2; y de igual manera, cuando la glucemia disminuye, se reduce la secreción de insulina. Según el método de análisis, el valor de la insulina en ayunas varía entre 10 y 20 μ U por mL y aumenta hasta 50 a 150 μ U por mL después de una comida o una carga de glucosa. Su desintegración biológica es menor de 10 min, de manera que desaparece rápidamente de la circulación por acción de hígado y riñones, aunque el tiempo de desintegración cambia cuando es administrada de forma intravenosa, en un tiempo de entre 30 y 60 min (Sodeman, 1978).

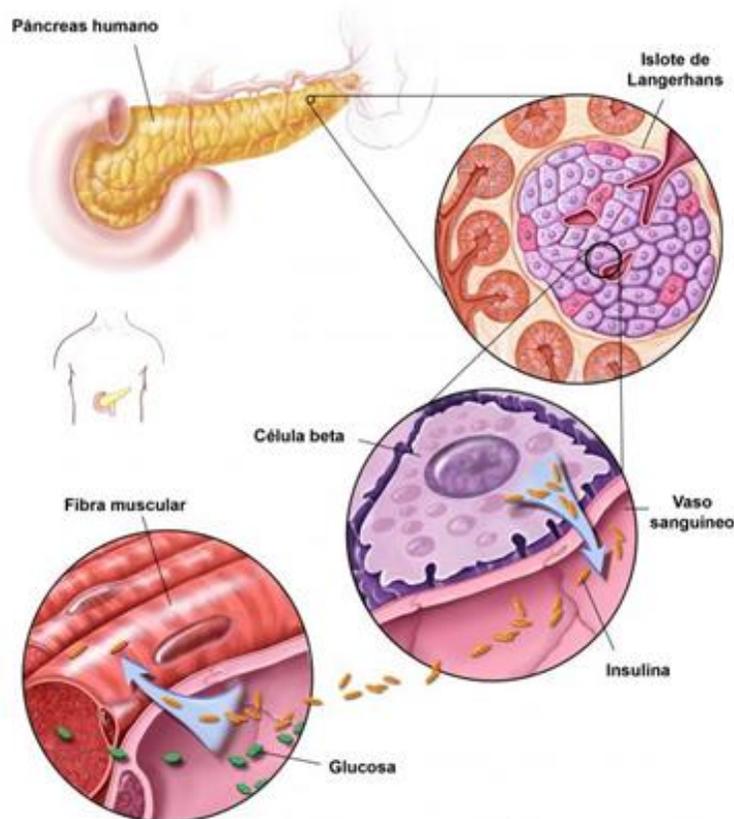


Figura 2. Anatomía y fisiología de las células β pancreáticas (Gardner, 2012)

1.3 Insulina

La insulina humana es una hormona dimérica formada por 51 aminoácidos distribuidos en dos cadenas (A y B), estabilizadas por dos enlaces disulfuro entre los residuos de A7 y B7, y A20 con B19. La cadena A consta de 21 aminoácidos y contiene un puente disulfuro interno entre A6 y A11, mientras que la cadena B contiene 30 aminoácidos (Brange *et al.*, 1993) como se muestra en la Figura 3.

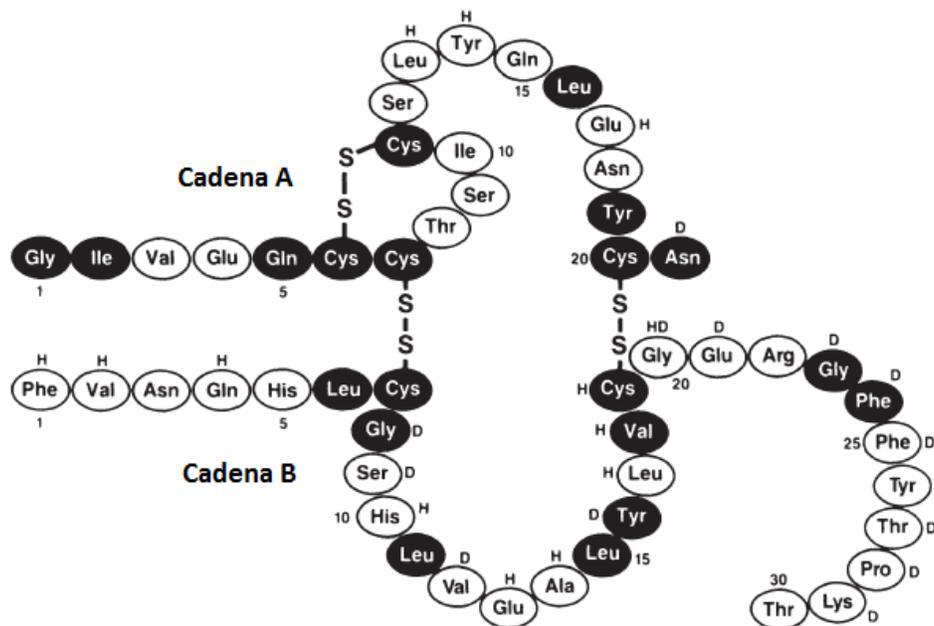


Figura 3. Estructura primaria y secundaria de la insulina (Brange *et al.*, 1993)

La insulina está codificada por un solo gen del cromosoma 11, se sintetiza y secreta en respuesta a la exposición de las células β a la glucosa. Es formada primeramente como una proteína preprohormona llamada preproinsulina en el retículo endoplásmico rugoso de las células β del páncreas. Procesos sucesivos de ruptura transforman esta molécula en proinsulina, antes de ser transportadas al aparato de Golgi, donde es transformada por proteasas a insulina y péptido C en una concentración equimolar; las estructuras de los precursores de la insulina, así como su transformación se aprecian de mejor manera en la Figura 4. La insulina tiene una vida media de 4 minutos y se degrada rápidamente en el hígado y los riñones mediante la enzima insulinasa. Por el contrario, el péptido C tiene una vida media

de 30 min y se secreta inalterado por los riñones, lo que lo convierte en un biomarcador útil de secreción de insulina endógena (Cade *et al.*, 2017).

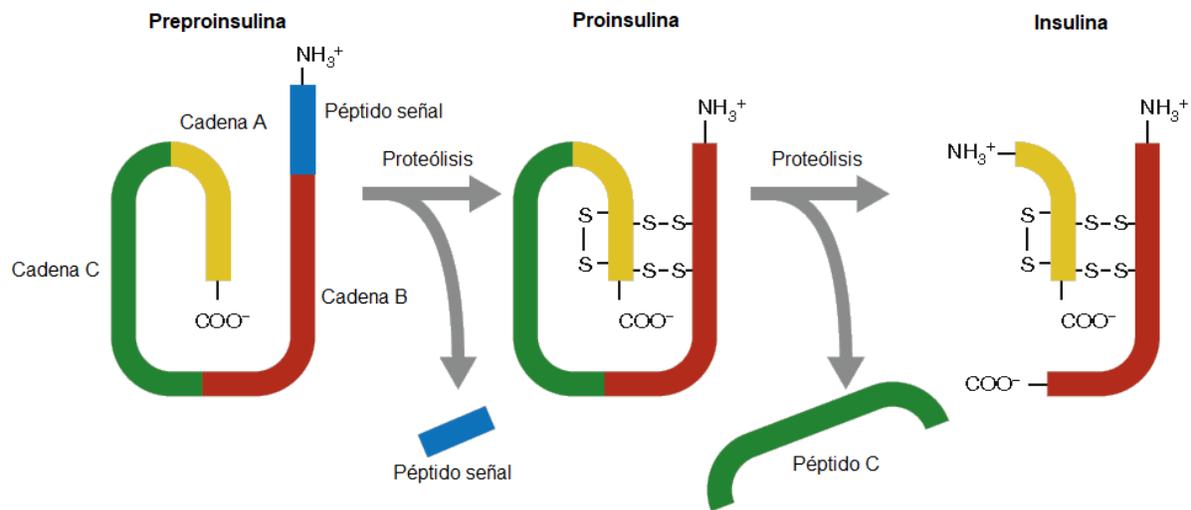


Figura 4. Síntesis de insulina (Cade *et al.*, 2017)

La estructura de la insulina es diferente entre diversas especies animales; por ejemplo, la estructura de la insulina porcina difiere solamente de un aminoácido de la posición 30 de la cadena B, mientras que la bovina difiere de 2 aminoácidos en la posición 8 y 10 de la cadena A. Sin embargo, en todos los vertebrados conserva una íntima similitud estructural, por lo tanto, las insulinas de procedencia animal tienen la misma efectividad que la humana (Jiménez *et al.*, 2002).

Biológicamente, la insulina es una de las hormonas anabólicas más importantes, necesaria para el transporte de la glucosa y aminoácidos a través de las membranas celulares, en la formación de glucógeno en el músculo esquelético, síntesis de lípidos y de ácidos nucleicos, así como de la síntesis de proteínas. Sin embargo, su principal función metabólica consiste en aumentar la velocidad de transporte de la glucosa hacia el interior de las células musculares y adiposas (Mendoza *et al.*, 2005).

1.3.1 Mecanismo de acción de la insulina

La insulina liberada por el páncreas, como respuesta al aumento en los niveles de glucosa en sangre, es transportada en la circulación hacia las células

diana en donde es reconocida por la porción extracelular del receptor insulínico (Mendoza *et al.*, 2005). La mayoría de las células del cuerpo tienen receptores insulínicos específicos en la superficie celular. Dichos receptores fijan la insulina con rapidez, con una elevada especificidad y con una afinidad lo suficientemente alta como para unir cantidades picomolares. Los receptores insulínicos son glucoproteínas de membrana compuestas por dos subunidades proteicas (α y β). La subunidad α reside extracelularmente donde se fija la molécula de insulina; la subunidad β cruza la membrana. Al unirse la insulina con la subunidad alfa, la subunidad beta se activa y promueve una compleja cascada de fosforilaciones y desfosforilaciones que regula una serie de reacciones celulares, entre ellas la activación de la fosfatidilinositol-3'-quinasa que estimula los transportadores de glucosa de la superficie celular, crucial para la captación de glucosa; este proceso puede apreciarse resumidamente en la Figura 5. La activación de las otras vías de señalización son las responsables de la inducción de síntesis de glucógeno, proteínas, lipogénesis y regulación de genes (Jameson, 2010).

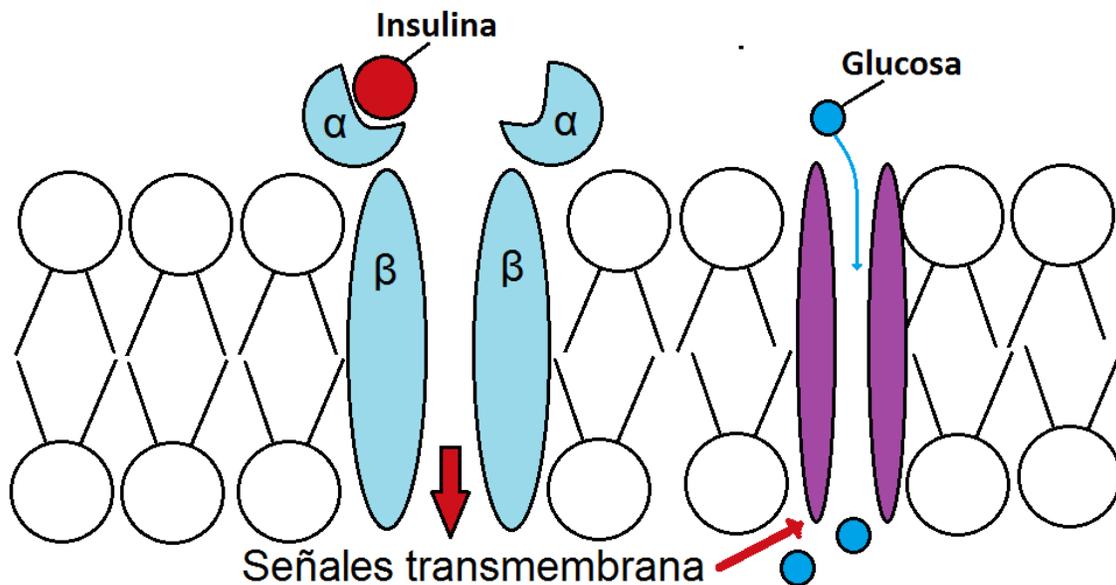


Figura 5. Receptores insulínicos localizados en la membrana celular

La aceleración del transporte de glucosa a través de la membrana celular es eficaz, sobre todo, en el músculo esquelético y el tejido adiposo; en conjunto estos

dos tejidos constituyen aproximadamente 65% del peso corporal total. Además, la insulina acelera el transporte de glucosa en el corazón y cuando menos en algunos órganos de músculo liso, como el útero. Por otra parte, ese efecto no tiene lugar en las células del cerebro, los eritrocitos, la mucosa intestinal, ni en el epitelio del riñón (Guyton *et al.*, 1977).

1.3.2 Efectos metabólicos de la insulina

El efecto aislado más importante de la insulina, es controlar la concentración de glucosa en sangre estimulando su transporte a través del músculo y el tejido adiposo e inhibiendo la producción de glucosa hepática (Lee *et al.*, 2016). En ausencia de insulina, el transporte de glucosa al interior de las células del cuerpo disminuye hasta la cuarta parte del valor normal. Por otro lado, cuando se secretan cantidades excesivas de insulina, y hay mucha glucosa disponible, el transporte de glucosa al interior de la célula puede llegar a ser cinco veces mayor que en condiciones normales. Aunque la insulina afecta la función de casi todos los tejidos del cuerpo de manera directa o indirecta, la Tabla 2 puede proveer de un breve resumen de los efectos de la insulina sobre los tejidos especializados en el metabolismo energético: hígado, músculo, tejido adiposo y cerebro (Gardner, 2012).

Tabla 2. Efectos endócrinos de la insulina (Gardner, 2012)

Tejido	Efecto de la insulina
Hígado	<p>Vías catabólicas:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Inhibe la glucogénesis - Inhibe la conversión de ácidos grasos y aminoácidos en cetoácidos - Inhibe la conversión de aminoácidos en glucosa <p>Vías anabólicas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Promueve el almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno - Aumenta la síntesis y el almacenamiento de lípidos y la formación de lipoproteínas de muy baja densidad
Músculo	<p>Síntesis de proteínas</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aumenta el transporte de aminoácidos - Aumenta la síntesis de proteínas ribosómicas <p>Síntesis de glucógeno</p> <ul style="list-style-type: none"> - Aumenta el transporte de glucosa - Aumenta el glucógeno sintasa - Inhibe la fosforilasa
Tejido adiposo	<p>Almacenamiento de triglicéridos</p> <ul style="list-style-type: none"> - La insulina induce a la lipoproteína lipasa a hidrolizar los triglicéridos en las lipoproteínas circulantes para transportar ácidos grasos a los adipocitos. - El transporte de la glucosa al interior de la célula proporciona glicerol fosfato que permite la esterificación de los ácidos grasos proporcionados por el transporte de lipoproteínas - La insulina inhibe la lipasa intracelular
Cerebro	<p>Disminución del apetito Aumento del gasto energético</p>

1.3.3 Administración subcutánea de insulina

En general, los pacientes con DM precisan un suministro constante de insulina para imitar un patrón fisiológico lo más cercano posible a la secreción de insulina en personas sanas. Sin embargo, como consecuencia de su corta vida media en el torrente sanguíneo, su baja biodisponibilidad oral y la falta de vías de administración alternativas, la insulina requiere de la aplicación de inyecciones diarias únicas o múltiples, para lograr el efecto terapéutico deseado (Chu, 2005). Dentro de los métodos parenterales para la entrega de drogas y medicamentos, la administración subcutánea es utilizada con más frecuencia que la administración intramuscular (Figura 6). Esto se debe en principio a la simplicidad del método de inyección, la posibilidad de inyectar volúmenes más grandes, a la mayor libertad para elegir el sitio de punción y a la reducción del riesgo de daño vascular o neuronal. Sin embargo, este método sigue resultando incómodo y doloroso, lo que a menudo conduce a un incumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes (Yu *et al.*, 2017).

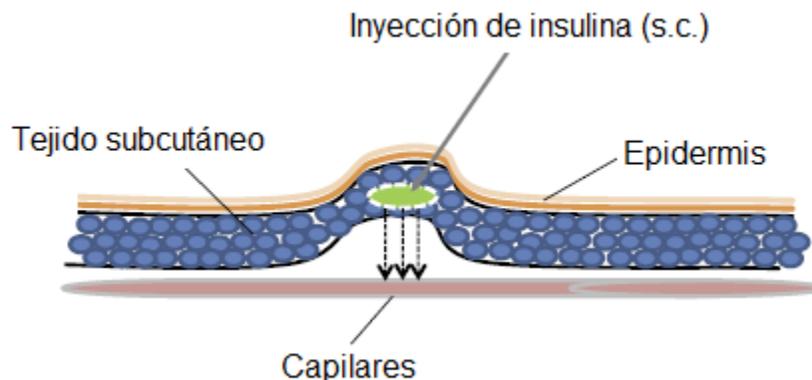


Figura 6 Administración de insulina subcutánea (Thomas *et al.*, 2015)

La insulina administrada exógenamente (por vía subcutánea) tiene un mecanismo de acción similar al de la insulina endógena. La hormona aplicada por vía subcutánea se distribuye en el plasma libremente de forma similar a la endógena, a menos que el cuerpo produzca anticuerpos contra ella. La absorción del polipéptido después de la inyección subcutánea depende del sitio de aplicación y del flujo sanguíneo; por ejemplo, se ha observado una mayor tasa de absorción en la región abdominal en comparación con la región femoral. Otros factores que

influyen en la absorción con la temperatura, el ejercicio, el masaje local, la lipohipertrofia, la presión al momento de la aplicación y el volumen inyectado (Jayakrishnapillai *et al.*, 2017).

1.3.4 Complicaciones en la administración subcutánea de insulina

Como se ha mencionado anteriormente la insuficiencia de la producción de insulina se aborda mediante inyecciones de la hormona. Estas inyecciones son aplicadas preferentemente por vía subcutánea. Las inyecciones son aplicadas en la mayoría de los casos por los propios pacientes sin supervisión médica, se aplican diariamente, lo que lo hace un método doloroso, que puede llevar al incumplimiento del tratamiento por parte del paciente. El incumplimiento conduce a la falta de seguimiento del tratamiento y esto afecta la efectividad de la terapia con insulina (Jayakrishnapillai *et al.*, 2017).

La administración subcutánea de insulina también provoca otras complicaciones, tales como el desarrollo de arterioesclerosis, hipoglucemia y otros defectos metabólicos adversos. Por otra parte, las inyecciones repetidas también causan problemas en el sitio de punción, tales como lipodistrofia y lipohipertrofia, reduciendo la capacidad de adsorción del fármaco. Aunado a esto, si no se lleva a cabo una administración séptica puede llevar a infecciones. Con el fin de ayudar a los pacientes diabéticos a superar estos problemas relacionados con las repetidas inyecciones, se han estudiado varias alternativas de administración, como la insulina inhalada, el trasplante de células β , o más recientemente, la insulina oral (Kanzarkar *et al.*, 2015).

1.4 Administración oral de fármacos proteicos

Las proteínas con fines terapéuticos como es el caso de algunas hormonas, son administradas regularmente de forma subcutánea (como se vio en el punto 1.3.3) por medio de inyecciones que pueden llegar a resultar dolorosas y/o traer consecuencias negativas como infecciones o lipodistrofias (Rao *et al.*, 2008). Actualmente está es, casi exclusivamente, la ruta de proporción de fármacos de

origen proteico, puesto que la administración oral de péptidos o proteínas suelen dar lugar a una escasa biodisponibilidad debido a dos razones principales: 1) a la baja absorción de la proteína debido a su gran tamaño y 2) a su degradación en las condiciones extremas del tracto gastrointestinal (Venkata *et al.*, 2008).

La hidrólisis de proteínas se lleva a cabo mediante enzimas digestivas en el estómago y el intestino delgado. En los seres humanos, la digestión de proteínas comienza en el estómago, debido a la presencia de pepsinas gástricas que se activan en condiciones ácidas. Estas enzimas rompen los enlaces peptídicos que mantienen unidas a las proteínas, lo que da como resultado la formación de una mezcla de polipéptidos, oligopéptidos y aminoácidos. Después de abandonar el estómago, los péptidos restantes se hidrolizan nuevamente, esta vez, por la acción de enzimas pancreáticas (como la tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasas) presentes en el duodeno. Eventualmente, los aminoácidos y los péptidos pequeños que resultan de la digestión de proteínas son absorbidos por las células del epitelio para llegar al torrente sanguíneo (Zhang *et al.*, 2017).

La absorción también tiene limitaciones pues los péptidos y proteínas atraviesan con dificultad las membranas biológicas. Su peso molecular, tamaño y carga eléctrica, limitan la entrada por los poros de la pared intestinal. De igual manera en los rangos fisiológicos de pH, los péptidos y proteínas están ionizados, lo que impide la absorción transcelular. Con pocas excepciones, los péptidos son insolubles en lípidos, y su absorción queda limitada a las circunstancias en que el gradiente de concentración a través de la membrana sea favorable (Grimaldi *et al.*, 2007).

Otra de las más grandes dificultades para la administración oral de péptidos de interés farmacéutico es su alta solubilidad en agua. La mayoría de los procesos para la nanoencapsulación se basan en la afinidad lipófila para poder formar emulsiones (Pinto Reis *et al.*, 2006).

La administración oral, en la que el agente terapéutico es absorbido a través del sistema gastrointestinal, es una vía deseable para la administración de proteínas, sin embargo, su éxito está limitado por las barreras del sistema digestivo. Las nanopartículas se pueden utilizar para proteger un fármaco contra su

degradación en tracto intestinal. Las nanopartículas se han utilizado como vehículos de fármacos orales por varias razones:

- Mejora la biodisponibilidad de fármacos
- Control de la liberación de fármacos
- Orientación de agentes terapéuticos a un órgano específico
- Aumento en la estabilidad de los agentes terapéuticos

1.5 Nanosistemas basados en lípidos

En las últimas décadas, los nanosistemas basados en lípidos (Figura 7) han sido estudiados como posibles nanovehículos para la liberación de fármacos. Esto se debe principalmente a la mejora de las propiedades de absorción de moléculas lipofílicas en el intestino y a la capacidad de incrementar la estabilidad de los medicamentos. Además, el carácter biocompatible de estos sistemas y el bajo costo de las técnicas de formación han aumentado el interés en el uso de estas tecnologías (Karamanidou *et al.*, 2016).

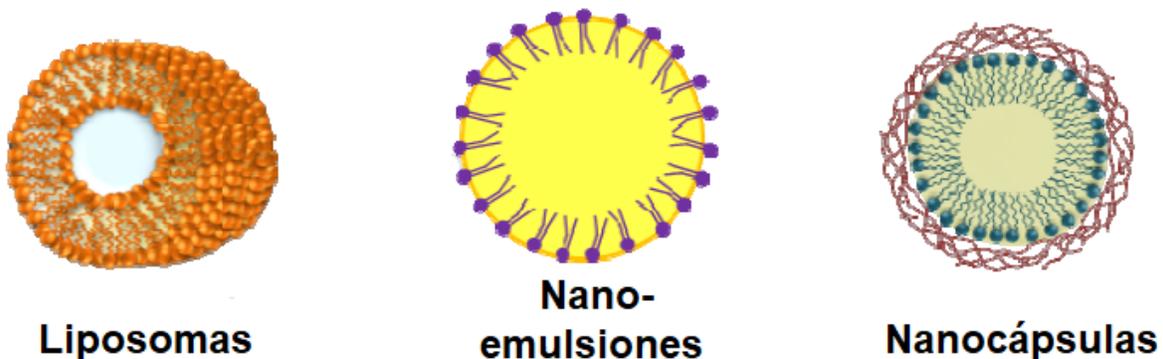


Figura 7. Principales nanosistemas basados en lípidos (Santalices *et al.*, 2017)

- Liposomas: Los liposomas son microvesículas esféricas que contienen una o varias bicapas paralelas de fosfolípidos, los cuales tienen la propiedad de adoptar una configuración de bicapas cuando se encuentran en medios acuosos (Khoobehi *et al.*, 1988). Tienen básicamente la misma estructura de

las membranas celulares. Esta propiedad de los fosfolípidos de adoptar la configuración en bicapas, se debe a que son moléculas anfipáticas, es decir, tienen un extremo polar que se orienta hacia la fase acuosa, y un extremo no polar que se dirige hacia el interior de la bicapa (Vera, 1995).

- **Nanocápsulas:** Son sistemas estructurados de liberación de fármacos. Consisten en un centro oleoso estabilizado por surfactantes y rodeado por una o más capas de polímeros. Ambas partes (núcleo y capas) desempeñan un papel importante en la formulación, mientras que el núcleo o centro generalmente funciona como un reservorio del fármaco, la capa de surfactantes y de polímeros ayudan a superar las barreras biológicas y controlar su nivel de liberación. Entre la amplia variedad de lípidos, los ácidos grasos de cadena larga, y los glicéridos de cadena media son los que muestran mejor penetración, por lo tanto son los más comúnmente utilizados para producir nanocápsulas (Santalices *et al.*, 2017; Grimaldi *et al.*, 2007).
- **Nanoemulsiones:** Son dispersiones de aceite y agua con un tamaño de partícula de entre 20 y 500 nm, las cuales, debido a su capacidad para solubilizar compuestos no polares, son utilizadas como sistemas acarreadores de compuestos activos lipofílicos. La reducción en el tamaño del glóbulo, permite que el área superficial por unidad de masa se incremente, lo cual a su vez incrementa la capacidad del compuesto para ser absorbido en membranas biológicas, tales como la pared intestinal o la piel (Koo *et al.*, 2005).

1.6 Incorporación de péptidos en nanosistemas para su administración por vía oral

En la última década se han realizado varios intentos para encontrar métodos para administración oral de fármacos proteicos, que usualmente se entregan por medio de técnicas parenterales. Como se vio en el punto anterior, los nanosistemas son una excelente opción como nanovehículos de moléculas terapéuticas de baja

biodisponibilidad oral para su liberación en el tracto gastrointestinal, sin embargo, una de las principales propiedades que deben tener las drogas a encapsular, es una alta lipofiliidad, propiedad que la mayoría de los péptidos como la insulina no posee, lo que imposibilita su encapsulación en este tipo de sistemas. Con el fin de mejorar su incorporación a estas tecnologías, se han desarrollado estrategias innovadoras para la formación de nanosistemas de administración oral de péptidos terapéuticos.

Micelas inversas: Esta técnica implica el uso de moléculas anfifílicas capaces de organizarse en micelas inversas, exponiendo sus cadenas hidrofóbicas al exterior y sus grupos hidrofílicos al interior de la estructura. La formación de estas estructuras facilita la incorporación de moléculas hidrofílicas a fases oleosas (Luisi *et al.*, 1988).

Emulsiones dobles: Consiste en la formación de una emulsión W/O en la que el fármaco hidrofílico se confina dentro de la fase acuosa, antes de su inclusión al sistema final (otra emulsión O/W) (Cardenas *et al.*, 2015).

Acoplamiento de iones hidrofóbicos: Mediante esta estrategia es posible incrementar la hidrofobicidad del fármaco, mejorando así su solubilidad en lípidos y por lo tanto su incorporación en sistemas nanoestructurados basados en lípidos. Se basa en la complejación iónica de un péptido/proteína con una molécula anfifílica como los fosfolípidos (Cui *et al.*, 2006; Karamanidou *et al.*, 2015; Santalices *et al.*, 2017).

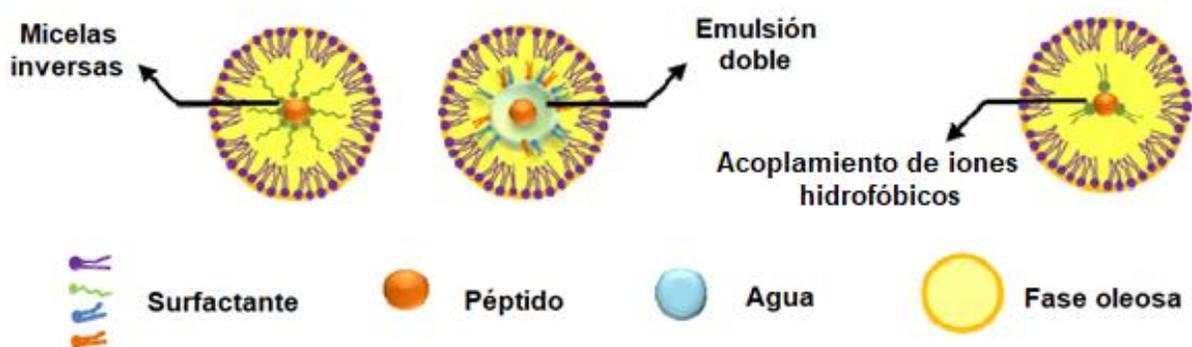


Figura 8. Estrategias para mejorar la incorporación de péptidos hidrofílicos en nanosistemas (Santalices *et al.*, 2017)

1.7 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas lipídicas anfipáticas, que se encuentran en todas las membranas celulares de plantas y animales, disponiéndose como bicapas lipídicas. Pertenecen al grupo de lípidos derivados del glicerol, presentando una estructura similar a los triglicéridos. En este sentido los fosfolípidos están formados por una molécula de L-glicerol-3-fosfato a la que están unidos dos ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2, estos ácidos grasos pueden presentar distinto largo de cadena hidrocarbonada, y variar en el grado de insaturación según su procedencia. Sin embargo, se diferencian de los triglicéridos ya que la posición sn-3 está ligada a una molécula ácido fosfórico, en lugar de un tercer ácido graso. Estos grupos fosfato están siempre unidos a diferentes tipos de moléculas, de esta forma, cuando esta molécula corresponde a colina se denomina fosfatidilcolina o lecitina, cuando se une a un aminoácido como serina, se forma fosfatidilserina (Torres *et al.*, 2015).

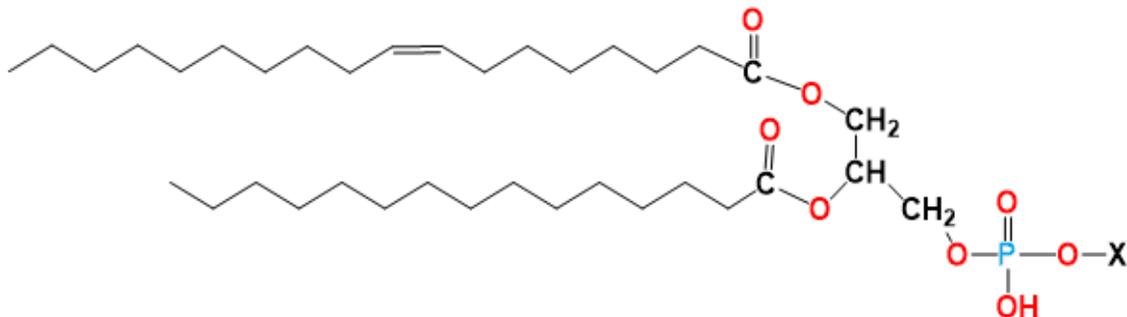


Figura 9. Estructura de un fosfolípido

Los fosfolípidos tienen gran relevancia en sistemas biológicos, ya que forman parte de membranas celulares y participan en algunos pasos del metabolismo. Por otra parte, en la industria son utilizados como emulsificantes debido a su naturaleza anfifílica y en la industria farmacéutica se emplean como formadores de micelas; su amplio uso se debe principalmente a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Pueden administrarse por vía parenteral, tópica u oral, ya que presentan afinidad por las membranas celulares sin causar efectos tóxicos (Paolino *et al.*, 2002).

Los fosfolípidos por su carácter anfifílico, al aumentar su concentración en presencia de compuestos hidrofílicos tienden a auto-agruparse, eliminando el contacto energicamente desfavorable entre la parte no polar y la polar; y a la vez mantienen la parte polar en contacto con el compuesto hidrofílico. Esta auto asociación de las moléculas de fosfolípidos resulta en agregados moleculares de distintos tamaños y geometrías que dependen de la estructura molecular de las partes hidrofílica y lipofílica de la molécula de fosfolípido específico. En presencia de solventes orgánicos los fosfolípidos tienden a formar micelas inversas (Vikbjerg, 2006).

1.7.1 Modificación enzimática de fosfolípidos

El remplazo de los ácidos grasos presentes de forma natural en los fosfolípidos por ácidos grasos de interés, representa una alternativa para aplicaciones específicas, ya que la extracción y separación de fosfolípidos con una composición deseada sería muy difícil, además de que no estarían fácilmente disponibles en la naturaleza.

La modificación enzimática de los fosfolípidos tiene ventajas sobre los métodos químicos, entre ellas: la selectividad o especificidad de las enzimas; las condiciones de reacción más suaves que ayudan a mantener las propiedades de los fosfolípidos sensibles al calor o al oxígeno; la disminución en el uso de solventes o sustancias tóxicas, lo que facilita las etapas de purificación y disminuye los residuos de productos finales. Esto propone una alternativa segura para la producción de fosfolípidos modificados de uso alimentario, farmacéutico y cosmético. Las enzimas que pueden ser usadas para la modificación de fosfolípidos las enzimas lipasas y fosfolipasas (Ochoa, 2013).

Las enzimas que emplean a los fosfolípidos como sustrato son denominadas fosfolipasas (PL) y son llamadas de acuerdo a la acción hidrolítica en la molécula del fosfolípido, las fosfolipasas industrialmente relevantes pertenecen a las de tipo A (PLA1 y PLA2); además de las fosfolipasas existen otras enzimas que pueden emplearse para la modificación de los fosfolípidos, éstas son las lipasas 1,3

específicas, las cuales actúan en la posición *sn-1* de los fosfolípidos. Las lipasas han sido más estudiadas y desarrolladas que las fosfolipasas y han sido las más empleadas para la modificación en la posición *sn-1* de los fosfolípidos. La modificación enzimática es quizás la aplicación más valiosa, donde la selectividad de las lipasas y fosfolipasas permite la síntesis de productos altamente puros, con una estructura específica conteniendo grupos acilo específicos en la posición *sn-1* y *sn-2* y un grupo polar en la posición *sn-3*, para su uso en productos farmacéuticos, cosméticos y en alimentos.

Las fosfolipasas son un grupo de enzimas con actividad fosfodiesterasa así como hidrolasa, que tienen como sustrato a los fosfolípidos. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, desempeñando numerosas funciones las cuales incluyen la digestión de nutrientes, la transducción de señales y la formación de compuestos bioactivos. El término fosfolipasa hace referencia a cinco diferentes tipos de enzimas: fosfolipasas A1, A2, B, C y D; abreviadas como PLA1, PLA2, PLB, PLC y PLD, respectivamente. La clasificación de las fosfolipasas se basa en el sitio de acción y la reacción que cataliza en la molécula de los fosfolípidos. Las fosfolipasas A son acil hidrolasas clasificadas de acuerdo a su sitio de acción en la hidrólisis del enlace éster del ácido graso unido al glicerol. La fosfolipasa A1 (PLA1) remueve el ácido graso del enlace éster en la posición *sn-1* mientras que la fosfolipasa A2 (PLA2) en la posición *sn-2* del fosfolípido. La acción de la PLA1 y PLA2 conduce a la acumulación de ácidos grasos libres y 2-acil lisofosfolípidos o 1-acil lisofosfolípidos, respectivamente. La fosfolipasa B (PLB) puede hidrolizar ambas posiciones del enlace éster; y las fosfolipasas C (PLC) y fosfolipasa D (PLD) son enzimas que actúan en el enlace entre el glicerol y el fosfato, o entre el fosfato y el grupo unido a éste (Cavazos, 2013).

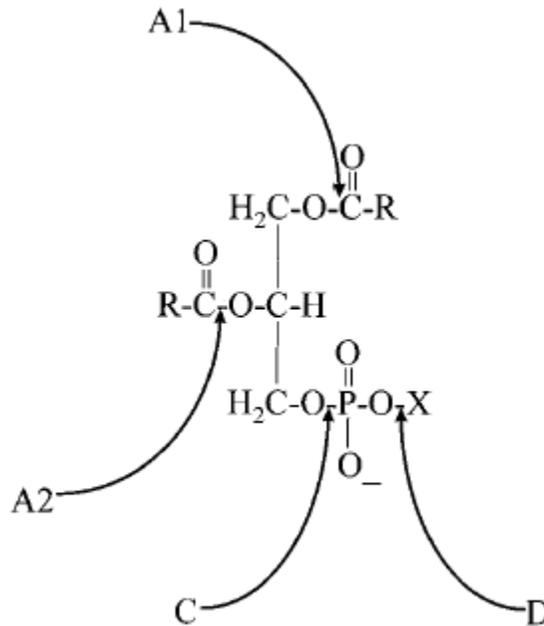


Figura 10. Sitio de acción de las fosfolipasas (Ghannoum, 2000)

1.8 Ácidos grasos de cadena media

Los ácidos grasos de cadena media (AGCM) contienen entre 6 y 12 átomos de carbono, como el ácido caproico (C6), el ácido caprílico (C8), ácido cáprico (C10) y el ácido láurico (C12). Se encuentran en algunos aceites como el coco, cuyo contenido en AGCM supera el 50% del total de ácidos grasos, y en una pequeña porción de otros productos naturales como la leche bovina o la leche de cabra. Pueden producirse por hidrólisis de los aceites de coco.

Los AGCM se utilizan para mejorar la permeabilidad de tejidos de la mucosa a fármacos hidrofóbicos, pero este mecanismo de acción aún no se esclarece completamente. Sin embargo, se han estudiado los efectos de absorción de del ácido cáprico y láurico en células epiteliales intestinales humanas, donde se mostró que los AGCM inducían un rápido aumento en la permeabilidad intestinal e inhibían la activación de fosfolipasas y de diversas quinasas (Lindmark *et al.*, 1998).

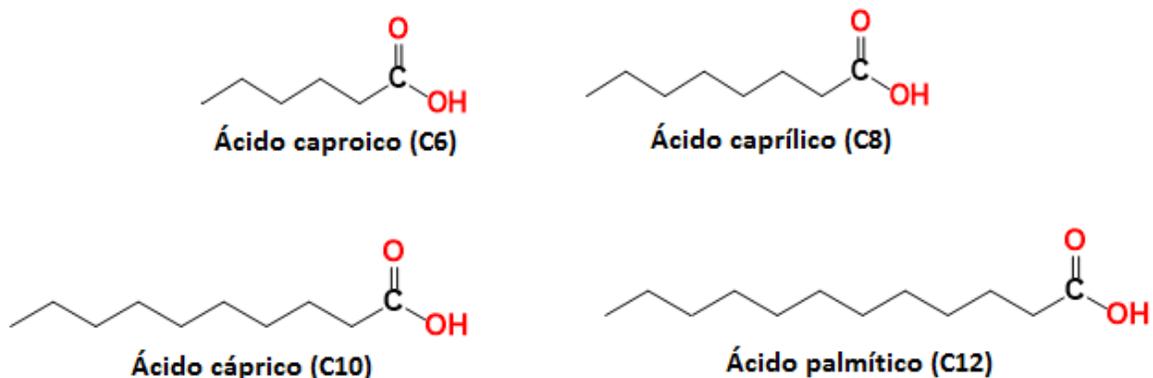


Figura 11. Estructura de los Ácidos Grasos de Cadena Media (AGCM)

Otros estudios han comprobado de igual forma que la adsorción de ácidos grasos de cadena media es más rápida y eficiente que los ácidos grasos de cadena larga (AGCL). Se sabe que los ácidos grasos de cadena media, estimulan menos la secreción de colecistoquinina, fosfolípidos biliares y colesterol que los AGCL. En situaciones de deficiencia de lipasa pancreática o de sales biliares, los ácidos grasos de cadena media pueden absorberse, al contrario de lo que sucede con los AGCL. En pacientes con insuficiencia pancreática que presentaban esteatorrea, la presencia de grasa en heces disminuyó tras cinco días de dieta suplementada con aceites ricos en ácidos grasos de cadena media, comparada con una dieta suplementada con AGCL. De igual forma, la masa molar de estos ácidos (AGCM) es lo suficientemente pequeña para que sean menos insolubles, por lo que requieren de menos sales biliares para su digestión. Por último, pueden ingresar en las células de la mucosa intestinal en forma de diacilglicéridos o monoacilglicéridos, los cuales son hidrolizados en las células de la mucosa (Sáyago *et al.*, 2008).

Por lo tanto, la modificación de fosfatidilcolina con AGCM, podría aumentar la absorción de complejos elaborados con insulina y PCM. Aunado a esto se ha observado que la formación de dichos complejos hace posible la incorporación de péptidos a fases oleosas, lo que permitiría su encapsulación en nanosistemas como las nanoemulsiones (Sripriya y Jun, 2008), lo que aumentaría aún más la biodisponibilidad de la hormona.

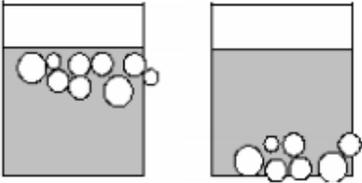
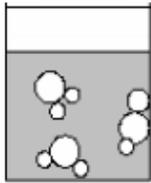
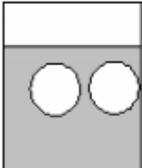
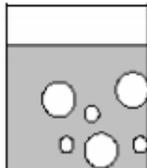
1.9 Nanoemulsiones

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles, en donde uno de ellos es dispersado en forma de pequeñas gotas dentro del otro. En la mayoría de los alimentos, el diámetro de las gotas de las emulsiones es de entre 1 a 100 μm . Debido a su naturaleza las emulsiones son sistemas que tienden a separarse en las fases que las forman a través del tiempo, como consecuencia de distintos mecanismos como la floculación, coalescencia. Como solución a lo anterior, y para cumplir las funciones de encapsulación y liberación de compuestos, el uso de nanoemulsiones ha ido en aumento en la industria farmacéutica y alimentaria (Cardoso *et al.*, 2015).

Las nanoemulsiones tienen características que les da propiedades más ventajosas en ciertas aplicaciones alimentarias y farmacéuticas a comparación de las emulsiones convencionales. La nanoemulsiones generalmente tienen mayor estabilidad a la agregación de partículas y a la separación de fases (McClements & Rao, 2011).

La nanoemulsiones son sistemas transparentes o translucidos, que poseen un tamaño de partícula menor a 1000 nm, a diferencia de las emulsiones que poseen tamaños de partícula mayores a 1000 nm, es decir, micrométricos, y tienen apariencia turbia o “lechosa”. Las nanoemulsiones al igual que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, pero cinéticamente estables, lo que le da estabilidad física a largo plazo y evita fenómenos de inestabilidad, los cuales se mencionan en la Tabla 3. (Tadros *et al.*, 2004).

Tabla 3. Fenómenos de inestabilidad de nanoemulsiones (Aranberri *et al.*, 2006)

Fenómeno de inestabilidad	Descripción	
Sedimentación y sedimentación inversa	Proceso causado por acción de la gravedad que produce un gradiente vertical en la concentración de la fase dispersa	
Floculación	Adhesión de las partículas sin fusionarse, creando agregados de glóbulos	Floculación
Coalescencia	Fusión de los glóbulos de la emulsión creando partículas más grandes	
Maduración de Ostwald	Aumento de tamaño de los glóbulos más grandes a costa de los más pequeños	

Por su tamaño de partícula nanométrico, las nanoemulsiones poseen un fuerte movimiento browniano que evita la sedimentación o la sedimentación inversa originado por las fuerzas de gravedad, proporcionando así una alta estabilidad cinética (Mason *et al.*, 2006). Por otro lado, aunque la presión de Laplace (presión interna de los glóbulos) es muy grande en las nanoemulsiones, los glóbulos pueden permanecer estables contra la maduración de Ostwald, solo si el compuesto presente tiene poca solubilidad en la fase continua (Tadros *et al.*, 2004).

Las nanoemulsiones pueden homogenizar compuestos pobremente solubles en agua, propiedad que puede ser aprovechada para incorporar ingredientes bioactivos liposolubles, aumentar su liberación y tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal, así como su absorción a través de las células intestinales y ser capaces de atravesar los vasos capilares más pequeños. Además, otras de sus ventajas son mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos al brindarles protección contra factores ambientales deteriorativos debido a la membrana interfacial que los aísla de éstos; y dado que el área superficial por unidad de masa se incrementa, permiten un mayor transporte, exposición y penetración del compuesto activo y por ende, un incremento en su actividad biológica (Ochoa, 2013).

1.9.1 Tipos de nanoemulsiones

Probablemente la principal propiedad a ser determinada en una emulsión es el tipo, es decir, si se trata de una emulsión aceite en agua (O/W) o agua en aceite (W/O), y eventualmente la existencia de una emulsión múltiple. De acuerdo a como se encuentre localizado el agua y el aceite en el sistema disperso, existen diversos tipos de nanoemulsiones. Al mezclar soluciones acuosas y oleosas en presencia de emulsificantes, pueden obtenerse cuatro formas diferentes de emulsiones.

Las emulsiones simples se denominan aceite en agua (O/W) cuando las gotas de aceite están dispersas en una fase acuosa, una emulsión agua en aceite (W/O) se constituye de agua como fase dispersa y aceite como fase continua, como lo ilustra la Figura 12 (Villareal, 2004). Por su parte las emulsiones múltiples están simbolizadas por W1/O/W2 o O1/W/O2. Si las gotas de aceite de una emulsión O/W contienen en su interior pequeñas gotas de agua, se trata de una emulsión múltiple de tipo W1/O/W2. Donde W1 y W2, indican respectivamente las fases más internas y externas del sistema. Los subíndices pueden referirse tanto a fases iguales como diferentes (Chávez, 2015).

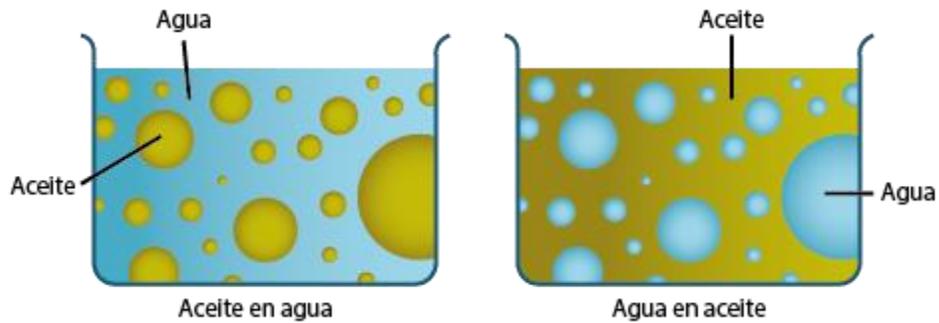


Figura 12. Tipo de emulsión según la fase

1.9.2 Formación de nanoemulsiones

Como las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, para formarlas es necesario aplicar energía. Esta se puede considerar como la energía que se requiere para expandir la interface $\Delta A\gamma$ (donde γ es la tensión interfacial y ΔA es el incremento del área interfacial) durante la emulsificación. Como γ es positiva, la energía para expandir la interface es grande y positiva. Además, este término es lo suficientemente grande como para ser compensado por la entropía de la dispersión ($T\Delta S$), entonces la energía libre de formación de una emulsión (ΔG) es positiva, es decir, requiere de energía para su formación (Cavazos, 2013).

$$\Delta G = \gamma * \Delta A - T * \Delta S$$

En consecuencia, la formación de una emulsión es termodinámicamente desfavorable, por lo que requieren de una fuente de energía para lograr la ruptura de los glóbulos y el incremento del área interfacial. Generalmente esta energía proviene de dispositivos mecánicos o del potencial químico de los componentes (Cavazos, 2013).

A pesar de esto, las emulsiones son cinéticamente estables debido a la presencia de una capa de surfactante adherida en la interfase O/W, que reduce la tensión interfacial.

1.9.2.1 Formación de nanoemulsiones por métodos de alta energía

La formación de nanoemulsiones por métodos de alta energía se consigue utilizando fuerzas mecánicas ya sea por medio de agitación, alta presión o generadores de ultrasonido. La energía proporcionada en forma de cizalla, ondas ultrasónicas o presión, rompe las gotas de la emulsión hasta lograr tamaños nanométricos (Figura 13) sin embargo, estos tipos de métodos tienen la desventaja de generar calor extremo durante su proceso, por lo que limita su uso en moléculas termosensibles como es el caso de moléculas proteicas (Rai *et al.*, 2018).

En la actualidad, estos métodos son los más utilizados para preparar nanoemulsiones en la industria de alimentos, ya que son fáciles de llevar a gran escala y la variedad de componentes que se puede utilizar es amplia (McClements & Rao, 2011).

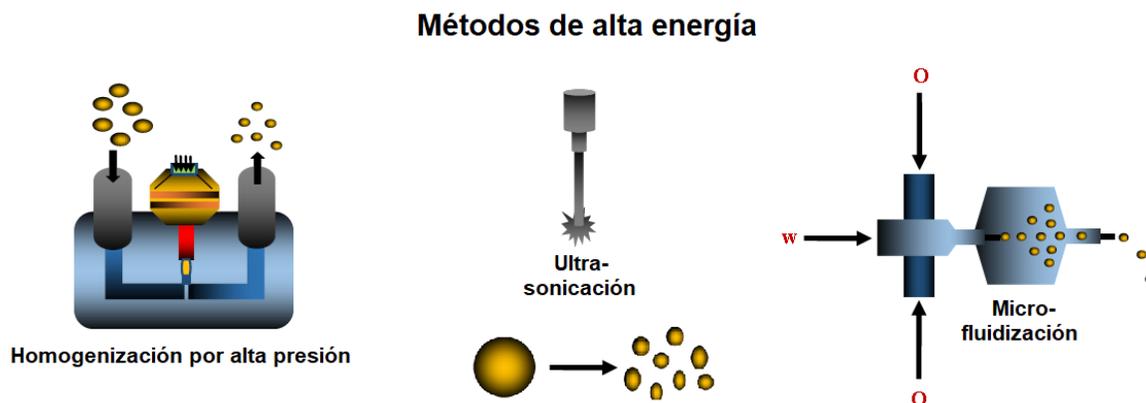


Figura 13. Representación esquemática de la preparación de nanoemulsiones mediante métodos de alta energía (Rai *et al.*, 2018)

1.9.2.2 Formación de nanoemulsiones por métodos de baja energía

Las nanoemulsiones comúnmente son preparadas mediante métodos de alta energía, utilizando dispositivos mecánicos capaces de producir intensas fuerzas disruptivas mencionados en el punto anterior. La formación de nanoemulsiones mediante estos métodos es bastante sencilla, ya que a mayor energía se obtienen menores tamaños de partícula. Sin embargo, la energía requerida para obtener

partículas a escala nanométricas en muy alta y, por lo tanto, muy costoso. Esto especialmente considerando que solo una pequeña cantidad (alrededor del 0.1%) de la energía implementada, es aprovechada para la emulsificación (Tadros *et al.*, 2004). Por el contrario, los métodos de nanoemulsificación de baja energía, hacen uso de la energía química interna del sistema, debido a esto comúnmente son más eficientes desde el punto de vista energético, ya que solo requieren de agitación simple, de igual manera se logran obtener tamaños de partícula más pequeños en comparación a los métodos de alta energía (Solans y Solé, 2012).

La obtención de nanoemulsiones con métodos de baja energía se basa en la formación de glóbulos de aceite en una mezcla de tensoactivo-aceite-agua cuando se altera ya sea su composición o su entorno (Tadros *et al.*, 2004). Los dos métodos principales utilizados con este enfoque incluyen la emulsificación espontánea y los métodos de inversión de fase. Estas técnicas suelen ser más eficaces en la producción de tamaños de gota muy pequeños que los métodos de alta energía, sin embargo, el uso de aceites y surfactantes que se pueden utilizar esta muy limitado. Por ejemplo, los emulsificantes de origen proteico o de carbohidratos no pueden ser utilizados, ya que no son capaces de producir nanoemulsiones sin ayuda de energía. Por lo anterior, el uso de estas técnicas en la industria alimentaria está muy limitada (Pouton *et al.*, 2008).

1.10 Emulsificación espontánea

En este método, una emulsión o una nanoemulsión se forma espontáneamente cuando dos líquidos se mezclan entre sí. Los sistemas preparados con este método en la industria farmacéutica generalmente reciben el nombre de sistemas de liberación de fármacos auto-nanoemulsificables (SNEDDS). En la práctica, este método puede llevarse a cabo de diferentes formas: la composición de las dos fases puede variar; las condiciones ambientales pueden modificarse (temperatura, pH, fuerza iónica); y/o las condiciones de mezclado pueden variar (velocidad de agitación). Por ejemplo, una fase orgánica que consiste

en un aceite, un agente tensoactivo hidrófilo y un agente tensoactivo hidrófobo, se puede añadir lentamente al agua; o viceversa, a la fase orgánica compuesta de los mismos materiales se le agrega agua lentamente.

Se han propuesto diferentes mecanismos fisicoquímicos para explicar el fenómeno de emulsificación espontánea (Pouton *et al.*, 2008). Consideremos una situación en la que dos fases se ponen en contacto entre sí. Cada fase tiene distintos componentes que son inmiscibles con la otra fase (por ejemplo, una fase contiene aceite y la otra agua); sin embargo, una de las dos fases contiene un componente que es parcialmente miscible con las dos fases (por ejemplo, un tensoactivo). Cuando las dos fases se ponen en contacto, una parte del componente que es parcialmente soluble en las dos fases, migra de su posición original a una posición cercana a la otra fase. Como este componente se mueve, causa un incremento en el área interfacial agua-aceite, en la turbulencia interfacial y forma pequeños glóbulos (Figura 14). El tamaño de las gotas producidas puede controlarse mediante la variación de la composición de las dos fases iniciales, así como las condiciones de mezcla.

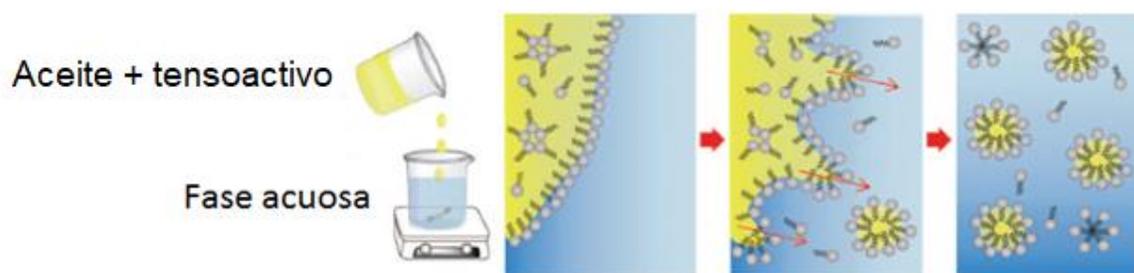


Figura 14. Mecanismo de formación de nanoemulsiones espontáneas (McClements y Rao, 2011)

En estudios previos sobre nanoemulsiones formadas por emulsificación espontánea, solo se han utilizado tensoactivos sintéticos, puesto que actualmente no hay estudios en los que las proteínas o polisacáridos hayan sido utilizados como emulsionantes para este método en particular. Esto puede ser debido a las limitaciones fisicoquímicas asociadas con el mecanismo de formación de las gotitas. Las interfaces cubiertas con surfactantes de origen biopolimérico tienden a

manifestar mayores tensiones interfaciales y propiedades más elásticas que las formadas con moléculas surfactantes pequeñas (McClements y Rao, 2011).

1.10.1 Sistemas de Liberación de Fármacos Auto-nanoemulsificables (SNEDDS)

Los SNEDDS son definidos como mezclas isotrópicas anhidras de aceite, surfactantes, co-surfactantes y fármacos, los cuales forman nanoemulsiones al ser sometidas a una fase acuosa y bajo agitación suave (Shukla *et al.*, 2016; Avachat y Patel, 2015; Bernkop-Schnürch, 2013). Debido a estas propiedades, los SNEDDS pueden ser capaces de formar nanoemulsiones en el tracto gastrointestinal después de su administración, debido a que los movimientos peristálticos proporcionan la agitación suficiente para la auto-nanoemulsificación (Li *et al.*, 2014; Senapati *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2009; Basalious *et al.*, 2010). Las SNEDDS normalmente producen nanoemulsiones con un tamaño de glóbulo de entre 20 y 200 nm (Basalious *et al.*, 2010).

1.10.2 Componentes generales de los SNEDDS

Para que pueda ocurrir la nanoemulsificación espontánea, ha sido comprobado que solo combinaciones muy específicas de los componentes que forman el SNEDDS pueden conducir a la autoemulsificación, por lo que es importante mencionar que cualquier cambio en los componentes o en las concentraciones del sistema, puede conducir a un cambio o inclusive a la destrucción del sistema (Wakerly *et al.*, 1986).

La fase oleosa representa uno de los componentes más importantes en la formulación de los SNEDDS, ya que este determinará las cantidades de fármaco capaz de solubilizarse en el sistema, además, dictará el transporte de la droga a través del sistema intestinal, pudiendo así aumentar o disminuir la absorción en el organismo (Gursoy y Benita, 2004).

Los aceites naturales comestibles, no son utilizados con frecuencia, debido principalmente a su escasa capacidad para disolver grandes cantidades de fármacos liposolubles, por el contrario, los aceites vegetales modificados o hidrolizados se utilizan más ampliamente, ya que estos excipientes forman buenos sistemas de auto-emulsificación con una gran variedad de tensoactivos aprobados para su administración oral, exhiben mejores propiedades de solubilidad de drogas lipofílicas y sus productos de degradación son similares a los productos finales naturales de la digestión intestinal (Kimura *et al.*, 1994; Constantinides, 1995).

Surfactante: Existen varios surfactantes que pueden ser empleados para el diseño de SNEDDS, siendo más ampliamente utilizados los de origen no iónico con un alto Balance Hidrofílico-Lipofílico (HLB). Los surfactantes más comúnmente usados son los glicéridos etoxilados y el oleato de polioxietileno como el Cremophor EL y el Tween 80 respectivamente. Otro factor importante al momento de elegir el surfactante es la seguridad, son preferibles aquellos emulsionantes de origen natural ya que se consideran que son más seguros que los emulsionantes sintéticos, sin embargo, la gran mayoría de estos posee una capacidad de auto-nanoemulsificación muy limitada. Por lo general, la concentración del surfactante debe oscilar entre 30 y 60% del peso total del SNEDDS para lograr emulsiones estables. Determinar la concentración del emulsificante es muy importante, puesto que elevadas cantidades de estos compuestos pueden causar irritación del sistema gastrointestinal.

El surfactante implicado en la formulación del SNEDDS debe poseer un HLB alto (alta hidrofiliidad) de manera que se dé una rápida formación de gotas nanométricas O/W y una rápida dispersión de estas en el sistema. Los sistemas con mayores relaciones surfactante y co-surfactante son los que tienden a producir SNEDDS (Gursoy *et al.*, 2004).

El co-surfactante juega un papel importante en la emulsificación espontánea; tiene como función mejorar las propiedades de auto-nanoemulsificación y generalmente se emplean surfactantes con bajo valor HLB; también son empleados alcoholes u otras sustancias como el glicerol.

La mayoría de los SNEDDS disponibles en el mercado son utilizados para acarrear fármacos poco solubles en agua; sin embargo, debido a que se ha observado que los excipientes de naturaleza lipídica mejoran la estabilidad y la permeabilidad de péptidos, se ha visto un gran interés en su uso para la administración de péptidos orales (Niu *et al.*, 2016).

1.11 Propiedades de las nanoemulsiones

1.11.1 Potencial Z

Por su tamaño, las fuerzas de unión en la superficie de las nanoemulsiones y el líquido circundante determinan parte importante de su comportamiento. Uno de los mayores efectos de en la superficie de los glóbulos, son los fenómenos electrocinéticos. Cada glóbulo de nanoemulsión contiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa o positiva, y pueden producir fuerzas de repulsión electrostática entre los glóbulos vecinos. El potencial Zeta puede ser definido como la medida de la carga superficial neta de la partícula y su distribución en la interfase, e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla, dicho de otra forma, es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean al glóbulo. Si la carga es suficientemente elevada los coloides permanecen discretos, dispersos y en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan (Stachurski *et al.*, 1996). La magnitud de estas cargas eléctricas es primordial para valorar la estabilidad de las nanoemulsiones.

1.11.2 Tamaño y distribución de glóbulo

El tamaño de glóbulo de una emulsión puede definirse como el diámetro de los glóbulos de la fase dispersa; esto considerando que todos los glóbulos tengan el mismo diámetro en todo el sistema. Este valor es muy importante dado de que

otorga muchas de las propiedades que posee el sistema; por ejemplo, su apariencia, ya que se ha observado que cuando el diámetro general de las gotas de una emulsión es menor a los 200 nm, estas son claras y translúcidas. Por otra parte, debido a que los procesos de formación de emulsiones son fenómenos aleatorios, el tamaño de la partícula, está influenciado por múltiples variables y como resultado final se obtiene una emulsión con distintos tamaños de partícula. Así, la distribución del tamaño de glóbulos representa la fracción de glóbulos que pertenecen a cada tamaño (Marquez, 2005).

Uno de los factores que probablemente afecte en mayor medida en las propiedades de las nanoemulsiones, es sin lugar a duda los emulsificantes o surfactantes, ya que las propiedades resultantes de la nanoemulsión dependerán de la naturaleza del compuesto anfílico, así como de su concentración, por lo que la elección del surfactante a utilizar para la estabilización del sistema, será fundamental en las propiedades de las nanoemulsiones.

1.12 Emulsificantes

En el proceso de formación de nanoemulsiones, al igual que en las emulsiones convencionales, es necesaria la acción de un agente emulgente para lograr estabilizar la emulsión por periodos de tiempos prolongados (Cardoso *et al.*, 2015).

Los emulsificantes, también llamados surfactantes o agentes tensoactivos, son especies químicas con una naturaleza polar- no polar, con tendencia a localizarse en la interface, formando una capa monomolecular adsorbida en la interface (entre las fases hidrofílica e hidrofóbica). Esta ubicación impide el tráfico de moléculas que van de la superficie al interior de líquido en busca de un estado de menor energía, disminuyendo así el fenómeno de tensión superficial.

1.12.1 Tipos de emulsificantes

Los agentes tensoactivos se pueden clasificar en función de la naturaleza iónica de la cabeza:

- a) **Iónicos:** Se trata de los agentes tensoactivos que presenta la cabeza hidrófila regularmente con carga negativa ya que son muy pocos los que poseen carga positiva. Se emplean ampliamente para el desarrollo de nanoemulsiones de baja y alta energía. Sin embargo, poseen la desventaja de causar irritación en elevadas concentraciones por lo que su uso se limita a sistemas con poco emulsificante.
- b) **Zwiteriónicos:** Estos agentes tensoactivos contienen cargas opuestas en la misma molécula. Gracias a esto, este tipo de emulsificantes pueden tener una carga neta positiva, negativa o neutra, dependiendo del pH del medio. Los fosfolípidos son un común ejemplo de surfactantes Zwiteriónicos ya que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, como es el caso de la lecitina
- c) **No iónicos:** Los surfactantes no iónicos, son aquellos que carecen de grupos polares cargados en su estructura, pero poseen grupos como los etoxilatos, que muestran gran afinidad hacia las moléculas de agua, debido a las fuertes interacciones dipolo-dipolo en los enlaces de hidrógeno de los grupos etoxilados. La parte hidrófoba del agente tensoactivo generalmente es una cadena simple de hidrocarburo o ácidos grasos. Son utilizados ampliamente, debido en gran medida a su baja toxicidad y a su capacidad de formar nanoemulsiones tanto de alta como de baja energía. Algunos claros ejemplos de este grupo de surfactantes son los Tweens, Spans y Cremophor (Aranberri *et al.*, 2006; McClements y Rao, 2011).

1.12.2 Valor HLB

Este sistema fue desarrollado por Griffin en la década de 1950, quien intentó proporcionar una respuesta a la búsqueda de un agente tensoactivo ideal para la

estabilización de un sistema dado (Macedo *et al.*, 2006). La naturaleza anfifílica de los agentes tensoactivos puede ser expresado en términos de una escala empírica que comúnmente se denomina el balance HLB (balance hidrófilo-lipófilo). Se han establecido varias ecuaciones para calcular los valores de HLB y a los agentes tensoactivos menos hidrófilos se les ha asignado los valores de HLB más bajos. Sin embargo, el número de HLB es asignado al agente tensoactivo puro y suele diferir del comportamiento del mismo en disolución como se muestra en la Tabla 4. El valor HLB puede variar en función del tipo de electrolito, temperatura y tipo de aceite, debido a que modifican la geometría de la capa de agentes tensoactivos en la interface (Aranberri *et al.*, 2006).

Tabla 4. Valores de HLB en relación con las características físicas (Cavazos, 2013)

Valor HLB	Dispersión en solución acuosa	Aplicación
1-4	Nulo	W/O emulsificante
4-6	Débil	
6-8		Translúcido en soluciones dispersas
8-10	Emulsiones O/W: Agente solubilizante	
10-13		
13-14	Soluciones transparentes	

1.13 Digestión de emulsiones

Tras su ingestión, las emulsiones entran al tracto gastrointestinal (GI) y pasan por una serie de diversas condiciones de las distintas etapas del sistema GI que alteran sus propiedades, y por lo tanto modifican su capacidad de absorción.

1.13.1 Boca

La primera etapa que experimenta la emulsión durante su paso a través del sistema GI es la cavidad oral. La emulsión ingerida sufrirá una serie de cambios estructurales y de composición debido en primer lugar a su dilución con fluidos salivales que la dispersan y/o diluyen, lo cual puede llevar a un aumento en el tamaño promedio de partícula de los sistemas, y a la distribución bimodal de las mismas. Esto ocasiona la floculación de las gotas de la nanoemulsión, que puede ser originado por la interacción con las moléculas de mucina presentes en la saliva. De igual forma la carga superficial de las partículas de las nanoemulsiones se ven afectadas en esta etapa, lo anterior puede quedar esclarecido ya que la saliva contiene iones minerales que modifican las cargas superficiales. Otro efecto al que se le atribuye el cambio en la carga eléctrica superficial, es la presencia misma de las moléculas de mucina, que pueden interferir en la señal electroforética que se utiliza para calcular el potencial Z (Chen *et al.*, 2017).

1.13.2 Estómago

Después de ingerir un alimento y pasar por la boca y el esófago, ingresa a la cavidad gástrica. Dentro del estómago, el bolo alimenticio está expuesto a una variedad de condiciones fisicoquímicas que pueden alterar en gran medida sus propiedades como: una acidez muy elevada (pH 1-3), alta fuerza iónica (como sales de calcio y sodio), actividad enzimática (proteasas y lipasas). En principio la alta acidez puede causar la degradación química de muchos compuestos, por ejemplo, la hidrólisis de surfactantes y proteínas o péptidos. Un cambio en el pH y en la fuerza iónica también conllevan a la alteración de las interacciones electrostáticas del sistema. Las lipasas gástricas iniciarán la digestión de tensoactivos como acilglicéridos y fosfolípidos pudiendo influir en el tamaño de las gotas, mientras que las proteasas gástricas dan inicio a la digestión y fragmentación de moléculas proteicas. El grado y la naturaleza de estos cambios depende de la composición de las nanopartículas. Por ejemplo, se ha demostrado que las nanopartículas

revestidas con proteínas globulares son altamente propensas a la floculación, mientras que las nanopartículas estabilizadas con moléculas lipídicas resultan ser más estables (McClements, 2013).

1.13.3 Intestino delgado

El quimo (bolo alimenticio) que sale del estómago pasa a través del esfínter pilórico, que es capaz de abrirse y cerrarse para controlar la cantidad de alimento que ingresa al intestino delgado. Una vez en el intestino delgado, el quimo se mezcla con los fluidos intestinales, que poseen un carácter alcalino, además de contener sales biliares, fosfolípidos, lipasas pancreáticas, bicarbonato y varias sales. Esto induce a un aumento en el pH de la mezcla a aproximadamente 7 (pH neutro). Esta mezcla de jugos biológicos está diseñada para digerir cualquier macromolécula presente en los alimentos para ser absorbidos posteriormente por las células del epitelio (Guyton & Hall, 2006). Por lo tanto, las proteínas son degradadas a aminoácidos y péptidos por acción de las proteasas, los acilglicéridos liberan sus ácidos grasos debido a la presencia de lipasas, y los almidones son reducidos a oligosacáridos y glucosa gracias a las amilasas. Un aspecto muy importante de esta etapa es la formación de estructuras coloidales que mejoran la absorción de los nutrientes digeridos. Por ejemplo, las micelas y vesículas formadas, son capaces de solubilizar a los ácidos grasos libres, monoacilglicéridos y vitaminas liposolubles; estas moléculas que fueron encapsuladas son transportadas hasta la mucosa intestinal, donde son absorbidas por los enterocitos. En algunas ocasiones las micelas formadas en la digestión de lípidos llegan a tamaños menores a los 100 nm, considerándose estas dimensiones como nanopartículas (McClements, 2013).

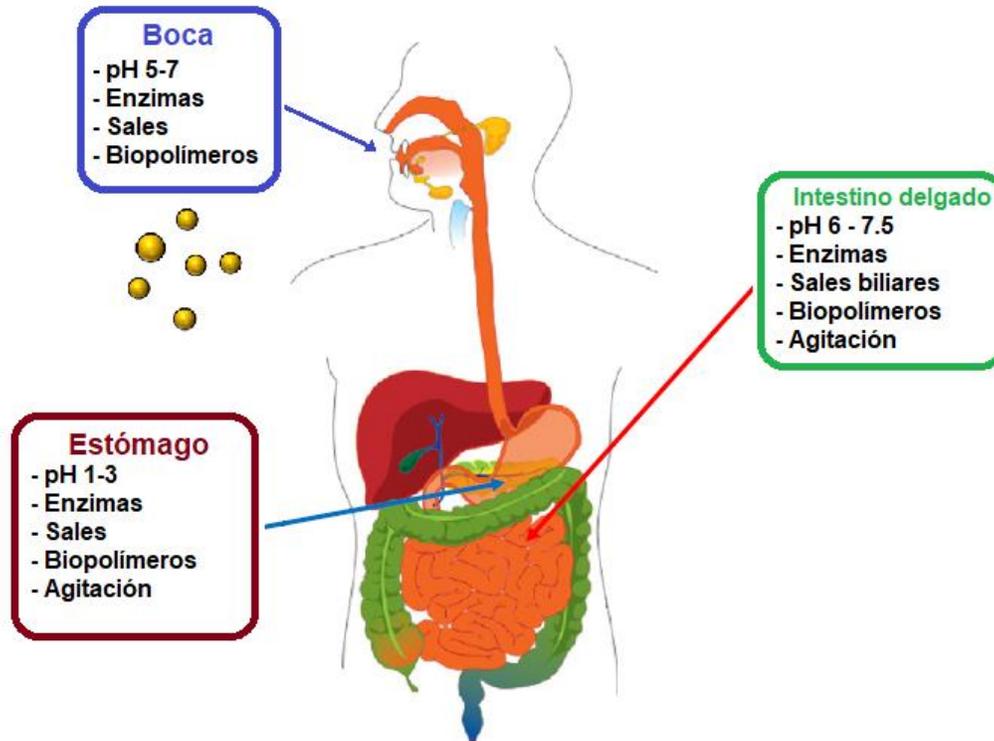


Figura 15. Condiciones fisiológicas y fisicoquímicas de las distintas regiones del sistema gastrointestinal (McClements, 2013)

1.13.4 Absorción de emulsiones

La absorción es el proceso en el cual una sustancia se transfiere desde el tracto gastrointestinal hacia las células del epitelio que lo recubre. Después, dichas sustancias son transportadas al torrente sanguíneo y posteriormente a los tejidos. Las emulsiones en algunos casos consisten en compuestos bioactivos atrapados dentro de la matriz, y hay dos aspectos a considerar al momento de la absorción, 1) absorción de los compuestos bioactivos y 2) absorción de las partículas de la emulsión; de igual manera es importante distinguir la región en donde ocurre la absorción, que generalmente ocurre en el intestino delgado. Si la emulsión original fue completamente digerida antes de llegar al sitio de absorción, entonces solo se debe tomar en cuenta la capacidad de absorción del compuesto bioactivo. Por otro lado, si la emulsión original está compuesta por una interface o un núcleo no diferible, es posible que llegue intacta al sitio de absorción, en este caso se debe considerar tanto la absorción de la emulsión como del compuesto bioactivo. Estas

partículas pueden ser absorbidas directamente en el cuerpo por algunos de los mecanismos que se mencionaran enseguida, dependiendo de su tamaño, composición y carga superficial. Es importante recalcar que los compuestos encapsulados dentro de la emulsión pueden presentar distintos destinos como: a) permanecer dentro de la emulsión y no ser absorbidos, b) pueden permanecer dentro de la emulsión y ser absorbidos completamente, c) pueden salir de las partículas e incorporarse a micelas mixtas, d) pueden liberarse de la emulsión y ser destruidas o no absorbidas (McClements, 2013). La mucosa intestinal (capa viscoelástica altamente compleja que recubre las células del epitelio intestinal) es otra barrera a tomar en cuenta en la asimilación de partículas, ya que en general existen dos mecanismos que pueden restringir el paso de los glóbulos de las emulsiones a través de la mucosa (Ensign *et al.*, 2012): a) el tamaño de los poros de la mucosa, debido a que se ha observado que existen distintos tamaño dentro de la capa de la mucosa, aunque se ha visto que en general pueden penetrar partículas de hasta 400 nm, las partículas más pequeñas pasarán con facilidad a través de la mucosa (Cone, 2009), b) Las interacciones moleculares son otro factor importante para el paso de partículas a través de la mucosa, puesto que es químicamente muy compleja y es capaz de interactuar con las partículas a través de una gran variedad de interacciones, por ejemplo, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno. Si una partícula es fuertemente atraída por las cargas de la mucosa entonces puede quedar adherida a ella y ser transportada; estos procesos de mucoadhesión aumentan el tiempo de residencia de las partículas dentro del sistema GI, lo que puede permitir a un mayor grado de absorción (McClements, 2013).

Una vez que la partícula ha penetrado a través de la mucosa intestinal, es absorbida por las células del epitelio, dependiendo de su tamaño y características superficiales. Hay dos tipos de células donde puede ocurrir la absorción de partículas: los enterocitos y las células-M. Los enterocitos son el tipo de células más abundantes que recubren el intestino, pero no son eficientes en la absorción de partículas. Por otro lado las células M son mucho menos numerosas (<1% de las células del epitelio), pero son más eficientes en la absorción de partículas; estas

son responsables de absorber e identificar los antígenos ingeridos, que incluyen macromoléculas, microorganismos y ciertos tipos de partículas, que luego envían al sistema linfático para inducir la respuesta inmune (Fröhlich y Roblegg, 2012).

A) Mecanismo paracelular

Las nanopartículas que son lo suficientemente pequeñas pueden pasar a través de los pequeños espacios que separan las células epiteliales; este mecanismo ha sido sugerido para explicar el transporte de nanopartículas lipídicas sólidas a través de las células del epitelio (McClements y Rao, 2011).

B) Mecanismo transcelular

Las nanopartículas pueden ser lo suficientemente pequeñas para ser absorbidas directamente a través de las membranas de las células epiteliales por mecanismos de transporte activos y pasivos. Normalmente ocurre por el mecanismo de endocitosis, en donde la nanopartícula se encuentra con la membrana celular y es envuelta con esta, luego parte de la membrana se desprende para formar una vesícula con una nanopartícula atrapada en su interior. Este proceso puede ocurrir en células de enterocitos, pero por lo general es más prevalente en células-M. Se ha estimado que los enterocitos pueden ser capaces de absorber partículas con tamaños de 50 a 100 nm por este mecanismo, mientras que las células-M lo pueden hacer con partículas de hasta 500 nm (McClements, 2013).

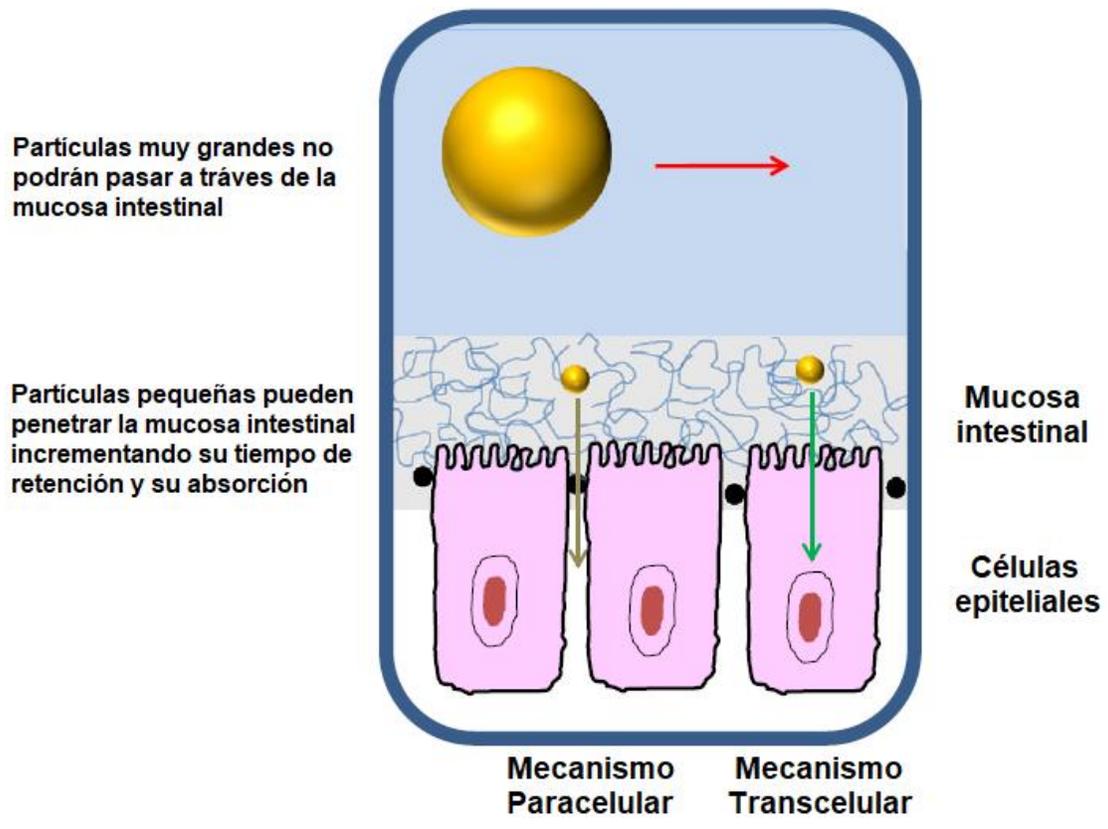


Figura 16. Mecanismos de absorción de emulsiones a través del epitelio intestinal

2 JUSTIFICACIÓN

Uno de los tratamientos para el control de la diabetes consiste en la administración de insulina por vía subcutánea, el cual es un método doloroso e incómodo. Actualmente no existe un método efectivo de administración oral de insulina debido a su baja biodisponibilidad generada por la degradación enzimática. En los últimos años los SNEDDS han sido propuestos como una alternativa para esta problemática, la incorporación de insulina en este tipo de sistemas puede llevarse a cabo mediante la formación de complejos con fosfolípidos; sin embargo, hasta el día de hoy estos sistemas han mostrado una buena bioaccesibilidad, pero muy baja absorción. Una alternativa propuesta para aumentar la biodisponibilidad de estos sistemas es la incorporación de ácidos grasos de cadena media a los fosfolípidos, puesto que estos ácidos grasos no son buenos sustratos para las lipasas y son absorbidos más fácilmente por el epitelio intestinal.

3 HIPÓTESIS

Los complejos insulínicos formados por fosfolípidos y fosfolípidos modificados acoplados a un sistema auto-nanoemulsificable incrementarán la biodisponibilidad, bioaccesibilidad y bioactividad oral de la insulina.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema auto-nanoemulsificable cargado con complejos de insulina-fosfatidilcolina y fosfatidilcolina modificada, para incrementar la bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad oral de la insulina.

4.2 Objetivos específicos

- Formular, desarrollar y caracterizar los SNEDDS
- Formar complejos insulínicos con fosfolípidos y fosfolípidos modificados e incorporarlos en un SNEDDS
- Evaluar la bioaccesibilidad *in vitro* del complejo insulínico incorporado en un SNEDDS
- Evaluar la biodisponibilidad y bioactividad de la insulina en un modelo murino de ratas Wistar con diabetes inducida

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales y reactivos

El aceite y co-surfactante, Lauroglycol FCC y Labrafil M1944CS, respectivamente, fueron proporcionados por Gattefossé para la realización de los SNEDDS. La fosfatidilcolina de Soya con 95% de pureza se obtuvo de Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Fosfolipasa PLA1 Lecitase® Ultra fue proporcionada sin costo por Novozymes (Dinamarca). Ácido caprílico, Cremphor EL, insulina humana recombinante, estreptozotocina, mucina porcina, albumina bovina, pepsina y lipasas fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los kits para determinación de glucosa (Bio-insulina®) e insulina en sangre (Bio-insulina®) fueron adquiridos de Grupo MEXLAB (México). Los solventes y reactivos grado HPLC utilizados en este trabajo fueron adquiridos de Teqsiquim (Ciudad de México).

5.2 Obtención de fosfatidilcolina modificada con ácidos grasos de cadena media a partir de fosfatidilcolina de soya mediante modificación enzimática

5.2.1 Inmovilización de enzima fosfolipasa en Duolita

Para la inmovilización de la enzima fosfolipasa A1, se pesaron 100 g del concentrado enzimático Lecitase® Ultra (1.5% de proteína) y se mezclaron con un volumen igual de buffer Tris-HCl 0.1N (pH 8). La enzima en suspensión se mezcló con 20 g de soporte (Duolita A568) y se sometió a agitación orbital a 300 rpm, a una temperatura de 50 °C. Se tomaron muestras del sobrenadante (50 µL) para el análisis de proteína. Después de 12 horas, la suspensión de enzima inmovilizada se pasó por papel filtro Whatman y los sólidos se lavaron con 500 mL de buffer Tris, se secaron en estufa de vacío a 30 °C por 12 h. La preparación enzimática seca se utilizó para catalizar las reacciones de acidólisis (García *et al.*, 2008).

5.2.2 Cuantificación de la retención de enzima en Duolita

Para determinar la adsorción de la enzima en el soporte se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976) usando un espectrofotómetro Agilent 8453 para medir la absorbancia. Se empleó albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para la elaboración de la curva de calibración. Las muestras tomadas del sobrenadante (50 μL) del punto anterior se mezclaron con 450 μL de buffer Tris; de esta mezcla se tomaron 100 μL y se le añadieron 3,500 μL de reactivo de Bradford, se dejaron reposar las muestras por 10 minutos y posteriormente se leyeron en el espectrofotómetro a 595 nm.

5.2.3 Síntesis de fosfatidilcolina modificada rica en AGCM a partir de PC de soya

La síntesis de PC rica en AGCM se llevó a cabo a través de una reacción enzimática de acidólisis, utilizando fosfolipasa A1 Lecitase[®] Ultra inmovilizada en Duolita. Como primer paso la PC de soya se disolvió en hexano por medio de ultrasonificación en una relación de 4 mL de solvente por cada gramo del fosfolípido. Una vez disuelta la PC, la reacción se llevó a cabo a las siguientes condiciones: temperatura de 50 °C, concentración de enzima inmovilizada de 10 %, relación molar de sustratos (PC:AGCM) 1:16 y agitación orbital de 300 rpm (Baeza *et al.*, 2012).

Para la elaboración de cinéticas, se utilizó 1 g de fosfatidilcolina de soya, la PC y el resto de los reactivos y solventes, se colocaron en matraces Erlenmeyer con tapa rosca de 25 mL. La reacción se llevó a cabo en un agitador orbital Thermo MaxQ[™] 4450 operando a las revoluciones establecidas, por un periodo de 24 horas. Se tomaron muestras de 50 μL de reacción a las 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas para determinar la incorporación de AGCM a la PC.

5.2.4 Determinación de la incorporación de los ácidos grasos de cadena media a la fosfatidilcolina

La incorporación de AGCM a la PC de soya fue analizada mediante cromatografía de gases (CG). Los ácidos grasos esterificados fueron derivatizados a metil esteres por metilación alcalina. Para esto se tomaron 10 mg de la mezcla de reacción y se le incorporó una alícuota de 100 μ L de ácido tridecanoico metil ester diluido en hexano (50 mg de ácido tridecanoico metil ester en 10 mL de hexano) y el solvente fue removido con nitrógeno. A continuación, se añadieron 2.5 mL de metóxido de sodio 0.5 N en metanol y la reacción se mantuvo a temperatura de 80 °C por 10 minutos. Pasado este tiempo, las muestras fueron enfriadas en un baño de hielo por aproximadamente 1 minuto. Con el fin de recuperar los metil esteres de los ácidos grasos se agregaron 2 mL de hexano grado HPLC y se agitó para incorporar los componentes en la fase orgánica. Por último, se adicionaron 5 mL de solución de bicarbonato de calcio (9 g de NaCO_3 en 100 mL de agua mili-Q) y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. La fase del hexano se recuperó en viales para cromatógrafo de gases y se mantuvieron a temperatura de congelación hasta su análisis.

Para el análisis y la cuantificación los ácidos grasos del fosfolípido, se inyectó una alícuota de 1 μ L en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 6890 equipado con un detector de ionización de flama y se utilizó una columna capilar HP-INNOWAX de Polietilenglicol (60 mm X 0.25 mm X 0.25 mm). El método consistió en una temperatura inicial de 190 °C por 1 minuto seguido de una rampa de 4 °C por minuto hasta una temperatura final de 210 °C. El tiempo de corrida fue de 30 minutos. El puerto de inyección se mantuvo a una temperatura de 200 °C y el detector a 230 °C. Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas acarreador a un flujo constante de 1 mL/min (Esperón *et al.*, 2017).

5.2.5 Determinación del rendimiento de la reacción de acidólisis de PC-modificada

Para cuantificar el rendimiento de la obtención de PC modificada durante la reacción de acidólisis se empleó un análisis por HPLC en fase normal; para ello se

tomaron 2 mg de muestra de reacción y se diluyeron con 1.5 mL de hexano grado HPLC; una vez mezclada la muestra y el solvente se hicieron pasar por filtros de nylon para jeringa de 0.45 μm . El volumen de inyección fue de 15 μL y el sistema cromatográfico consistió de una bomba binaria de HPLC (Waters 1525), un inyector automático (Waters 717plus), un detector UV-Visible (Waters 2487) puesto a 203 nm y 205 nm y se empleó una columna Econosil Sílica 5U de fase normal (250 x 4.6 mm) de Alltech a 40°C para la separación. La fase móvil empleada consistió en acetonitrilo:metanol:ácido fosfórico (130:5:1.5 v/v/v) con un flujo isocrático de 1 mL/min y un tiempo de corrida de 18 min (Ochoa *et al.*, 2013).

5.2.6 Purificación de PC-modificada por cromatografía en columna

La remoción de ácidos grasos de la reacción de acidólisis se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna abierta por gravedad fase normal. Para efectuarlo se utilizó una columna cromatográfica de 560 mm de largo por 55 mm de diámetro, empacada con 600 g de silicagel de 60-200 mesh de diámetro medio de partícula y 60 Å de diámetro medio de poro (Sigma Aldrich). Se utilizó como fase móvil cloroformo para la separación de los ácidos grasos y metanol para la disgregación de fosfolípidos. Para el empacado de la columna, se hidrató el gel de sílice con la mezcla de disolventes de elusión a utilizar y se empleó una relación 1/100 (peso de producto/peso de gel de sílice) para la separación de compuestos (Chávez *et al.*, 2017).

5.3 Elaboración del complejo insulina-PC e insulina-PCM

Para la elaboración del complejo insulina fosfatidilcolina e insulina-fosfatidilcolina modificada acorde al método de Cui (2006), se utilizó insulina humana recombinante 27 UI/mg (Sigma Aldrich). Para realizar el complejo se tomó en cuenta una relación molar de 1:60 insulina-fosfatidilcolina respectivamente y se le adicionó 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) con 5% de ácido acético anhidro para

hacer más soluble el DMSO en la mezcla de insulina-PC. La mezcla se llevó a agitación suave hasta que se formó una mezcla clara y homogénea. Posteriormente, para eliminar el DMSO y formar las micelas inversas alrededor de la molécula de insulina, se liofilizó la mezcla a -40°C y a una presión de vacío de 10 Pa (Cui *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014)

5.4 Pre-formulación del SNEDDS

Para elegir el sistema auto-nanoemulsificable adecuado, que cumpliera con tamaños de partícula menores a 200 nm y un bajo índice de polidispersidad, se probó con distintas formulaciones, las cuales consistieron de un diseño 3^3 el cual se presenta en la Tabla 4.

Como fase oleosa se empleó lauroglycol FCC, como surfactante Cremophor El y como co-surfactante Labrafil M1944CS, los cuales fueron mezclados con las concentraciones correspondientes a cada tratamiento mencionados en la Tabla 5, se mezclaron y se sonicaron por 1 min en un baño ultrasonificador a 25°C . Posteriormente, por cada gramo de pre-formulación se añadieron 100 mL de agua destilada a 37°C con agitación orbital de 300 rpm por 3 minutos (Karamanidou *et al.*, 2015). Cada tratamiento se realizó por duplicado y se caracterizaron mediante el tamaño de glóbulo, potencial Z e índice de polidispersidad. Las concentraciones de cada fase para llevar a cabo la emulsificación espontánea se seleccionaron acorde al tamaño de partícula del rango establecido para ser consideradas nanoemulsiones.

Tabla 5. Diseño factorial para las formulaciones de las SNEDDS

Tratamiento	Fase oleosa Lauroglycol FCC (mg)	Tensoactivo Cremophor EL (mg)	Co-Tensoactivo Labrafil M1944 (mg)
1	100	300	50
2			150
3			250
4		500	50
5			150
6			250
7		700	50
8			150
9			250
10	300	300	50
11			150
12			250
13		500	50
14			150
15			250
16		700	50
17			150
18			250
19	500	300	50
20			150
21			250
22		500	50
23			150
24			250
25		700	50
26			150
27			250

5.4.1 Caracterización de las pre-formulaciones

Después del proceso de auto-nanoemulsificación, se caracterizaron las muestras con el fin de estudiar la influencia de las variables sobre la emulsificación

espontánea y las propiedades de la nanoemulsión, tales como la carga superficial, el tamaño de glóbulo e índice de polidispersidad.

5.4.1.1 Análisis del tamaño del glóbulo y distribución

El tamaño de glóbulo y la distribución se realizaron mediante la técnica de dispersión de luz dinámica utilizando un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments), que posee un intervalo de detección de 0.3 nm a 5 μm . El tamaño promedio de glóbulo reportado fue proporcionado por el equipo como diámetro promedio, la distribución del tamaño de glóbulo fue determinada por el índice de polidispersidad, el cual es una medida adimensional que describe la amplitud de la distribución del tamaño del glóbulo; este mide la varianza de la distribución, así valores de cero o cercanos a cero indicarán diámetros de glóbulos monodispersos y conforme aumente la diferencia de tamaños entre glóbulos el valor de polidispersidad tenderá a uno, y por último el percentil D90, que indica, el tamaño de partícula bajo el cual se encuentran el 90% de los glóbulos de la nanoemulsión. Para llevar a cabo las mediciones fueron tomados 100 μL de la emulsión y se diluyeron en 900 μL de agua milli-Q y se colocaron en una celda para ser leída.

5.4.1.2 Medición del potencial zeta

La carga superficial de los glóbulos se analizó midiendo el potencial zeta de las nanoemulsiones, utilizando el equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments). Que se basa en la técnica de Microelectroforesis laser-doppler (Loyo, 2017). Para llevarlo a cabo, 100 μL de la emulsión se diluyeron en 900 μL de agua milli-Q y se llevaron a una celda para ser leída a 25°C con un ángulo de dispersión de 90°C.

5.5 Elaboración de diagrama de fases ternario

Una vez caracterizadas todas las pre-formulaciones, todas aquellas nanoemulsiones que obtuvieron un diámetro de gota < 200 nm y contaban con una distribución monomodal fueron consideradas como nanoemulsiones. Los datos de cada tratamiento y sus promedios de partícula se ingresaron al programa SigmaPlot® para graficar el área de nanoemulsificación espontánea dentro del diagrama de fases.

5.6 Elección del SNEDDS

Para elegir el SNEDDS se tomó en cuenta el tamaño de partícula de las nanoemulsiones, se eligieron aquellas que ostentaban un tamaño menor a 200 nm, así como una distribución monomodal y un bajo índice de polidispersidad (< 0.2).

5.7 Evaluación de los efectos y porcentaje de incorporación del complejo en los SNEDDS

Con el fin de evaluar los efectos del porcentaje incorporado de complejo en los sistemas auto-nanoemulsificables, se emplearon tres distintas concentraciones de complejo embebido en la fase oleosa, correspondientes al 0%, 2.5% y 5%, los cuales se incorporaron mezclando y agitando suavemente el complejo insulina-Fosfatidilcolina en Lauroglycol FCC, por el tiempo que fuera necesario hasta lograr la formación de una mezcla traslúcida y homogénea, esto indicaba la total disolución de los compuestos. Una vez mezclados se procedió a incorporar las cantidades de surfactante y co-surfactante correspondiente, y formar las nanoemulsiones para medir los cambios en su distribución, tamaños de partícula y PDI, mediante la técnica descrita en el punto 5.3.1.1.

Una vez seleccionado el porcentaje de incorporación del complejo, se procedió a cuantificar el porcentaje de incorporación, el cual se logró, preparando 2

mL del sistema a 37°C con agitación suave y centrifugándola a 10000 rpm por 30 min. En la fase acuosa quedó la insulina que no fue capaz de unirse al SNEDDS y que por lo tanto se consideró como insulina no encapsulada. La cuantificación de su concentración se llevó a cabo mediante un kit ELISA.

5.8 Evaluación de la bioaccesibilidad en un sistema de digestión *in vitro*

Con ayuda del diagrama de fases, se eligieron 3 composiciones de SNEDDS para someterlos a las condiciones *in vitro* del sistema gastrointestinal. La evaluación *in vitro* se valoró en tres distintas etapas que correspondían a la fase de boca, estómago e intestino delgado (Loyo, 2017). Es en este último, donde se lleva a cabo la absorción del nanosistema.

Para recrear la saliva se utilizó una mezcla de sales inorgánicas y mucina porcina (las composiciones se muestran en la Tabla 6). Una muestra de 4 mL de SNEDDS, se mezcló con un volumen igual de solución salival y se ajustó el pH a 6.8 con ayuda de una solución de hidróxido de sodio al 0.1 M. La muestra se incubó a 37°C durante 10 minutos con una agitación de 100 rpm.

Tabla 6. Composición de solución salival simulada

Compuesto	g/L
Cloruro de sodio	1.594
Nitrato de amonio	0.328
Fosfato de potasio	0.636
Cloruro de potasio	0.202
Citrato de potasio	0.308
Urea	0.198
Sal sódica de ácido láctico	0.146
Mucina	0.30

La fase gástrica se simuló con una solución que imitaba los jugos gástricos que contenía 2 g de cloruro de sodio, 7 mL de ácido clorhídrico y 3.2 g de pepsina. Todos los componentes se disolvieron y aforaron a 1 L de agua; el pH de esta

solución de ajustó a 1.2 con ayuda de ácido clorhídrico 1 M. Posteriormente, a los 4 mL de nanoemulsión mezclados con los 4 mL de solución salival se les agregaron 8 mL de la simulación de jugo gástrico previamente mencionada. Se modificó el pH de la muestra a 2.5, utilizando hidróxido de sodio 1 M y se mantuvo a 37 °C con 100 rpm de agitación por 2 h.

Para preparar la muestra a las condiciones del intestino delgado, se ajustó el pH de la muestra a 7 utilizando hidróxido de sodio 1 M y se agregaron 2.1 mL de sales biliares (46 mg/mL) y 0.5 mL de cloruro de calcio (110 mg/mL) disueltos en tampón fosfato pH 7; se comprobó el pH de 7 y si era necesario se ajustó con hidróxido de sodio. Para finalizar se adicionó 1.3 mL de lipasa (15 mg/mL) disuelta en buffer de fosfato. El pH de la muestra se controló y se cuantificó el volumen de NaOH 0.25 M necesarios para neutralizar los ácidos grasos liberados por la digestión (es decir, mantener un pH de 7 durante dos horas).

5.9 Evaluación de la biodisponibilidad de la insulina de forma oral en un modelo murino

5.9.1 Inducción de diabetes experimental a ratas Wistar

La inducción de diabetes experimental se realizó en ratas Wistar macho, con un peso corporal entre 150g y 250g, con un rango de edad de 7 a 8 semanas, llevadas a un proceso de adaptación de 7 días en el Bioterio de experimentación del laboratorio de Química de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz, bajo condiciones y cuidados acuerdo a la Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999.

Una vez terminada la semana de adaptación, a cada animal le fue administrada una dosis única de 55 mg.Kg⁻¹ de peso corporal de estreptozotocina por vía intraperitoneal, empleando un volumen de administración de 0.5 mL/100g de peso corporal. Las soluciones de estreptozotocina fueron preparadas inmediatamente antes de su utilización, disolviendo la cantidad necesaria del compuesto en buffer citrato de sodio 100 mM, pH 4.5.

Con el propósito de evitar la muerte de los roedores por la hipoglicemia que se produce durante las primeras 24 h de acción de la estreptozotocina, se proporcionó a los animales una solución de glucosa al 15% durante este periodo; una vez pasado este lapso, se suspendió la entrega de la solución del glúcido y se continuó con la administración de agua común. Los niveles de glucosa y la variabilidad del peso fueron evaluados 6 días después de la inducción a cada uno de los grupos establecidos.

5.9.2 Determinación de los niveles de glucosa en sangre

El nivel de glucosa en sangre de los animales fue cuantificado mediante el método enzimático GOD-POD (Kit Bio-Glucosa MEXLAB). Se extrajeron muestras sanguíneas de 200 μ L mediante la técnica de corte de cola y recibidas en microtubos eppendorf® de 1.5 mL. Después de 20 min de reposo, las muestras ya coaguladas fueron centrifugadas a 5500 rpm por 5 min a 10 °C para separar el plasma del paquete globular y fueron almacenadas a 4 °C hasta su utilización. Una muestra de 10 μ L de plasma fueron mezclados con 1mL del reactivo GOD-POD e incubado por 5 min a 37°C para posteriormente evaluar los niveles de glucosa mediante espectrofotometro a 505 nm. Los resultados se obtuvieron leyendo las absorbancias de cada muestra y multiplicándolas por un factor, el cual se estimó con la ayuda de un calibrador sérico (MEXLAB), con una concentración conocida de 194 mg/dL y aplicando la formula proporcionada por el fabricante

$$Factor = \frac{Concentración\ calibrador}{Abs.\ Calibrador}$$

Una vez conocido dicho factor, los valores de absorbancia de las muestras fueron multiplicados por este valor. Las concentraciones de glucosa fueron expresadas en mg/dL.

5.9.3 Evaluación de la biodisponibilidad oral de insulina en un modelo murino

Para evaluar la biodisponibilidad de la insulina cargada en las SNEDDS, se formaron 5 grupos de ratas Wistar diabéticas con 5 individuos cada uno. Las ratas tuvieron un ayuno de una noche antes del tratamiento y durante las 8 horas que duró el procedimiento, permitiendo solamente agua *ad libitum*. Posteriormente, al grupo 1, no se le administró ningún tratamiento, al grupo 2, se le administró insulina de forma tradicional, es decir, 2 UI/Kg de forma subcutánea, al grupo 3, se le proporcionaron 50 UI/Kg de solución de insulina, al grupo 4, se le dieron 50 UI/Kg de insulina en complejo con fosfatidilcolina cargada en el SNEDDS, y por último al grupo 5 se le administraron 50 UI/kg de insulina en complejo con fosfatidilcolina modificada cargada en SNEDDS. Una vez administrados los tratamientos se tomaron muestras sanguíneas por corte de cola en el tiempo 0 y posteriormente cada 1, 2, 4, 6 y 8 horas, las muestras se recibieron en microtubos eppendorf, y se centrifugaron a 5500 rpm a 10 °C por 5 minutos. Por último, el suero se separó y se almacenó a -20°C hasta su posterior evaluación.

5.9.4 Medición de la bioactividad oral de insulina en un modelo murino

Para cuantificar los niveles de glucosa se empleó la metodología descrita en el punto 5.8.2, para las muestras de los tiempos 0, 1, 2, 4, 6 y 8 horas después del tratamiento. Para medir la reducción de la glucemia se empleó la siguiente fórmula

$$\frac{\text{Nivel de glucosa medido}}{\text{Nivel de glucosa inicial}}$$

Los resultados se graficaron como porcentaje de glucosa medido con respecto al tiempo.

5.9.5 Cuantificación de concentración de insulina en sangre

Para cuantificar los niveles de insulina en plasma, se tomaron 25 μL de suero de rata y se siguieron las indicaciones del fabricante del Kit Elisa insulin; de esta forma se calcularán los niveles de insulina en plasma y se graficará como μg de insulina en plasma con respecto al tiempo.

5.10 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los diseños, fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias mediante pruebas Tukey, con un nivel de significancia de $p < 0.05$ utilizando el software estadístico STATGRAPHICS® Centurion XVI.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Modificación de fosfatidilcolina con ácidos grasos de cadena media

6.1.1 Inmovilización de enzima PLA₁ en Duolita

Se utilizó la resina polimérica de intercambio aniónico Duolite® A568 como soporte para la inmovilización de la fosfolipasa PLA₁. La adsorción de la enzima en el soporte se realizó midiendo el contenido de proteína antes y después de la inmovilización por el método de Bradford (1976). La curva de calibración obtenida por el método espectrofotométrico de la albúmina se ilustra en el apéndice A. Acorde a los resultados obtenidos se logró la máxima incorporación del 98% de la enzima PLA₁ en Duolita a las 8 h de la reacción y 50 °C, adsorbiendo un total de 24.5 mg de proteína por cada gramo de soporte, a partir de una suspensión inicial de 25 mg de proteína por gramo de suspensión. García y colaboradores (2008) con las mismas condiciones lograron inmovilizar a las 12 h hasta 52 mg de proteína por gramo de soporte, con una concentración inicial de 75 mg de proteína por gramo de soporte, es decir un rendimiento de inmovilización de aproximadamente el 70%

Estos resultados son comparables con lo reportado por García y colaboradores (2008).

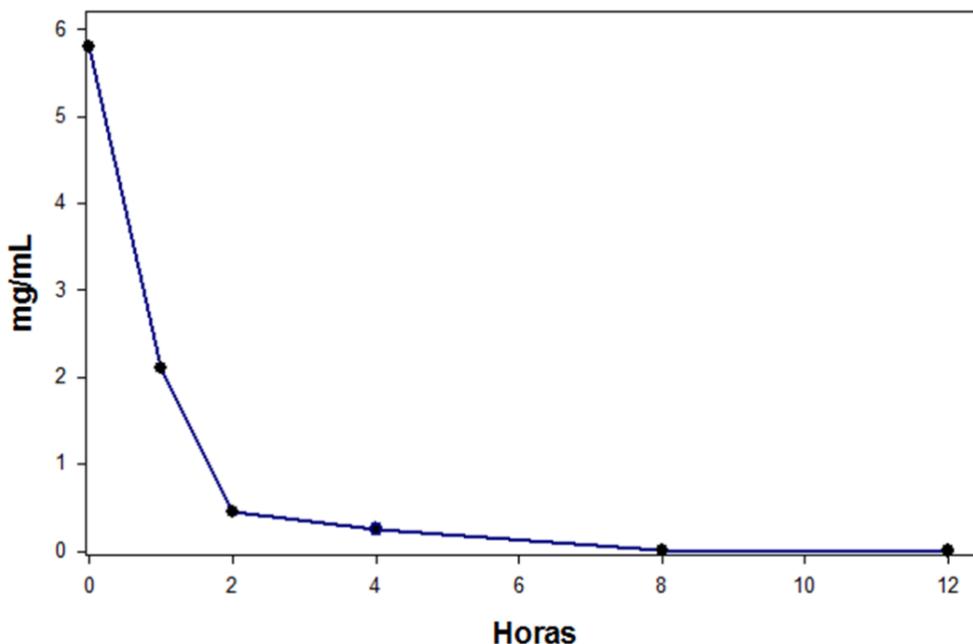


Figura 17. Cinética de la inmovilización de la enzima PLA₁ en Duolita

6.1.2 Síntesis de Fosfatidilcolina modificada rica en AGCM utilizando PLA₁ inmovilizada en Duolita.

Una vez inmovilizada la fosfolipasa en el soporte se continuó con la modificación de la composición de ácidos grasos de la fosfatidilcolina, reemplazando ácidos grasos de cadena larga, por ácidos grasos de cadena media.

6.1.2.1 Incorporación de AGCM a PC

Para realizar la modificación se utilizó ácido caprílico como aceite de cadena media, y PC de soya, a la cual se le determinó su composición molar de ácidos grasos mediante derivatización con metilación alcalina con metóxido de sodio 0.5 N y un posterior análisis por cromatografía de gases, utilizando ácido tridecanoico (13:0) metilado como estándar interno para la cuantificación de los ácidos grasos. Los resultados obtenidos mostraron la siguiente composición: ácido palmítico (16:0) 12.74%, ácido esteárico (18:0) 3.53%, ácido oleico (18:1 n-9) 9.93%, ácido vaccénico (18:1 n-7) 1.74%, ácido linoleico (18:2 n-6) 64.81%, ácido α -linolénico (18:3 n-3) 7.25%. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 18.

La cinética de incorporación de ácido caprílico a la estructura de la PC se realizó mediante acidólisis, utilizando PLA₁ inmovilizada en Duolita. Cada gramo de PC utilizado se disolvió en 4 mL de hexano y por último las condiciones que se utilizaron corresponden a 50°C, 10% de enzima inmovilizada, agitación orbital de 300 rpm y una relación molar de sustratos 1:16 (PC:AGCM). Como resultado, se obtuvo que la mayor incorporación de ácido caprílico se alcanzó a las 24 h de la reacción; en este tiempo se logró una incorporación molar del 57.44%. Es importante mencionar que el máximo porcentaje teórico de incorporación es del 50%, debido a que la PLA₁ solo hidroliza o re-esterifica en la posición sn-1 del fosfolípido; sin embargo, durante el proceso pueden ocurrir migraciones de acilos, donde los ácidos grasos de la posición sn-1 pasan a la posición sn-2, y es debido a

esto que pueden obtenerse rendimientos mayores a los teóricos. La incorporación alcanzada en este trabajo es mayor a la obtenida en otros trabajos, como los reportados por Vikbjerg en 2005, donde alcanzaron un 51% de incorporación molar de ácido caprílico en fosfatidilcolina en 70 h de reacción. Por otra parte, Li y colaboradores en 2014, ligaron DHA y EPA a PC por medio de una reacción de acidólisis catalizada por PLA1 inmovilizada, alcanzando una máxima incorporación del 30.7% a las 24 h. De igual forma, Ochoa y colaboradores (2013) incorporaron ácidos grasos de cadena media obteniendo una incorporación molar del 41% de ácidos grasos de cadena media en PC a una concentración molar de PC y AGCM 1:16, respectivamente y una concentración de enzima del 16 %. Sin embargo, como se pudo observar en el presente trabajo se lograron incorporaciones del 57.4% a las 24 h usando 10% de enzima inmovilizada.

En la Figura 19 se muestra la cinética de incorporación del ácido graso respecto al tiempo en Mol%; en tanto la Figura 20 muestra un cromatograma obtenido por CG de la composición de ácidos grasos de la PC posterior a su modificación.

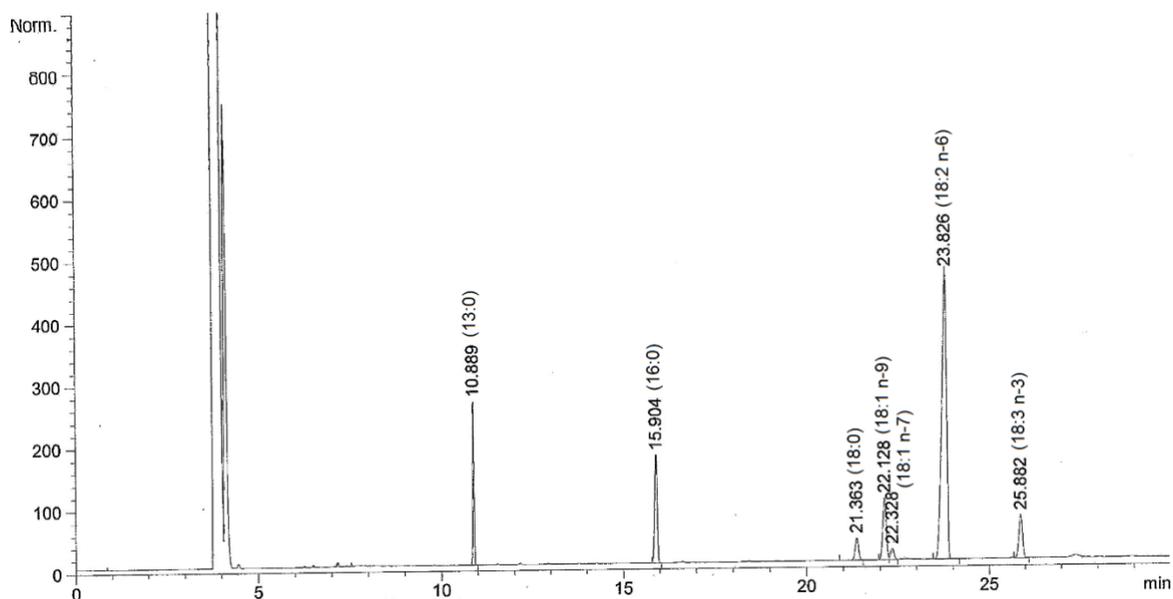


Figura 18. Cromatograma obtenido para la composición de ácidos grasos de fosfatidilcolina sin modificar

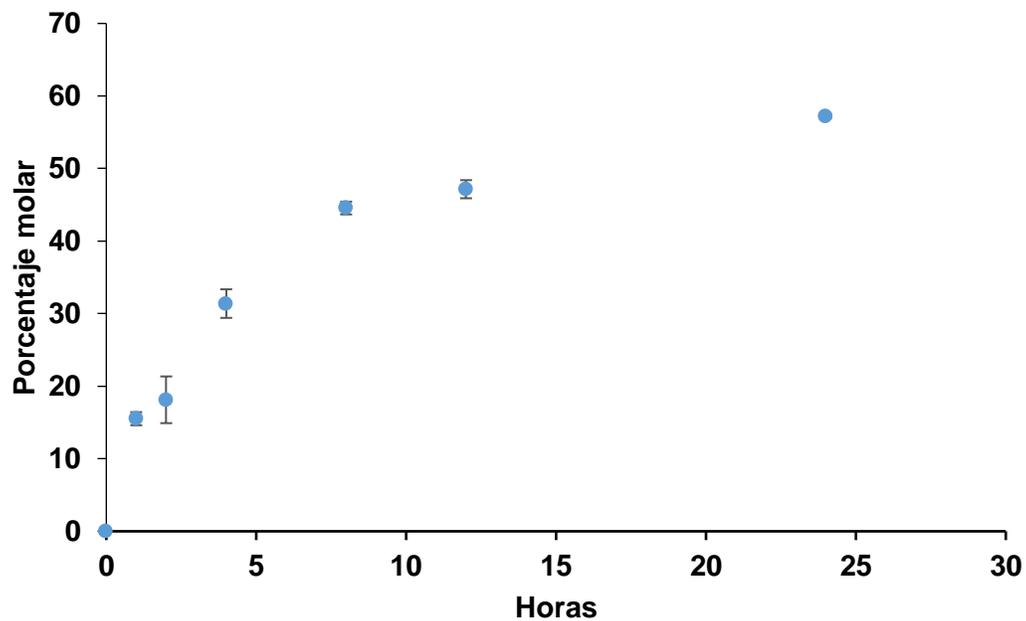


Figura 19. Porcentaje molar de incorporación de AGCM en PC por la enzima PLA1

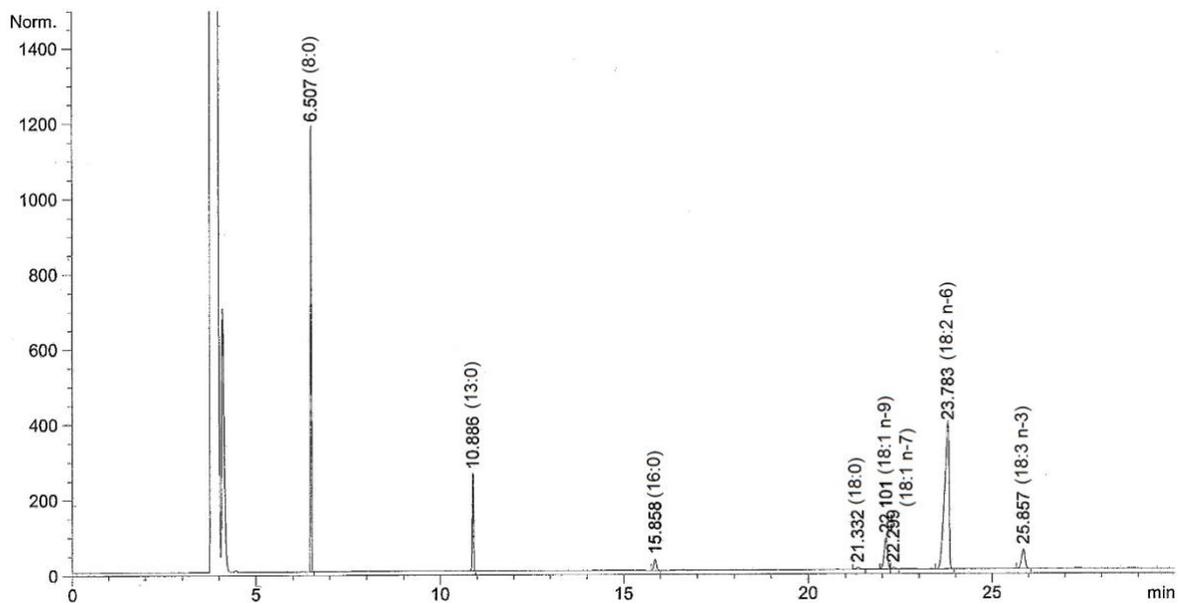


Figura 20. Cromatograma de la composición de ácidos grasos en PCM

6.1.2.2 Rendimiento de Fosfatidilcolina modificada

En la Figura 21 se muestra la cinética obtenida de incorporación de ácidos grasos, rendimiento de PC y PC modificada. El tiempo de máxima incorporación de AGCM y rendimiento de PCM se observó a las 24 h, en donde se obtuvo un 46.4% de transformación de PC a PCM; la fosfatidilcolina se redujo hasta el 9.6% y la incorporación de AGCM alcanzó el 57.4%.

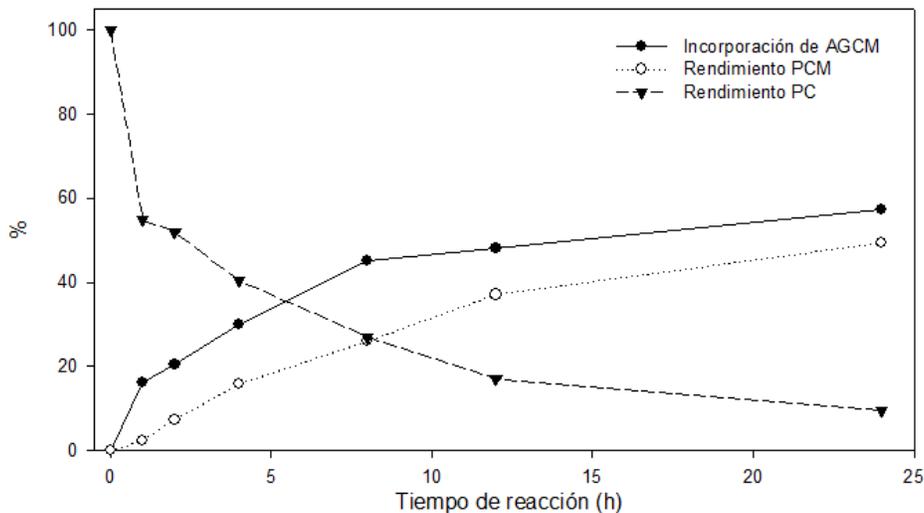


Figura 21. Cinética de incorporación de AGCM, rendimiento de PC y PCM en la reacción de acidólisis catalizada por PLA1

Los cromatogramas DE HPLC obtenidos a las 24h de reacción y al tiempo cero se pueden observar en la Figura 22.

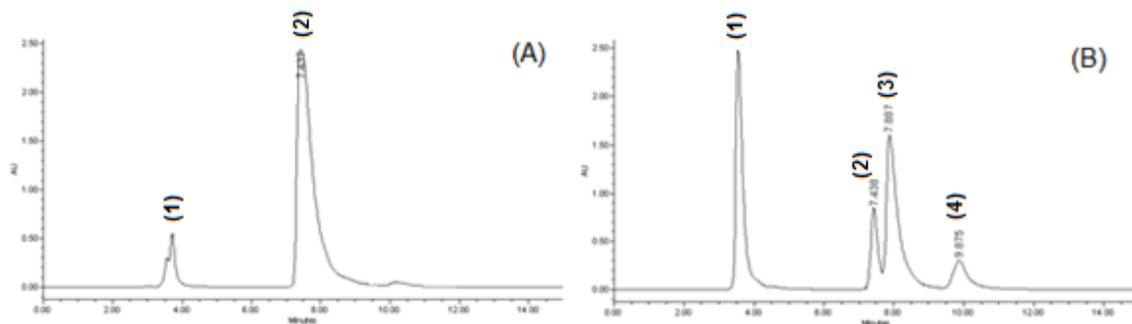


Figura 22. Cromatogramas de los productos de la reacción de acidólisis: (A) tiempo cero de la reacción donde el pico (1) corresponde a AG, (2) a PC y (B)

el tiempo a las 24 h de reacción, donde el pico (1) corresponde a AG, (2) PC, (3) PCM y (4) LPC

En otro trabajo Zhao y colaboradores (2014), modificaron fosfatidilcolina enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados mediante la enzima PLA1 inmovilizada, utilizando condiciones de 55°C y 20% de enzima obtuvieron un 16.7% de transformación de PC enriquecida a las 24h de la reacción. Por otro lado, Ochoa y colaboradores (2017) modificaron PC con AGCM utilizando PLA1 inmovilizada en Duolita, utilizando condiciones de 12% de enzima y 45°C lograron obtener hasta un 53.02% de PCM a las 24 h de la reacción. Por último Xi y colaboradores (2016) modificaron de igual forma PC, esta vez enriquecida con DHA mediante la enzima PLA1 inmovilizada, utilizando una relación molar 1:10 de PC y ácidos grasos libres, respectivamente, una presión de 12 MPa y 50°C, logrando un rendimiento máximo de conversión del fosfolípido de 27.5%. En el presente trabajo se alcanzó un porcentaje de transformación de PC enriquecida con AGCM del 46.4% valores que son cercanos a los alcanzados por el trabajo de Ochoa y colaboradores (2017) que al igual que en la presente investigación, incorporaron AGCM mediante la enzima PLA1 inmovilizada en Duolita.

6.2 Preparación y caracterización de pre-formulaciones de SNEDDS

Con el propósito de estimar el efecto y las interacciones de la concentración de aceite, surfactante y co-surfactante en las características de las SNEDDS (tamaño de glóbulo, potencial Z, PDI), se prepararon distintas nanoemulsiones, variando las concentraciones de las variables independientes, de acuerdo al experimento planteado en la Tabla 5. La formulación empleada se basó en la metodología propuesta por Karamanidou y colaboradores (2015), con algunas modificaciones. Como fase oleosa se utilizó Lauroglycol FCC y se empleó Cremophor EL y Labrafil M1944CS para cumplir las funciones de surfactante y co-surfactante respectivamente. Una vez mezclados los componentes, según su tratamiento, se mezclaron con 100 mL de agua a 37°C por cada gramo de fase oleosa presente en el SNEDDS, obteniendo tamaños nanométricos y una

aparición ligeramente azul y translúcida. El análisis de varianza de los datos conseguidos, para cada una de las variables de respuesta, sobre el efecto en el tamaño de partícula, PDI y potencial Z de las SNEDDS se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis de los efectos de variables independientes sobre las características de las pre-formulaciones de SNEDDS

Factores	Tamaño promedio		PDI		D90		Potencial Z	
	F	P	F	P	F	P	F	P
1	78.7	0.0000	18.30	0.0000	22.49	0.0000	51.3	0.0000
2	7.41	0.0027	31.43	0.0000	23.37	0.0000	65.51	0.0000
3	181.06	0.0000	85.92	0.0000	53.62	0.0000	0.29	0.7493
12	37.67	0.0000	17.97	0.0000	6.18	0.0012	15.19	0.0000
13	11.72	0.0000	16.88	0.0000	6.09	0.0013	6.99	0.0001
23	6.22	0.0011	9.89	0.0000	3.47	0.0207	3.57	0.0118
123	23.32	0.0000	2.95	0.0166	1.38	0.2479	4.49	0.0003

Variables independientes: 1, Fase oleosa (Lauroglycol FCC); 2, Surfactante (Cremophor EL); 3, co-surfactante (Labrafil M1944CS). Valores $P < 0.05$ prueban que estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre las variables dependientes con un 95% de nivel de confianza.

En base a lo descrito por la Tabla 7, se muestra que todas las variables, así como sus interacciones tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el tamaño de partícula resultante de los SNEDDS.

Por lo tanto, para visualizar de mejor manera las condiciones en las cuales se observaba la formación de nanoemulsiones monomodales < 200 nm, se construyó un diagrama de fases ternario, ilustrado en la Figura 23. Los puntos rojos corresponden a las formulaciones con tamaños menores a 200 nm y con distribución monomodal, por otra parte, los puntos negros representan aquellas combinaciones que resultaron con un tamaño mayor a 200 nm y/o con distribución multimodal. Los nueve tratamientos que presentaron nanoemulsificación espontánea se muestran en la Tabla 8. En la Figura 27 se muestran tres ejemplos de formulaciones A), B) y C), que resultaron con tamaños de partícula menores a 200 nm y con comportamiento monomodal, mientras que D), E) y F) corresponden a formulaciones con tamaños superiores a los 200 nm y con una distribución multimodal.

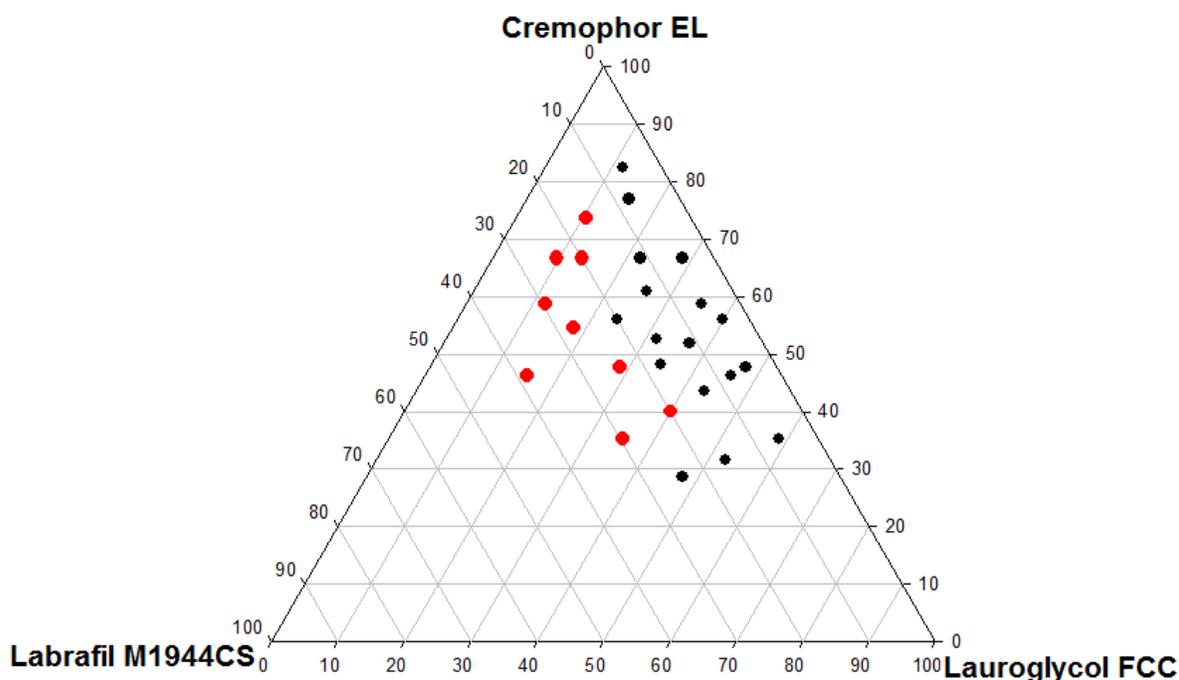


Figura 23. Diagrama de fases ternario de la zona de nanoemulsificación espontánea

Tabla 8. Formulaciones de SNEDDS monomodales con tamaños menores a 200nm

T	Lauroglycol FCC (mg)	Cremophor EL (mg)	Labrafil M1944CS (mg)	Tamaño promedio (nm)	D90 (nm)	PDI
2	100	300	150	25.24±0.27	39.77±0.83	0.093±0.02
3	100	300	250	28.23±0.26	41.95±0.77	0.058±0.01
5	100	500	150	22.18±0.65	33.50±1.15	0.192±0.02
6	100	500	250	24.90±0.68	37.90±3.36	0.073±0.04
8	100	700	150	20.74±0.49	33.53±2.37	0.223±0.04
9	100	700	250	21.89±0.52	33.60±1.24	0.134±0.02
12	300	300	250	48.77±1.59	85.63±4.57	0.142±0.01
15	300	500	250	29.79±0.98	49.47±3.46	0.096±0.01
24	500	500	250	41.31±0.35	70.15±2.40	0.164±0.02

Los valores reportados corresponden a la media ± DS (n=2)

La zona de nanoemulsificación espontánea coincide con lo reportado por Karamanidou en 2015, donde obtuvieron formación de nanoemulsiones espontaneas de hasta 30.1 nm utilizando Lauroglycol FCC como fase oleosa y

Cremophor EL y Labrafil M1944CS como surfactante y co-surfactante, respectivamente. En este trabajo se pudieron obtener partículas ligeramente más pequeñas, de hasta 21.9 nm.

Por otra parte, la Tabla 7 muestra que tanto el co-tensoactivo y el tensoactivo tienen efecto estadísticamente significativo sobre el Índice de Polidispersidad. En la Figura 24 se muestra que en general a menores concentraciones de surfactante y mayores de co-surfactante el PDI presentará menores valores, resultados comparables con lo obtenido por Karamanidou y colaboradores (2015) que observaron que ha mayores cantidades de Labrafil M1944CS en un SNEDDS, se obtenían menores tamaños de partícula, eran menos polidispersos y con mayor estabilidad.

En la parte a) y b) de la Figura 25 se aprecia que generalmente, al aumentar las concentraciones de aceite en el SNEDDS, el tamaño de partícula promedio aumentó, lo que coincide con lo reportado por Shakeel *et al.* (2016). Esto puede ser causado debido a que a mayor concentración de fase oleosa mayor cantidad de surfactante es requerida para que pueda ocurrir la auto-emulsificación.

De igual forma la fase oleosa y surfactante muestran un efecto sobre el potencial Z de las nanoemulsiones, siendo más electronegativas las formuladas con 100 y 500 mg de fase oleosa y las que menos cantidad de surfactante presentaban como se puede apreciar en la Figura 26.

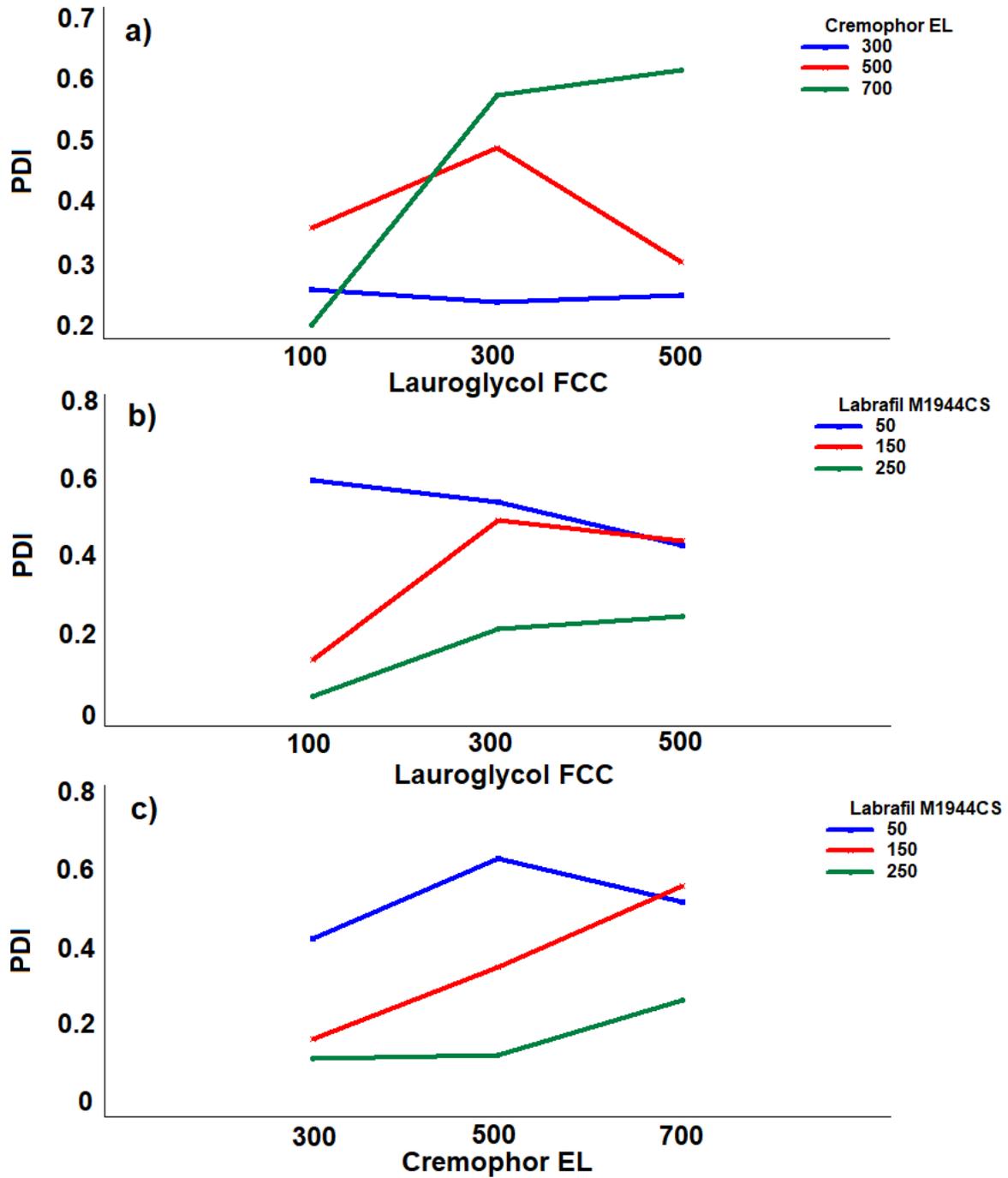


Figura 24. Efecto de la fase oleosa, surfactante y co-surfactante sobre el PDI: (a) Efecto de la fase oleosa vs surfactante, (b) efecto de la fase oleosa vs co-surfactante, (c) efecto del surfactante vs co-surfactante

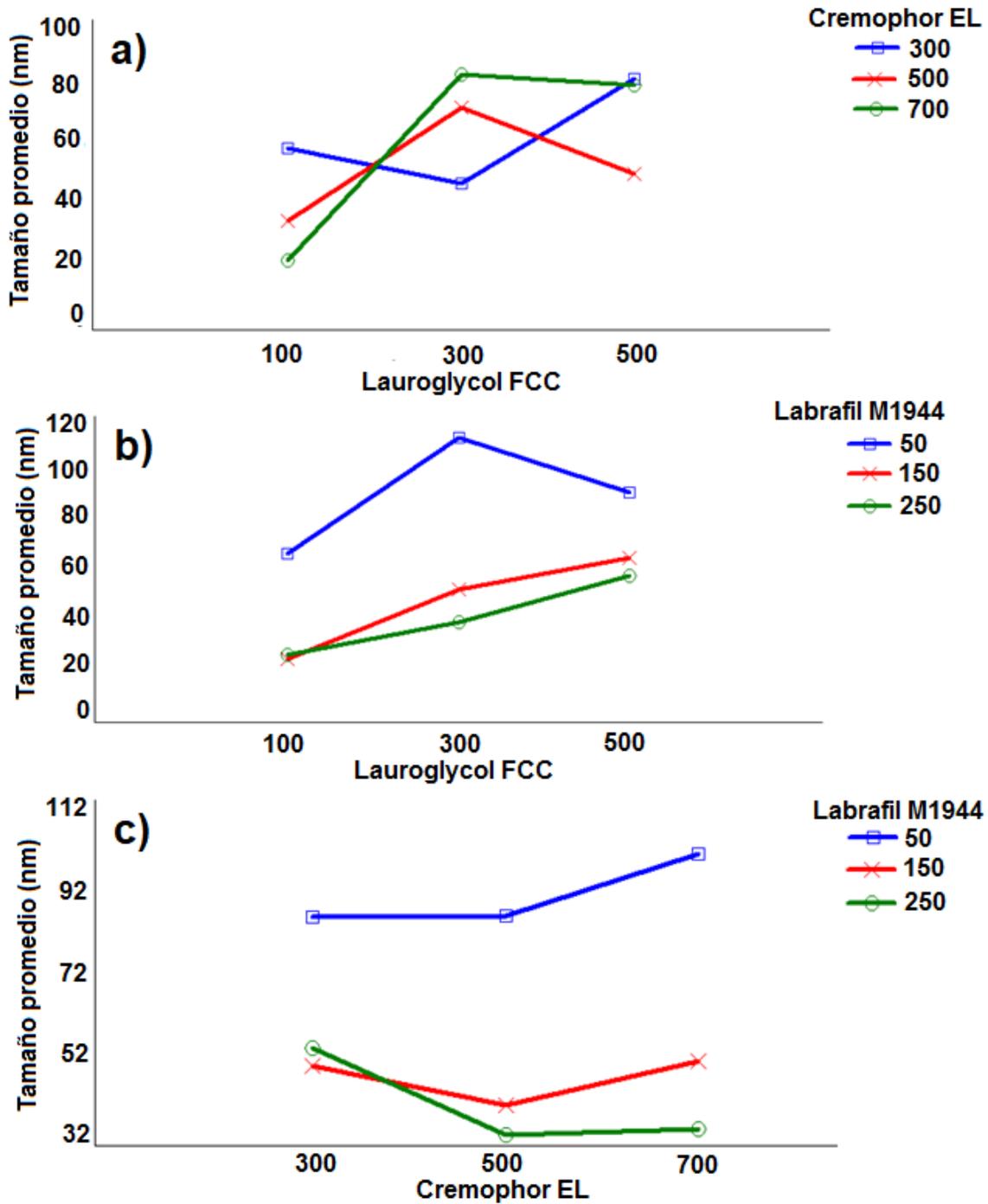


Figura 25. Efecto de la fase oleosa, tensoactivo y co-tensoactivo sobre el tamaño de partícula: (a) Efecto de fase oleosa vs tensoactivo, (b) efecto de fase oleosa vs co-tensoactivo, (c) efecto del tensoactivo vs co-tensoactivo.

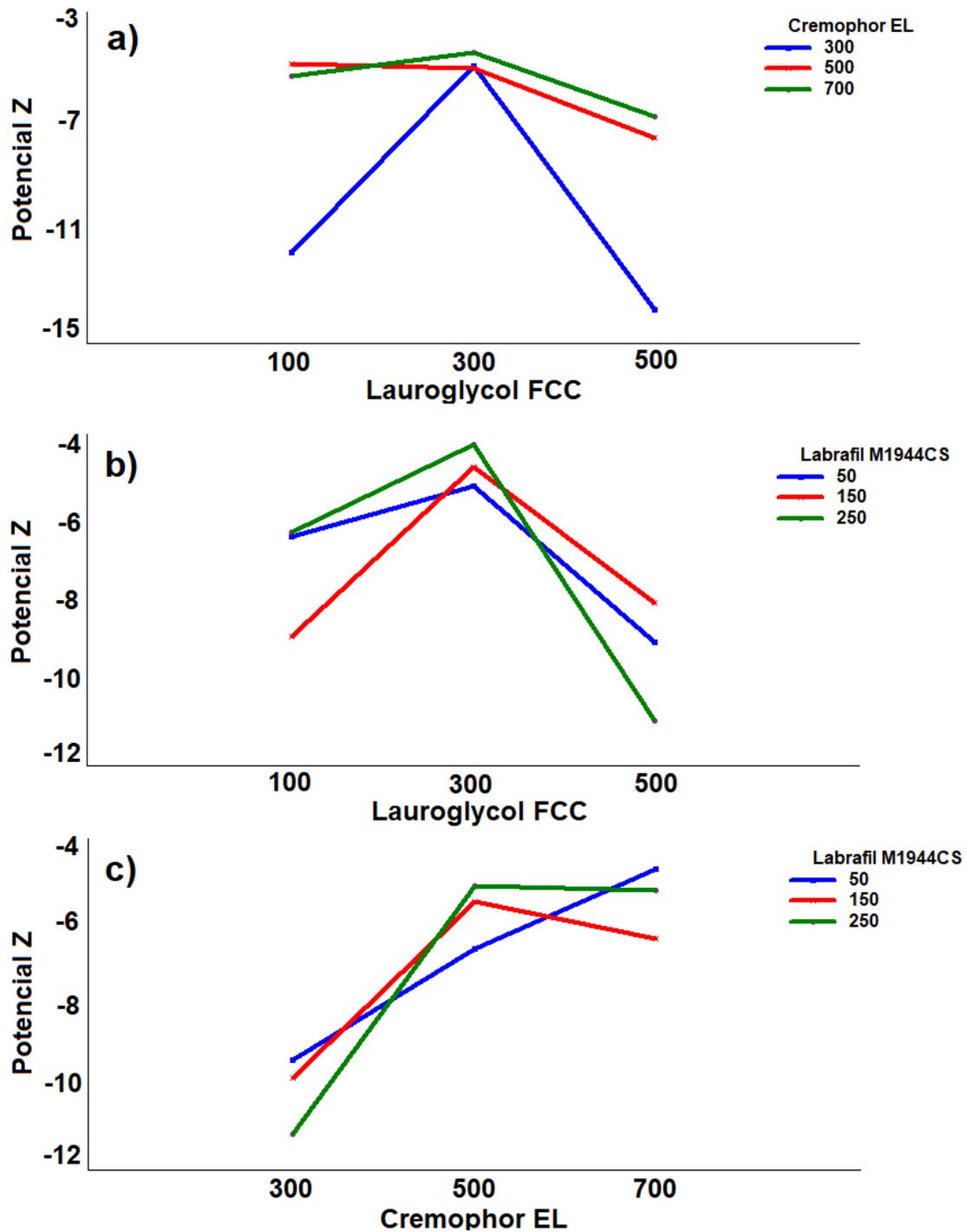


Figura 26. Efecto de la fase oleosa, surfactante y co-surfactante sobre el potencial Z: (a) Efecto de la fase oleosa vs surfactante, (b) efecto de la fase oleosa vs co-surfactante, (c) efecto del surfactante vs co-surfactante

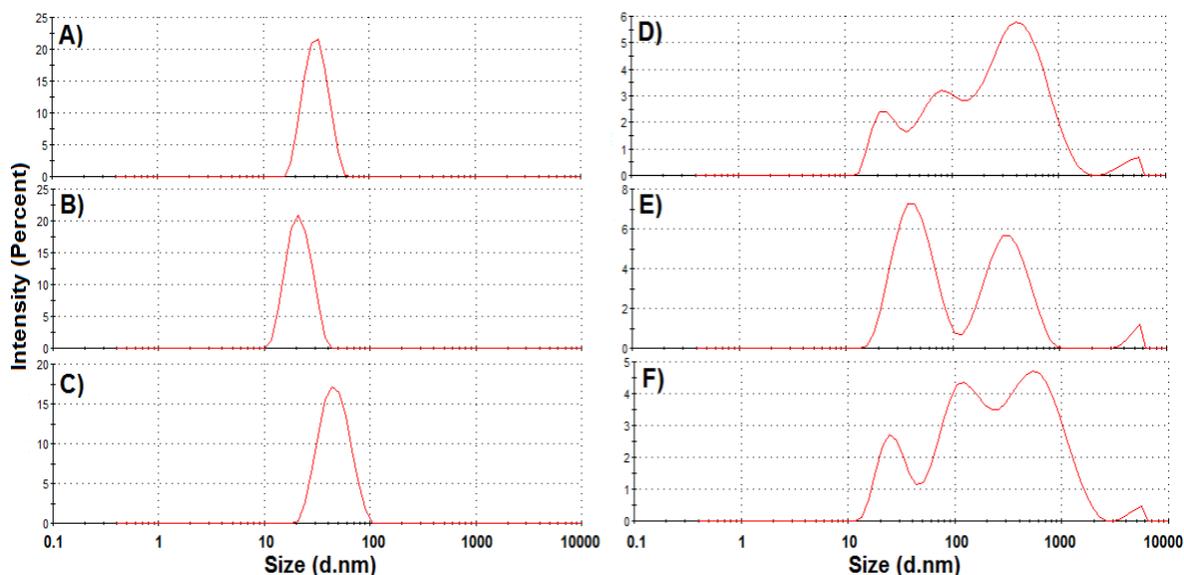


Figura 27. Distribución de tamaños de nanoemulsiones: (A) Tratamiento 3, (B) Tratamiento 9, (C) Tratamiento 12, (D) Tratamiento 25, (E) Tratamiento 22, (F) Tratamiento 13.

6.3 Incorporación del complejo insulina-fosfatidilcolina en los SNEDDS

Se eligieron los sistemas 3, 9 y 12 de la Tabla 8, debido en principio a su diferencia en el porcentaje de fase oleosa (a la cual se incorporó el complejo insulina-fosfatidilcolina), a sus tamaños de partícula 28.23, 21.89 y 48.77 nm, y a sus bajos PDI 0.058, 0.134 y 0.142 respectivamente. Las características de esos sistemas pueden deberse principalmente a la alta concentración que poseen de co-surfactante (Labrafil M1944CS), el cual favorece la formación de sistemas poco polidispersos como lo indica la Figura 24 B) y C), de igual manera el surfactante seleccionado, se caracteriza por poseer un elevado HLB, de aproximadamente 13, lo cual es necesario para la formación de emulsiones O/W (Karamanidou *et al.*, 2015). Para evaluar la influencia de la incorporación del complejo, sobre las características del SNEDDS, se evaluaron 3 distintas concentraciones, correspondientes a 0%, 2.5% y 5% de complejo en la fase oleosa del sistema obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 9. Efectos de la concentración del complejo insulina-PC y PCM sobre el sistema 3

	Complejo PC			Complejo PCM		
	0%	2.5%	5.0%	0%	2.5%	5.0%
Tamaño (nm)	30.36 ^a	29.98 ^a	47.48 ^b	30.3 ^a	29.85 ^a	46.15 ^b
PDI	0.048 ^A	0.054 ^A	0.51 ^B	0.04 ^A	0.05 ^A	0.427 ^B
D90 (nm)	44.5 ^α	43.9 ^α	328.3 ^β	44.4 ^α	43.4 ^α	340 ^β
Distribución	Mono-modal	Mono-modal	Bi-modal	Mono-modal	Mono-modal	Bi-modal

Tabla 10. Efecto de la concentración del complejo insulina-PC y PCM sobre el sistema 9

	Complejo PC			Complejo PCM		
	0%	2.5%	5.0%	0%	2.5%	5.0%
Tamaño (nm)	20.46 ^a	20.56 ^a	25.77 ^b	20.61 ^a	20.73 ^a	22.4 ^b
PDI	0.049 ^A	0.056 ^A	0.344 ^B	0.066 ^A	0.068 ^A	0.238 ^B
D90 (nm)	30.7 ^α	30.5 ^α	493.7 ^β	30.73 ^α	31.2 ^α	259.5 ^β
Distribución	Mono-modal	Mono-modal	Bi-modal	Mono-modal	Mono-modal	Bi-modal

Tabla 11. Efecto de la concentración del complejo insulina-PC y PCM sobre el sistema 12

	Complejo PC			Complejo PCM		
	0%	2.5%	5.0%	0%	2.5%	5.0%
Tamaño (nm)	43.7 ^a	43.54 ^a	65.66 ^b	43.65 ^a	42.61 ^a	46.15 ^b
PDI	0.101 ^A	0.138 ^A	0.524 ^B	0.114 ^A	0.1 ^A	0.427 ^B
D90 (nm)	73.6 ^α	77.6 ^α	513.3 ^β	70.8 ^α	72.4 ^α	500.3 ^β
Distribución	Mono-modal	Mono-modal	Bi-modal	Mono-modal	Mono-modal	Bi-modal

Tanto la Tabla 8, como la 9 y 10 muestran resultados similares. Para los tres sistemas evaluados, al adicionar 2.5% de complejo insulina-PC o insulina-PCM no se produjo un cambio significativo en el tamaño promedio de partícula, y se obtuvo un efecto similar en la respuesta del PDI y las gráficas de distribución. Por el contrario, al adicionar un 5% del complejo a todos los sistemas se produjo un aumento significativo en el tamaño promedio de la nanoemulsión, como en el PDI, D90 y en las distribuciones, pasando de sistemas monomodales a bimodales. En

estudios realizados por Li *et al.* (2014) determinaron que la solubilidad de la PC en la fase oleosa de sistemas SNEDDS es de aproximadamente 5% p/p, lo que puede explicar por qué a esa concentración ocurrieron fenómenos de inestabilidad. Los mismos autores observaron la formación de estructuras vesiculares al incorporar el complejo en los sistemas SNEDDS de entre 100 y 1000 nm, tamaños que coinciden con el D90 de aquellos sistemas que les fueron incorporados un 5% de complejos. Este fenómeno se aprecia más claramente en las Figuras 28, 29 y 30.

Figura 28. Distribución de tamaños de partícula de las distintas concentraciones de complejo en el sistema 3: complejo con PC a) y complejo con PCM b)

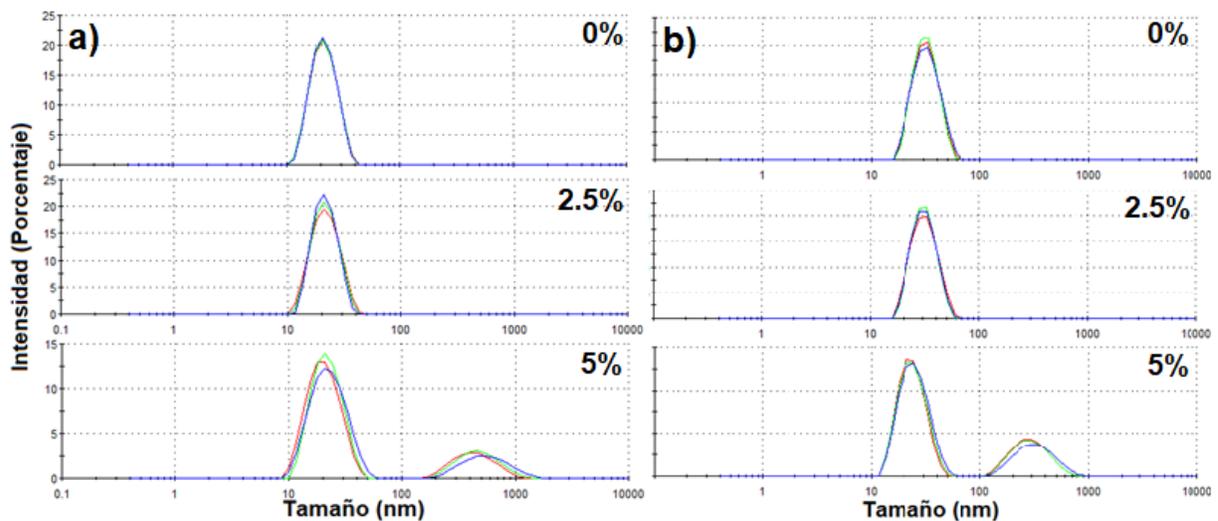


Figura 29. Distribución de tamaños de partícula de las distintas concentraciones de complejo en el sistema 9: complejo con PC a) y complejo con PCM b)

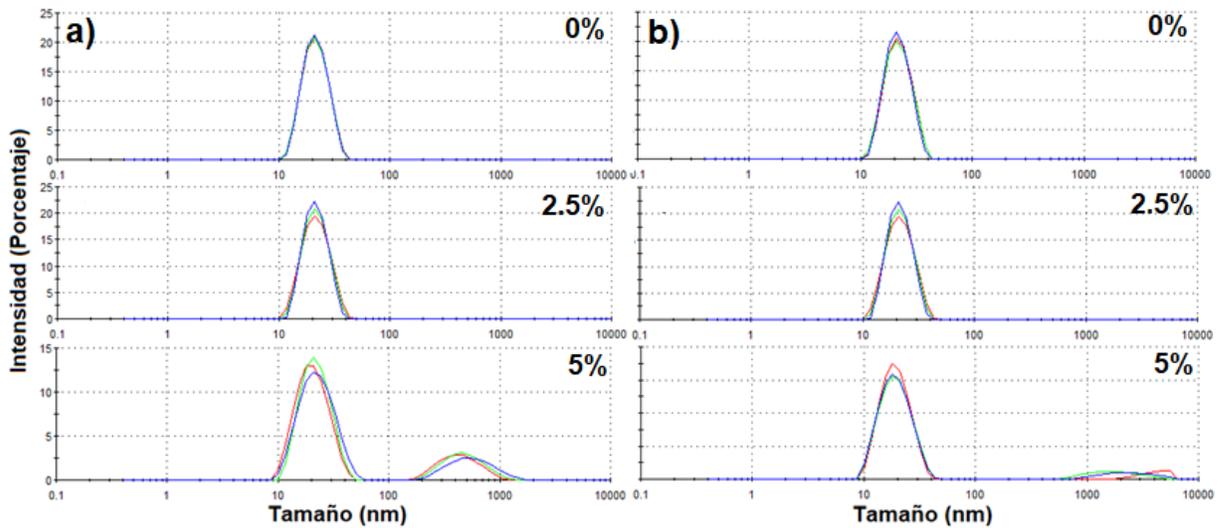
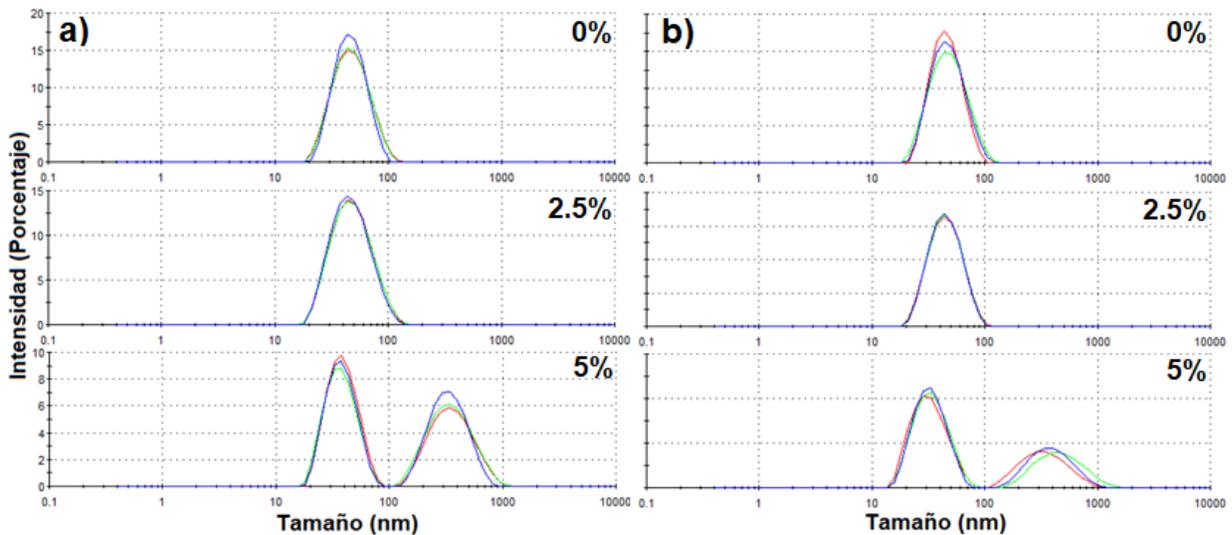


Figura 30. Distribución de tamaños de partícula de las distintas concentraciones de complejo en el sistema 12: complejo con PC a) y complejo con PCM b)



En otro estudio realizado por Karamanidou *et al.* (2015) lograron la incorporación de hasta un 1.13% en peso de un complejo de insulina-fosfatidilglicerol a un SNEDDS sin cambios aparentes en el tamaño de partícula,

logrando alcanzar tamaños promedio de glóbulos de entre 29.8 y 44.2 nm, tamaños que coinciden con los obtenidos en el presente trabajo.

6.3.1 Porcentaje de encapsulación de insulina

La determinación se realizó acorde a lo descrito en la sección 5.6. Los SNEDDS evaluados correspondieron a los sistemas 3, 9 y 12 de la Tabla 5 con un 2.5% de complejo insulina-PC e insulina-PCM. Los porcentajes de encapsulación fluctuaron entre un 67.7% para el sistema 3 con complejo insulina-PCM a un 50.8% en el sistema 12 con complejo insulina-PC como puede apreciarse en la Figura 31. Cabe resaltar que los SNEDDS mencionados fueron los únicos que mostraron diferencias estadísticamente significativas, ya que en todos los demás SNEDDS no se observó una diferencia con respecto a estos ($p < 0.05$). Por lo tanto, el SNEDDS que mayor incorporación alcanzó fue el sistema 3. Esto puede ser atribuido a que fue el sistema con mayor porcentaje de co-surfactante (Labrafil M1944CS), el cual posee un HLB de 4, por lo que la cola hidrófoba pudo interactuar de mejor manera con las colas igualmente hidrófobas de la PC (Yoo, 2006).

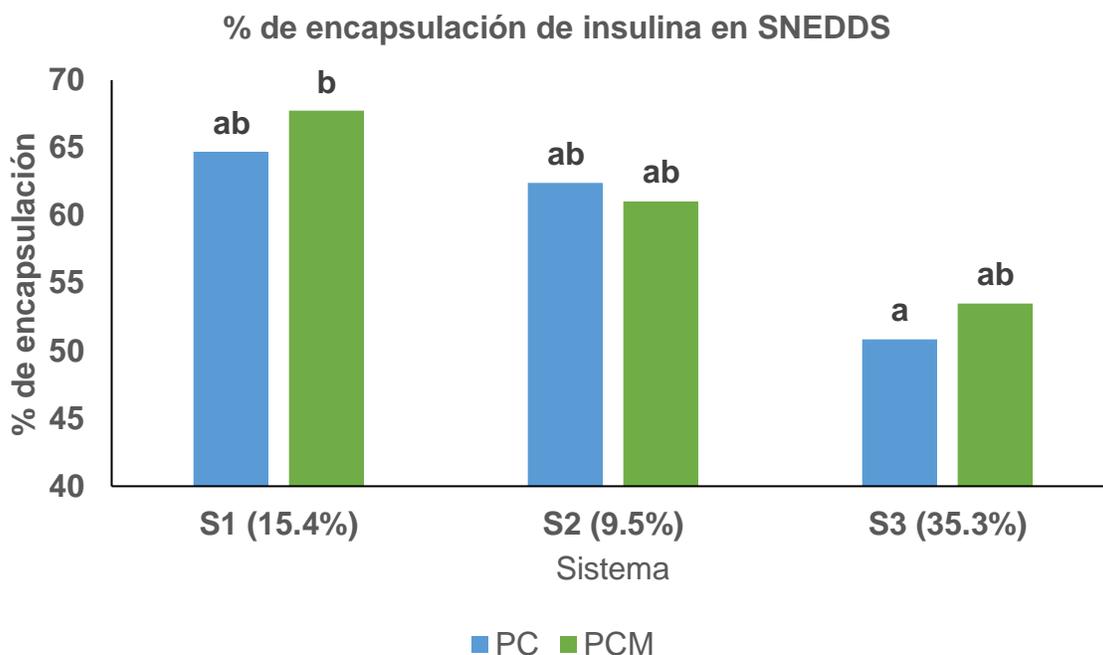


Figura 31. Porcentajes de encapsulación de insulina logrados en los T3, T9 y T9 con complejos de PC y PCM

Tabla 12. Resultados obtenidos para la encapsulación de insulina en nanosistemas en otros trabajos publicados

Nanosistema	Composición	Tamaño de glóbulo	PDI	% de encapsulación	Referencia
SNEDDS	Lauroglycol, Cremophor EL, Labrafil M1944CS	29.8±2.3 nm	---	70.89±2	Karamanidou <i>et al.</i> , 2015
SNEDDS	Miglyol 812N, Capmul MCM, Cremophor RH40	34.7 nm	0.18	71.5	Li <i>et al.</i> , 2014
SNEDDS	Miglyol 812N, Tween 80, Cremophor RHA40, Capmul MCM	35-50 nm	0.08-0.13	40-78	Li <i>et al.</i> , 2016
SNEDDS	Miglyol 840, Cremophor EL, Glicerol, DMSO	80-160 nm	<0.5	80.3	Sakloetsakun <i>et al.</i> , 2013
Micropartículas poliméricas	Quitosano	1.2-4.7 µm	---	58.8	Wong <i>et al.</i> , 2018
Nanopartículas	Quitosano y alginato de sodio	551.7 nm	---	52.5	Prusty y Sahu, 2013
Emulsión doble	AOT, aceite de soja, quitosano, goma xantana	324.4-345 nm	0.006-0.02	65.6-77.5	Mutaliyeva <i>et al.</i> , 2017
Liposomas	PC, colesterol, esteramida	125.6-148 nm	0.22-0.27	29.8-36.1	He <i>et al.</i> , 2017

Otros trabajos han logrado de igual forma encapsular insulina dentro de SNEDDS, ejemplos de ellos son los presentados en la Tabla 12, en donde se puede apreciar que los porcentajes de incorporación de insulina en sistemas nanoestructurados son comparables con los obtenidos en el presente trabajo, confirmando así, que el complejo de insulina con fosfolípidos fue capaz solubilizar la insulina dentro de la fase oleosa del SNEDDS.

6.4 Bioaccesibilidad en un sistema de digestión *in vitro*

Los tratamientos 3, 9 y 12 de la Tabla 5 cargados del complejo insulina-PC e insulina-PCM que anteriormente se utilizaron para evaluar el porcentaje de encapsulación fueron sometidos a condiciones de sistema *in vitro*. El tratamiento 3 mantuvo un tamaño de partícula inicial promedio de 30 nm, mientras que el 9 y 12 se mantuvieron en 22.5 y 43.6 nm, respectivamente.

Al ser sometidas a las condiciones *in vitro* de la etapa de la boca se observó un ligero aumento en el tamaño promedio de las partículas y de igual forma se tornaron más polidispersas. Los resultados observados fueron similares para los 6 distintos sistemas y se aprecia de mejor manera en las Figura 31, 32 y 33. Se observó la aparición de partículas de hasta un par de micrómetros. Estos pueden ser atribuidos a la interacción de los glóbulos de la emulsión con las moléculas de mucina, la cual es una glicoproteína que ya ha sido reportada como promotora de agregados en emulsiones (Vingerhoeds *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2017). La presencia de sales también puede llegar a afectar en la floculación de las emulsiones en la boca, pero no en igual medida que con las interacciones de la mucina (Jain y Anal, 2018). Estos fenómenos citados pueden explicar la aparición de partículas de mayor tamaño en la fase de simulación *in vitro* en la etapa de la boca.

Una vez terminada la fase simulada de la boca se prosiguió con la fase del estómago en donde se pretendió evaluar los efectos del cambio abrupto del pH y la presencia de enzimas digestivas como la pepsina, así como a la fuerza iónica proporcionada por las sales inorgánicas presentes (Yang y McClements, 2013). Se

observó que las condiciones del estómago simulado no influyeron en el cambio de tamaño de partícula, ya que los sistemas mantuvieron el tamaño de partícula proveniente de la boca (Figura 32 y 34), a excepción del sistema 9, en donde sí ocurrió un cambio significativo en el tamaño de las partículas (Figura 33), fenómeno que puede ser atribuido aún a la presencia de restos de mucina parcialmente hidrolizada por las enzimas proteolíticas presentes en el estómago, ya que se ha observado que en algunos casos, esta proteína puede continuar influyendo hasta las condiciones del estómago (Jain y Anal, 2018), sin embargo, a pesar de que en los sistemas 3 y 12 no se presentaron cambios significativos respecto a la fase de la boca, en los tres sistemas, se continuaba observando la presencia de partículas de hasta un par de micrómetros a los cuales como se mencionó anteriormente se le puede seguir atribuyendo a las floculaciones producidas por la mucina.

En cuanto a la fase del intestino delgado, como lo muestra las Figuras 31, 32 y 33 algunos tratamientos no tuvieron un aumento estadísticamente significativo en el tamaño de partícula con respecto a la fase de estomacal e inclusive disminuyeron en algunos casos, pero si fue la fase (intestino delgado) en donde mayor índice de polidispersidad tuvieron las emulsiones de todos los tratamientos evaluados (Tabla 13, 14 y 15), ya que se observaron distintas partículas de entre 200 y 5000 nm. Esto puede deberse a que los jugos intestinales simulados contenían sales biliares capaces de interactuar con las emulsiones y formar agregados o micelas mixtas (McClements, 2013). Por otro lado, la tendencia de mantener los tamaños promedio de partícula en la fase intestinal de los SNEDDS fue algo que no se esperaba, ya que en diversos estudios de emulsiones *in vitro* se ha visto un notable aumento en el tamaño promedio de partícula (Loyo, 2017; Salvia-trujillo *et al.*, 2013; Yang y McClements, 2013), sin embargo, se ha demostrado que en ciertos sistemas auto-nanoemulsificables los tensoactivos no iónicos presentan muy pobre actividad ante las lipasas pancreáticas debido a su naturaleza sintética y no iónica, pudiendo inhibir inclusive la digestión de estos sistemas a muy bajas concentraciones (Fernandez *et al.*, 2008; Christiansen *et al.*, 2010), como es el caso del Cremophor EL y el Labrafil M1944CS, por lo que este tipo de sistemas se ve muy poco afectado por estas enzimas. Este fenómeno puede explicar por qué no se observaron cambios

significativos en los tamaños de las gotas de las SNEDDS en la fase intestinal del sistema *in vitro* simulado.

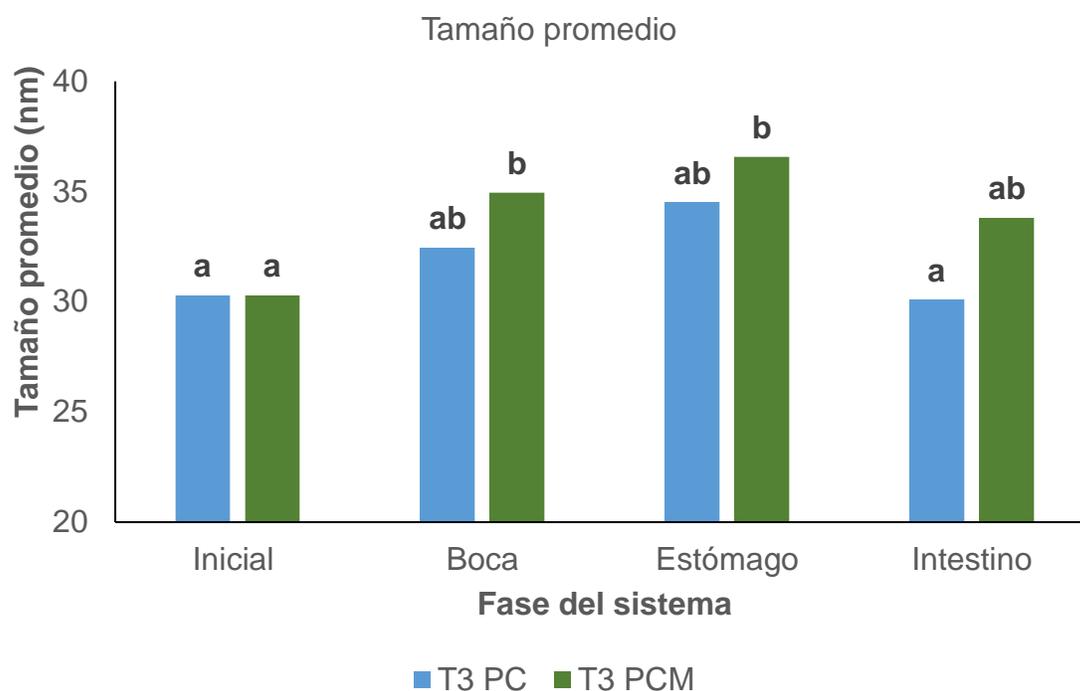


Figura 32. Influencia de las etapas del sistema *in vitro* sobre el tamaño promedio de partícula del SNEDDS del T3.

Tabla 13. Influencia de las etapas del sistema *in vitro* sobre el PDI del SNEDDS del T3

PDI	Inicial	Boca	Estómago	Intestino
T3 PC	0.92 ^a	0.17 ^{abc}	0.22 ^{abc}	0.31 ^c
T3 PCM	0.11 ^{ab}	0.28 ^{bc}	0.29 ^c	0.30 ^c

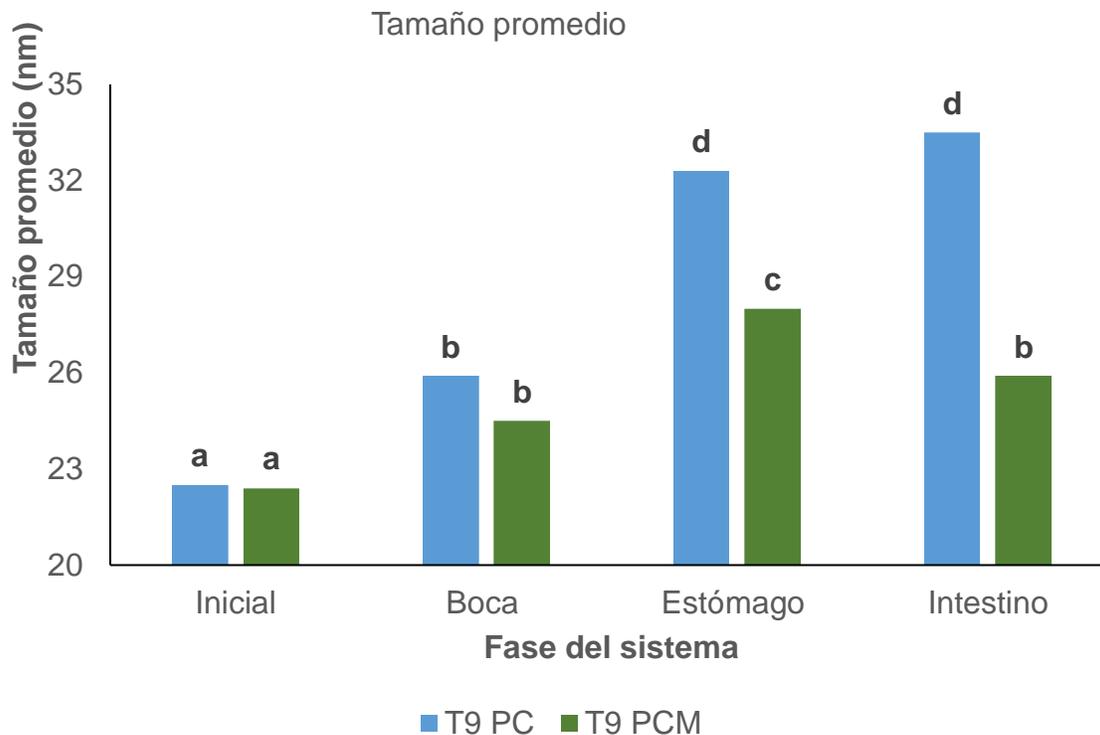


Figura 33. Influencia de las etapas del sistema *in vitro* sobre el tamaño promedio de partícula del SNEDDS del T9.

Tabla 14. Influencia de las etapas del sistema *in vitro* sobre el PDI del SNEDDS del T9

PDI	Inicio	Boca	Estómago	Intestino
T9 PC	0.057 ^a	0.36 ^c	0.51 ^e	0.42 ^d
T9 PCM	0.052 ^a	0.28 ^b	0.38 ^{cd}	0.43 ^d

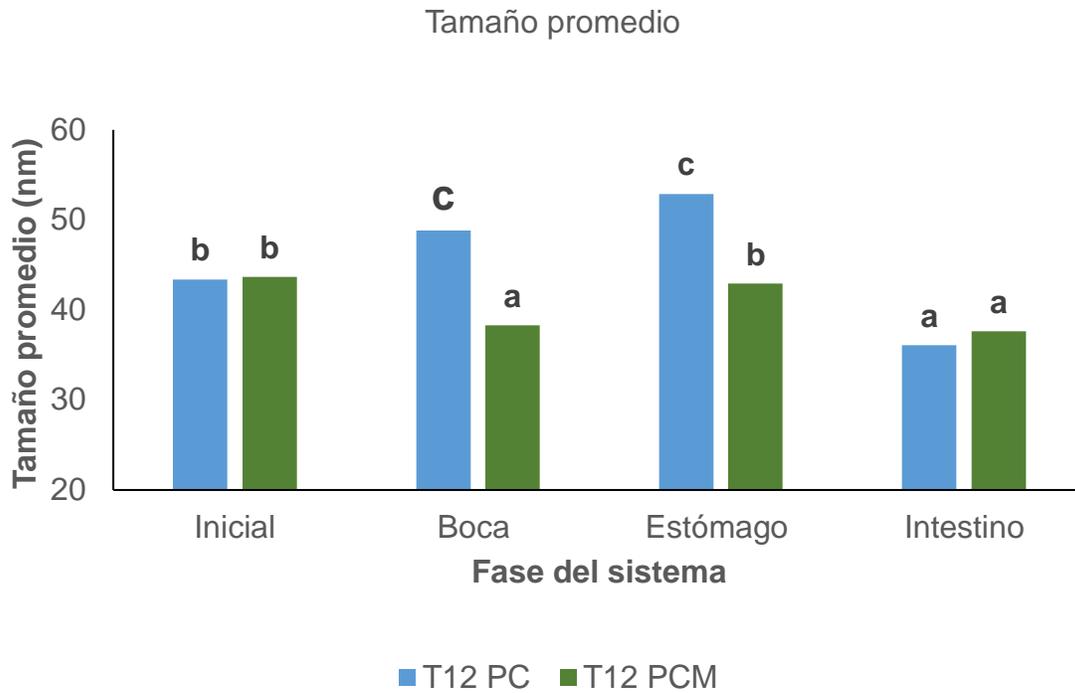


Figura 34. Influencia de las etapas del sistema in vitro sobre el tamaño promedio de partícula del SNEDDS del T12

Tabla 15. Influencia de las etapas del sistema in vitro sobre el PDI del SNEDDS del T12

PDI	Inicio	Boca	Estómago	Intestino
T12 PC	0.11 ^a	0.31 ^d	0.31 ^d	0.31 ^d
T12 PCM	0.094 ^a	0.18 ^b	0.25 ^c	0.35 ^d

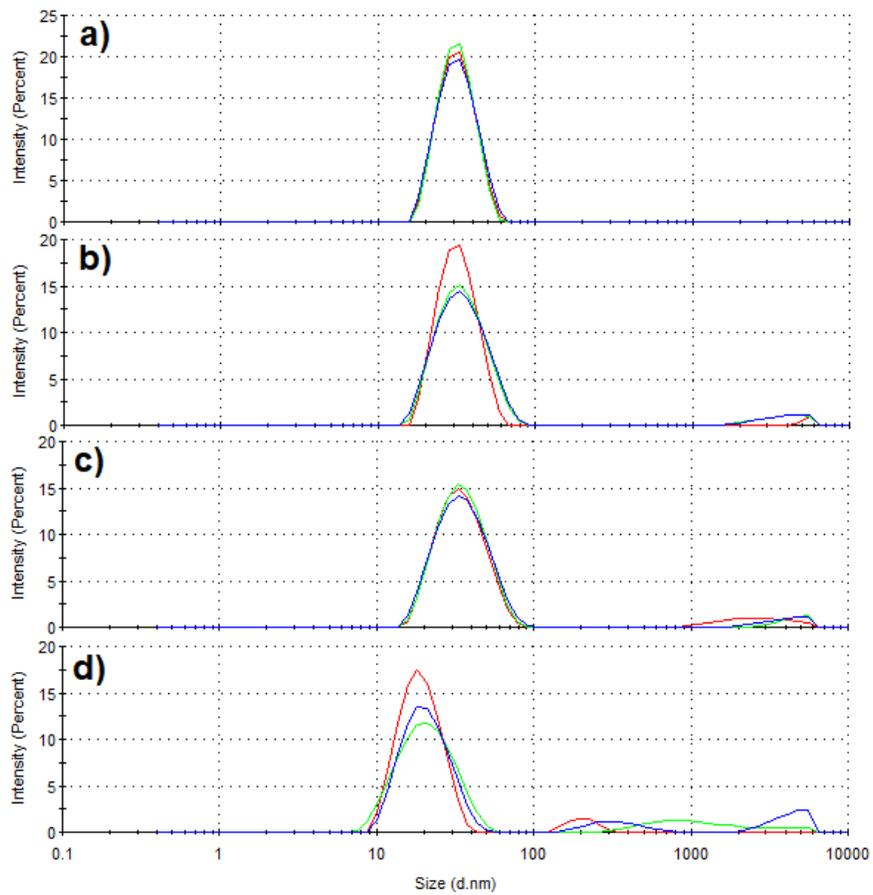


Figura 35. Distribución de tamaños de partícula del sistema 3 al ser sometido a las condiciones in vitro: (a) SNEDDS inicial, (b) fase de boca, (c) fase de estómago, (d) fase de intestino

6.4.1 Porcentaje de bioaccesibilidad en sistema *in vitro*

La bioaccesibilidad de la insulina de los sistemas se evaluó mediante pruebas ELISA al finalizar las 4 h de transcurso del sistema *in vitro*, es decir al concluir la fase las condiciones del intestino delgado establecidas en el punto 5.8. Al tomar muestras de 1mL de los tres sistemas, se observó la formación de dos fases, un sedimento blanco correspondiente a los restos de sales biliares y enzimas, y un sobrenadante traslucido correspondiente a la fase micelar; esta última fue la que se utilizó para la evaluación de bioaccesibilidad en pruebas ELISA. Una vez obtenidos los resultados se encontró la mayor bioaccesibilidad en el sistema 3 con complejo de PC-Insulina con 35.7%; por su parte, los sistemas 9 y 12 con complejo de PC-Insulina resultaron con una bioaccesibilidad del 21.8% y 20.8%, respectivamente, siendo los únicos estadísticamente significativos con respecto al sistema 1 con complejo de PC. Por su parte los SNEDDS cargados con complejo insulina-PCM no presentaron diferencia significativa entre sí, lo que puede significar que la composición del fosfolípido no influye en las propiedades de encapsulación de la hormona. Lo anterior puede apreciarse de mejor manera en la Figura 36.

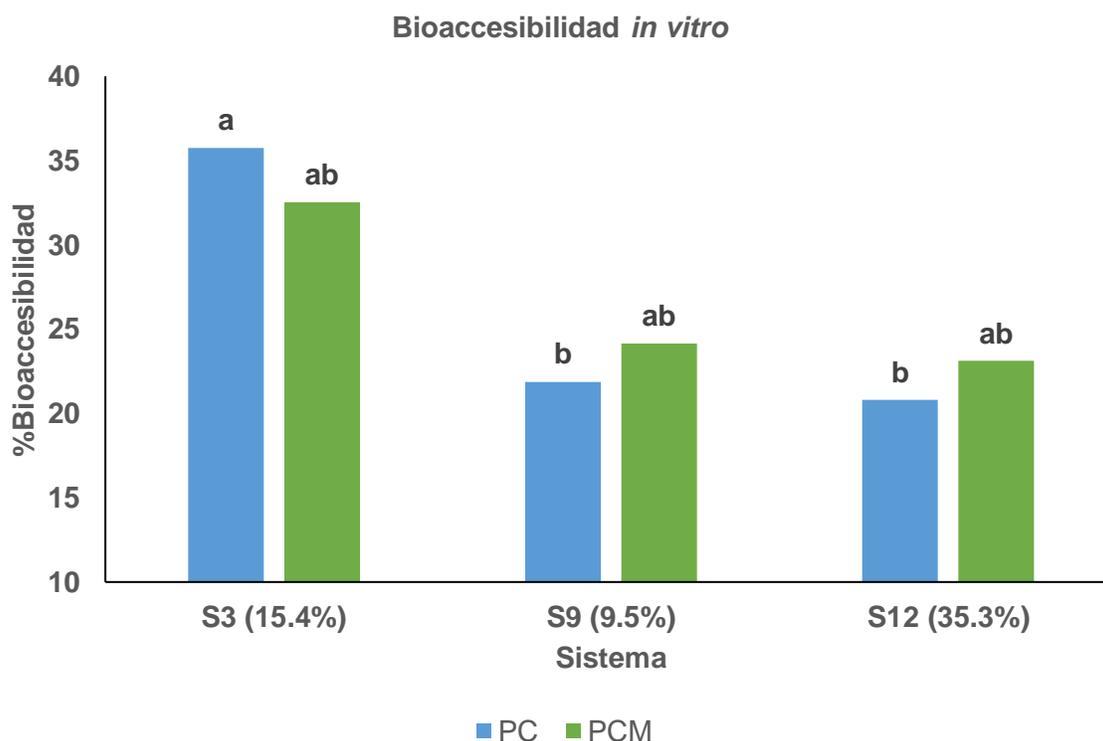


Figura 36. Bioaccesibilidad *in vitro* final de los diferentes tratamientos

En otros trabajos realizados anteriormente por Erel *et al.* (2016) lograron una liberación en condiciones *in vitro* de hasta 48.1% de insulina a partir de una microemulsión estabilizada con lecitina y tween 80 como surfactantes y etanol como co-surfactante. De igual forma, Sakloetsakun *et al.* (2013) reportaron una liberación de insulina en un sistema basado en SNEDDS y quitosano del 77% a las 4 h, es decir que el 23% de la insulina restante continuaba encapsulada e intacta dentro del sistema. En contraparte, observaron una bioaccesibilidad de una solución de insulina libre, del 6% comprobando la eficiencia de protección de la hormona por parte del SNEDDS. García *et al.* (2003) observaron que, al encapsular insulina en un sistema de doble emulsión W/O/W estabilizada con lecitina, ocurría una liberación repentina del 45% de la insulina en la primera hora y posteriormente se reducía esta liberación y se estabilizaba en un 50%. Este fenómeno fue atribuido a una posible reabsorción de la insulina dentro del sistema. En el presente trabajo se demostró que hasta un 35.7% de la insulina se mantenía dentro del SNEDDS después de 4 h en condiciones *in vitro*, demostrando así, que el sistema es capaz de proteger a la hormona dimérica de las condiciones gastrointestinales simuladas.

6.5 Evaluación de la biodisponibilidad y bioactividad en un modelo murino

Para la determinación de la biodisponibilidad y bioactividad de la insulina encapsulada en los SNEDDS en el modelo murino de ratas Wistar, se optó por la destrucción de las células β del páncreas de los animales para evitar la producción de insulina, y de esta manera impedir que interfiriera en los resultados obtenidos. Para llevarlo a cabo se emplearon dosis de $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ acorde a la metodología descrita en el Punto 5.8.1.

6.5.1 Inducción de diabetes experimental

Una vez implementadas las dosis, se tomaron muestras sanguíneas de los animales cada 3 días y fueron evaluados los niveles de glucosa como se menciona

en el punto 5.8.2. Al cabo de 6 días después de la dosis de estreptozotocina se observó que todos los animales desarrollaron hiperglucemia y una ligera disminución en su peso corporal en comparación con los animales testigo. Los valores de glucosa postprandial en sangre de los animales diabéticos resultaron en aproximadamente $416 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ a los 6 días de la inyección, confirmando la inducción de diabetes, la cual se considera cuando los niveles de glucosa son superiores a los $200 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ (Mora *et al.*, 2009), mientras que en los testigos sanos se mantuvo en aproximadamente $131 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$. Los resultados pueden apreciarse de mejor manera en la Figura 37.

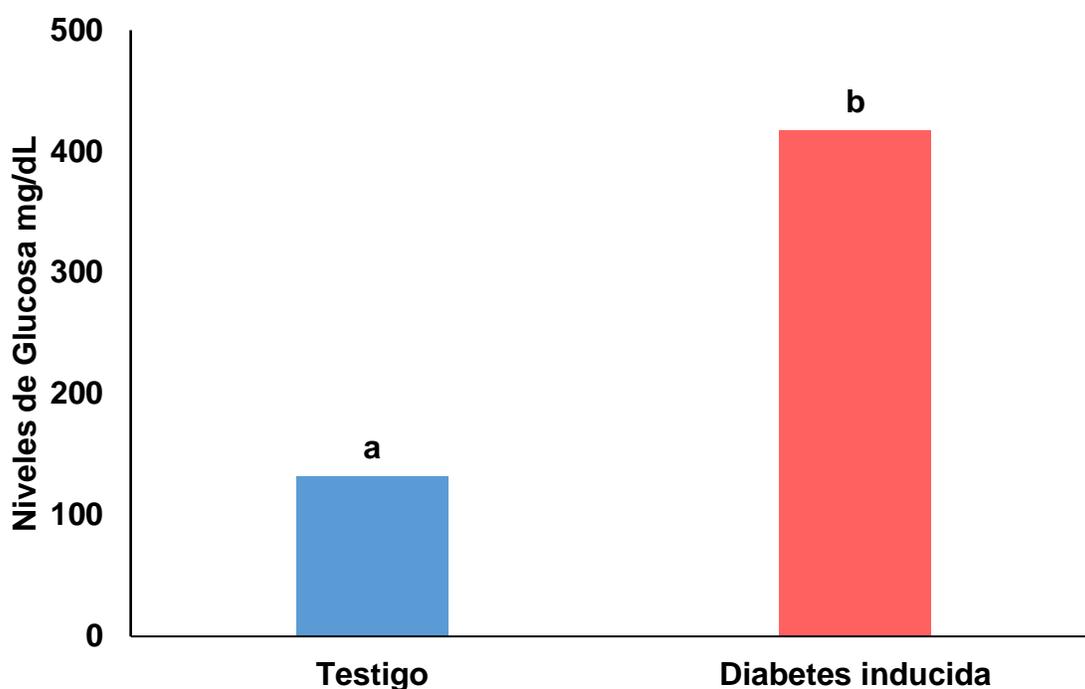


Figura 37. Niveles de glucosa postprandial de ratas Wistar 6 días posteriores a la dosificación de estreptozotocina.

6.5.2 Evaluación de la bioactividad en un modelo murino

Los efectos sobre la bioactividad de las dosificaciones orales de los complejos insulina-PC incorporados en los SNEDDS se evaluaron en base al efecto de la reducción de los niveles de glucosa en sangre. Para ello se eligió el T3, puesto

que fue el que mayor porcentaje de encapsulación de insulina presentó, así como una mayor bioaccesibilidad que los tratamientos 9 y 12. Una vez seleccionado el tratamiento a evaluar en el modelo *in vivo*, se administró una dosis única de SNEDDS cargados de complejo insulina-PC de 50 UI/kg de la hormona a ratas Wistar macho de 8 semanas de edad con diabetes inducida por estreptozotocina. Los animales se dividieron en 5 grupos correspondientes a: grupo 1) testigos, grupo 2) administración de 2 UI/kg de insulina por método subcutáneo, grupo 3) 50 UI/kg de insulina oral en solución acuosa, grupo 4) 50 UI/kg de insulina oral encapsulada en SNEDDS cargado de complejo con fosfolípidos modificados y grupo 5) 50 UI/kg de insulina oral encapsulada en SNEDDS cargado de complejo con fosfolípidos. Los niveles de glucosa se evaluaron al tiempo 0 y posteriormente a la 1, 2, 4, 6 y 8 horas después de la administración. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 37, donde puede observarse que el tratamiento con insulina subcutánea fue el que presentó mayor disminución sobre el porcentaje de niveles de glucosa en sangre presentó, con 77.1% de reducción a la hora posterior de la inyección, mientras que los tratamientos con complejos insulínicos con fosfolípidos y fosfolípidos modificados con SNEDDS presentaron descensos en los niveles de glucosa de aproximadamente 35.6% y 36.1% respectivamente a las 4 horas de administración de los tratamientos. Por otro lado, las ratas a las que se les administró una solución acuosa de insulina de forma oral, los niveles de glucosa solo disminuyeron un 14.1%, aunque este porcentaje de reducción no presentó diferencia significativa con el grupo testigo enfermo ($p < 0.05$). Como lo muestra la Figura 38, a la hora de administrar insulina de forma subcutánea hay un decremento rápido y repentino en los niveles de glucosa, lo que puede llevar a episodios de hipoglicemia (valores de glucosa en sangre inferiores a 70 mg/dL) en los pacientes que se les administra insulina por este método; estudios reportados por Mezquita *et al.* (2013), estiman que en el 10% de las ocasiones, los pacientes con DM1 pueden llegar a presentar glucemia con niveles de glucosa menores a 50 mg/dl, lo que equivale a que en promedio estos pacientes sufren 2 episodios de hipoglucemia sintomática por semana y uno de hipoglucemia grave por año. Además, calcularon que uno de cada 25 pacientes con DM1 morirá por una hipoglucemia iatrogénica. En cuanto a los

tratamientos con SNEDDS (con complejo insulina-PC y PCm) mostrados en la Figura 38 produjeron un decremento en los niveles de glucosa menos repentinos, más controlados y por mayor tiempo en comparación con el método subcutáneo, lo que podría ayudar a reducir los casos de pacientes con hipoglucemia debido a la administración exógena de insulina.

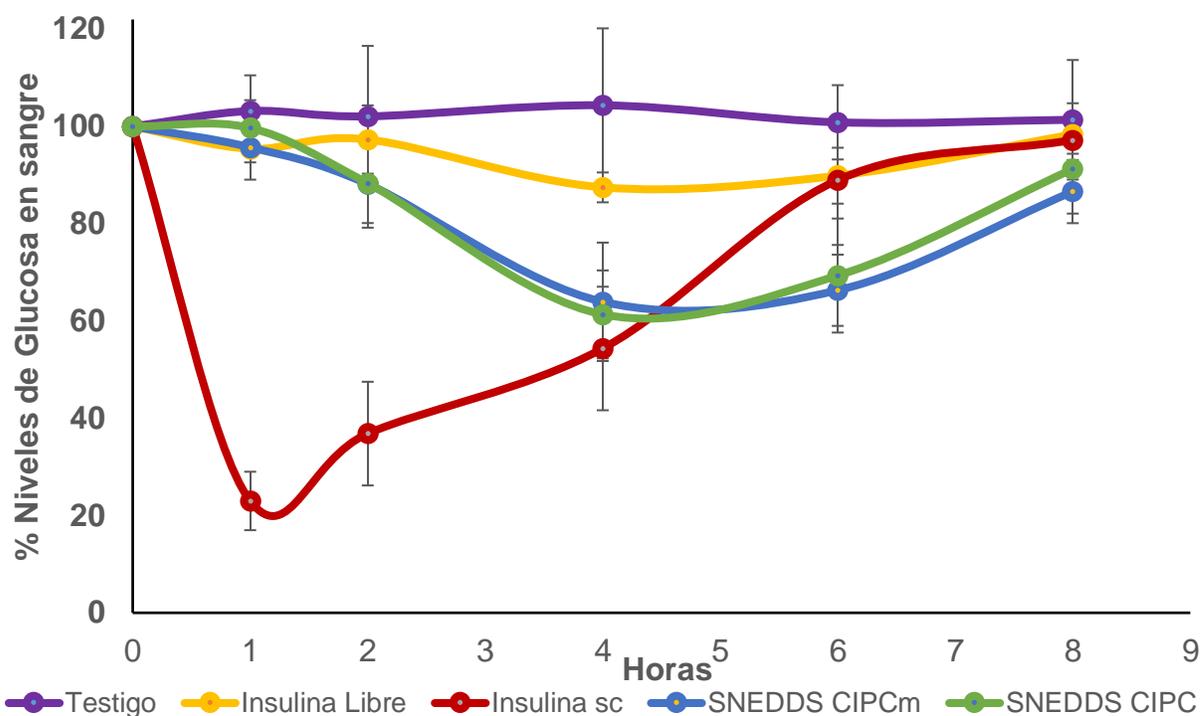


Figura 38. Efecto hipoglucémico de la administración subcutánea de insulina (sc), insulina oral en solución acuosa (Libre), insulina oral en complejo con PC modificada y SNEDDS (SNEDDS CIPCm) e insulina oral en complejo con PC y SNEDDS (SNEDDS CIPC). Los resultados se expresan como promedio \pm DS, n=5

Tabla 16. Efecto hipoglucémico de la administración oral de los distintos tratamientos

Tratamiento	Dosis	%Reducción NGS	T(h)
Testigo	$0 \text{ UI} \cdot \text{kg}^{-1}$	-	-
Insulina en solución	$50 \text{ UI} \cdot \text{kg}^{-1}$	14.1 ± 3.5^c	4
Insulina s.c.	$2 \text{ UI} \cdot \text{kg}^{-1}$	77.1 ± 6^a	1
CIPM SNEDDS	$50 \text{ UI} \cdot \text{kg}^{-1}$	36.1 ± 12.2^b	4
CIP SNEDDS	$50 \text{ UI} \cdot \text{kg}^{-1}$	35.6 ± 13.1^b	4

Los resultados se expresan como promedio \pm DS (n=5). Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa ($p < 0.05$).

En otros estudios realizados por Li *et al.* (2014) obtuvieron una reducción en los niveles de glucosa de hasta un 38% a las 3h de administrar una dosis de 50 UI/kg de capsulas con recubrimientos entéricos rellenas de un SNEDDS (compuesto de Capmul® como fase oleosa, y Cremophor® RH40 y etanol como tensoactivo y co-tensoactivo respectivamente) cargado con 10% de complejo insulina-fosfatidilcolina. En otro trabajo Zhang *et al.* (2012) lograron una disminución de un 70.8% en los niveles de glucosa a las 2 h de administrar una dosis de 300 UI/kg de insulina en un complejo con fosfolípidos e incorporado en un SNEDDS compuesto de oleato de etilo como fase oleosa y Cremophor EL y alcohol como tensoactivo y co-tensoactivo respectivamente. Por su parte Cui *et al.* (2006) realizaron un estudio en donde se administraron 20 UI/kg de complejo insulina-PC encapsulado en nanopartículas compuestas de cloruro de metileno y alcohol polivinílico. Estos autores encontraron una reducción en los niveles de glucosa de 57.4% a las 8 h de iniciado el tratamiento. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la administración de insulina en complejo con fosfolípidos e incorporada en SNEDDS por vía oral, tiene un mayor efecto en la bioactividad de la hormona con respecto a la insulina libre suministrada por vía oral, lo que concuerda con los reportes previamente publicados. En lo que concierne a la formación de complejos de insulina con fosfolípidos modificados con AGCM e incorporados en SNEDDS, en promedio se observó un ligero aumento en la máxima reducción de los niveles de glucosa; sin embargo, dicha disminución no fue suficiente para representar una diferencia estadísticamente significativa con respecto al complejo elaborado con fosfolípidos sin modificar. Esto puede deberse a que el principal factor para la absorción de los sistemas nanoestructurados es la superficie de la SNEDDS y no el complejo en sí, el cual esta embebido dentro del sistema auto-nanoemulsificable.

6.5.3 Evaluación de la biodisponibilidad en un modelo murino

Para la evaluación de la biodisponibilidad, muestras de suero sanguíneo fueron recolectadas en los tiempos 0, 1, 2, 4, 6 y 8 horas posteriores a la

administración de los tratamientos, las cuales se sometieron a pruebas ELISA para la cuantificación de niveles de insulina en sangre. De acuerdo a los estudios de bioactividad de los tratamientos presentados en la Figura 39, se obtuvo que el método subcutáneo fue el que mayor reducción en los niveles de glucosa presentaba a la hora de administrada la dosis, lo cual concuerda con lo detectado en la concentración de insulina en sangre, donde se alcanzaron niveles de hasta $161.5 \mu\text{UI}/\text{mL}$ de la hormona. De manera similar, el grupo tratado con SNEDDS (más complejo de insulina-PC) alcanzó el mayor efecto hipoglucemiante a las 4 h y la mayor concentración de la hormona ($27.7 \mu\text{UI}/\text{kg}$) en el mismo tiempo después de la dosificación, mientras que el grupo tratado con SNEDDS (más complejo de insulina-PCm) logró las mayores concentraciones ($24.5 \mu\text{UI}/\text{kg}$) a las 6 h de administradas las dosis. Por su parte, la insulina administrada en una solución acuosa de forma oral solamente obtuvo una máxima concentración a las 2 h de $5.52 \mu\text{UI}/\text{mL}$.

En cuanto a porcentajes de bioaccesibilidad de los tratamientos, los SNEDDS con complejos tanto de PC como de PCm mostraron una diferencia significativa respecto al grupo testigo y al grupo con insulina oral en solución acuosa, mostrando los primeros mencionados una %BA del 1.81% y 1.77% respectivamente. Sin embargo, entre ambos grupos no se encontró una diferencia estadística significativa. De esta forma, se pudo comprobar que los SNEDDS en combinación con complejos de insulina-PC y PCm tienen un marcado efecto en comparación con la insulina administrada oralmente en solución acuosa.

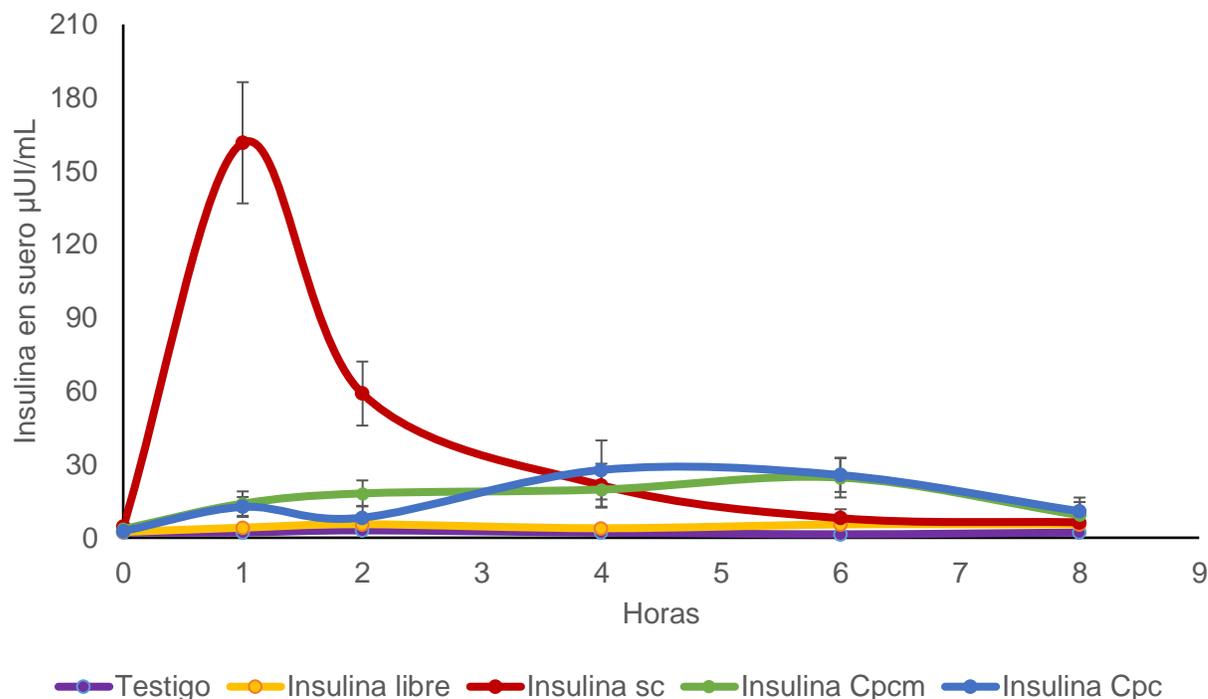


Figura 39. Niveles de insulina en sangre posteriores a la aplicación de insulina sc (1.5UI/kg), administración oral de solución de insulina (50 UI/kg), SNEDDS con complejo PC (50 UI/kg) y SNEDDS con complejo PCM(50 UI/kg). Los puntos representan el promedio \pm DS (n=5).

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos después de las dosis de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Dosis ($UI \cdot kg^{-1}$)	$C_{max}(\mu UI \cdot mL^{-1})$	T(h)	%BD
Testigo	0	-	-	-
Insulina libre	50	5.52 ± 3.19^a	2	0.14^c
Insulina s.c.	2	161.6 ± 24.8^c	1	100^a
CIPM SNEDDS	50	24.5 ± 8.2^b	6	1.77^b
CIP SNEDDS	50	27.7 ± 12.1^b	4	1.81^b

Dónde: C_{max} es la concentración máxima alcanzada y %BD es el porcentaje de biodisponibilidad obtenido. Los resultados se expresan como promedios \pm DS (n=5). Valores con letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

A continuación, se presenta la Tabla 18, en donde se reportan otras publicaciones previas a este trabajo

Tabla 18. Resultados obtenidos de biodisponibilidad en otros trabajos publicados y en el presente trabajo

Nanosistema	Tipo de materiales	Tamaño de partícula	Dosis	%BD	Referencia
nanopartículas	Cloruro de metileno y alcohol polivinílico	200 nm	20 UI/kg	7.7%	Cui <i>et al.</i> , 2006
SNEDDS	Oleato de etilo, Cremophor EL y etanol	30.1 nm	300 UI/kg	7.15%	Zhang <i>et al.</i> , 2012
SNEDDS	Capmul, Cremophor RH40 y Etanol	34.7 nm	50 UI/kg	0.43%	Li <i>et al.</i> , 2014
SNEDDS	Cremophor EL, Labrafil M1944, Capmul y propilenglicol	45.87 nm	150 µg	9%	Menzel <i>et al.</i> , 2018
Hidrogel	Poliacrilamida y carboximetil quitosano	150-200 nm	40 UI/kg	4.1%	Yin <i>et al.</i> , 2008
SNEDDS	PC, Lauroglycol FCC, Cremophor EL, Labrafil M1944	30.3 nm	50 UI/kg	1.81%	Este trabajo

Los resultados mostrados en este y otros trabajos ya reportados en literatura sustentan que el encapsulamiento de insulina en sistemas nanoestructurados como los SNEDDS, aumentan la biodisponibilidad oral de la insulina en comparación con la hormona administrada oralmente de forma libre.

7 CONCLUSIONES

- Se formaron sistemas auto-nanoemulsificables con tamaños de entre 20.7 - 48.8 nm con comportamiento monomodal y bajo agitación en un tiempo de 3min.
- Se consiguió una incorporación de insulina del 67% dentro del SNEDDS con un 2.5% de complejo en la fase oleosa, comprobando así, que la formación del complejo insulina-fosfatidilcolina es capaz solubilizar la hormona en medios lipofílicos.
- Se demostró que el complejo insulina-PC embebido dentro del SNEDDS protegió a la hormona de la degradación enzimática en un modelo in vitro, logrando que un 35.7% de la insulina llegara intacta hasta las condiciones del intestino delgado. Mientras que los SNEDDS lograron mantener hasta dicha fase tamaños promedio de partícula menores a los 40 nm, demostrando que los tensoactivos utilizados poseían baja actividad contra las lipasas intestinales.
- En un modelo murino con diabetes inducida se observó un efecto hipoglucémico favorable al administrar complejos de insulina encapsulados en el SNEDDS, reduciendo los niveles de glucemia hasta en un 35.6% a las 4h del tratamiento.
- En el ensayo de biodisponibilidad, los SNEDDS con complejos insulina fosfatidilcolina alcanzaron una biodisponibilidad del 1.8% con respecto al método subcutáneo y no se observó diferencia significativa entre los SNEDDS con complejo insulina-PC e insulina-PCM.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Aranberri, I., Binks, B., Clint, J. y Fletcher, P. 2006. Elaboracion y caracterización de emulsiones estabilizadas por polimeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 7(3):211–231.
- Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S. y Michels, A.W. 2014. Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9):69–82.
- Avachat, A.M. y Patel, V.G. 2015. Self nanoemulsifying drug delivery system of stabilized ellagic acid-phospholipid complex with improved dissolution and permeability. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(3):276–289.
- Baeza, R., Noriega, J.A., Garcia, H.S. y Otero, C. 2012. Structured phosphatidylcholine with elevated content of conjugated linoleic acid: Optimization by response surface methodology. *Lipid Science*, 114(11):1261–1267.
- Basalious, E.B., Shawky, N. y Badr-Eldin, S.M. 2010. SNEDDS containing bioenhancers for improvement of dissolution and oral absorption of lacidipine. I: Development and optimization. *International Journal of Pharmaceutics*, 391(1–2):203–211.
- Bellamy, L., Casas J., Hingorani, A y Williams D. 2009. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes : a systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 373(9677):1773–1779.
- Bernkop-Schnürch, A. 2013. Reprint of: Nanocarrier systems for oral drug delivery: Do we really need them? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(2):272–277.
- Brange, J. y Langkjoer, L. 1993. Insulin structure and stability. *Pharmaceutical Biotechnology*, 5(1922):315–350.
- Cade, J. y Hanison, J. 2017. The pancreas. *Physiology*, 18(10):527–531.
- Cardenas, F., Osorio, G. y Gallardo, T. 2015. Microencapsulation of insulin using a

- W/O/W double emulsion followed by complex coacervation to provide protection in the gastrointestinal tract. *Journal of Microencapsulation*, 32(3):308–316.
- Cardoso, G. y Jiménez, M.T. 2015. Nanoemulsiones en alimentos: preparación y aplicaciones. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 9:15–24.
- Cavazos, A. 2013. Formación y caracterización de nanoemulsiones O / W de ácido betulínico elaboradas a partir de lecitina modificada con ácidos grasos omega-3. Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Chávez, R. 2015. Biodisponibilidad de Ácido Betulínico y Curcumina en nanoemulsiones estabilizadas con lisofosfatidilcolina en un modelo murino. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Veracruz, México.
- Chávez-Zamudio, R., Ochoa, A., Soto-Rodríguez I., García R. y García H.S. 2017. Preparation, characterization and bioavailability by oral administration of O/W curcumin nanoemulsions stabilized with lysophosphatidylcholine. *Food and Function*, 8(9):33–4.
- Chen, F., Fan, G., Zhang, Z., Zhang, R., Deng, Z. y McClements, D.J. 2017. Encapsulation of omega-3 fatty acids in nanoemulsions and microgels: Impact of delivery system type and protein addition on gastrointestinal fate. *Food Research International*, 100(1):387–395.
- Christiansen, A., Backensfeld, T. y Weitschies, W. 2010. Effects of non-ionic surfactants on in vitro triglyceride digestion and their susceptibility to digestion by pancreatic enzymes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2):376–382.
- Chu, L.Y. 2005. Controlled release systems for insulin delivery. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 15(9):1147–1155.
- Cone, R.A. 2009. Barrier properties of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(2):75–85.
- Constantinides, P. 1995. Lipid Microemulsions for improving drugs dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharmaceutical*

Research, 12(11):1561–1572.

Coustan, D.R. 2013. Gestational diabetes mellitus. *Clinical Chemistry*, 59(9):1310–1321.

Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A. y Kawashima, Y. 2006. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin – phospholipid complex for oral delivery: Preparation , in vitro characterization and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*, 114(2):242–250.

D.R. Secretaría de Salud. 2013. Estrategia nacional para la prevención y el control del sobrepeso, la obesidad y la diabetes. Disponible online en: <http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/40477/EstrategiaNacionalSobrepeso.pdf>. (Consultado el 28 de Septiembre del 2016).

Ensign, L.M., Cone, R. y Hanes, J. 2012. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(6):557–570.

Erel, G., Kotmakçl, M., Akbaba, H., Sözer, K. y Kantarçl, A. 2016. Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 36:61–167.

Esperón-Rojas, A., Baeza-Jimenez, R., Cano-Sarmiento, C. y García, H.S. 2017. Structured Mono- and Diacylglycerols with a High Content of Medium Chain Fatty Acids. *Journal of Oleo Science*, 66(9):991–996.

Fernandez, S., Rodier, J., Ritter, N., Mahler, B., Demarne, F., Carrière, F. y Jannin, V. 2008. Lipolysis of the semi-solid self-emulsifying excipient Gelucire 44/14 by digestive lipases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1781(8):367–375.

Fröhlich, E. y Roblegg, E. 2012. Models for oral uptake of nanoparticles in consumer products. *Toxicology*, 291(1–3):10–17.

Garcia, H.S., Kim, I.H., López-Hernandez, A. y Hill Jr., C.G. 2008. Enrichment of lecithin with n-3 fatty acids by acidolysis using immobilized phospholipase A1.

Grasas y Aceites, 59(4):368–374.

García, M., Torres, D. y Alonso, M.J. 2003. Design of lipid nanoparticles for the oral delivery of hydrophilic macromolecules. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 27(3-2):159–168.

Gardner, D.G. 2012. *Endocrinología básica y clínica* 9° Edition. McGrawHill. México D.F., pp 573-644.

Ghannoum, M.A. 2000. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. *Clinical Microbiology*, 13(1):122–143.

Golden, S., Brown, A. y Cauley, J. 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin, 346:1579–1639.

Grimaldi, D., Morán, G. y Mejía, Ó. 2007. La frontera entre la biología molecular y la nanotecnología: Impacto en la medicina. *Iatreia*, 20(3):297–307.

Gursoy, R.N. y Benita, S. 2004. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 58(3):173–182.

Guyton, A. y Hall, J. 2006. Tratado de fisiología médica 11° Ed. *Elsevier Saunders*. México D.F., pp 939-954.

Guyton, A. y Hall, J. 1977. Tratado de Fisiología Medica 5° Ed. N. E. Interamericana. México D.F., pp 856-894

He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhao, W., Dong, X. y Wu, W. 2017. Biomimetic thiamine- and niacin-decorated liposomes for enhanced oral delivery of insulin. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 8(1):97–105.

Libman, I. 2009. Epidemiología de la diabetes mellitus en la infancia y adolescencia : tipo 1, tipo 2 y ¿diabetes “doble”? *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 46(3):22–36.

Jain, S. y Anal, A.K. 2018. Preparation of eggshell membrane protein hydrolysates and culled banana resistant starch-based emulsions and evaluation of their

- stability and behavior in simulated gastrointestinal fluids. *Food Research International*, 103(1):234–242.
- Jameson, L. 2010. *Harrison's Endocrinology 2nd. Ed.* McGrawHill. New York, pp. 267-347.
- Jayakrishnapillai, P.V., Shantikumar, V. y Kaladhar, K. 2017. Current trend in drug delivery considerations for subcutaneous insulin depots to treat diabetes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 153:123–131.
- Jiménez, J.L., Nettleton, E.J. y Bouchard, M. 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14):196–201.
- Kanzarkar, M., Pathak, P.P. y Vaidya, M. 2015. Oral insulin-delivery system for diabetes mellitus. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 4(1):29–36.
- Karamanidou, T., Karidi, K., Bourganis, V., Kontonikola, K., Kammona, O. y Kiparissides, C. 2015. Effective incorporation of insulin in mucus permeating self-nanoemulsifying drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 97:223–229.
- Karamanidou, T., Bourganis, V., Kammona, O. y Kiparissides, C. 2016. Lipid-based nanocarriers for the oral administration of biopharmaceutics. *Nanomedicine*, 11(22):3009–3032.
- Khoobehi, B., Peyman, G. y McTurnan, W. 1988. Externally Triggered Release of Dye and Drugs from Lyposomes into the eye. *Ophthalmology*, 95(7):950–955.
- Kimura, M., Shizuki, M., Miyoshi, K., Sakai, T., Hidaka, H., Takamura, H. y Matoba, T. 1994. Relationship between the molecular structures and emulsification properties of edible oils. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58(7):1258–1261.
- Koo, O.M., Rubinstein, I. y Onyuksel, H. 2005. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1(3):193–212.

- Lebovitz, H.E. 1997. ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITORS. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 26(3):539–551.
- Lee, S., Zabolotny, J., Huangu, H., Lee, H. y Kim, J. 2016. Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. *Molecular Metabolism*, 5(8):589–601.
- Li, P., Tan, A., Prestidge, C.A., Nielsen, H.M. y Müllertz, A. 2014. Self-nanoemulsifying drug delivery systems for oral insulin delivery: In vitro and in vivo evaluations of enteric coating and drug loading. *International Journal of Pharmaceutics*, 477(1–2):390–398.
- Li, P., Nielsen, H.M. y Müllertz, A. 2016. Impact of Lipid-Based Drug Delivery Systems on the Transport and Uptake of Insulin Across Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(9):2743–2751.
- Lindmark, T., Kimura, Y. y Artursson, P. 1998. Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 284(1):362–369.
- Liu, X., Li, X. y Zhang, N. 2015. Engineering B-cell islets or islet-like structures for type 1 diabetes treatment. *Medical Hypotheses*, 85(1):82–84.
- Loyo, V. 2017. Caracterización fisicoquímica de nanoemulsiones de α -Tocoferol evaluadas en un sistema de digestión in vitro. *Tesis de Maestría*. Instituto Tecnológico de Veracruz. México.
- Luisi, P., Giomini, M., Pileni, M. y Robinson, B. 1988. Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *BBA - Reviews on Biomembranes*, 947(1):209–246.
- Macedo, J., Fernandes, L. y Formiga, F. 2006. Micro-emultocrit technique: a valuable tool for determination of critical HLB value of emulsions. *AAPS PharmSciTech*, 7(1):1–7.
- Marfisi, S. 2005. Estabilidad de emulsiones relacionada con el proceso de

- deshidratación de crudos. Tesis Doctoral. Universidad de los Andes. Venezuela.
- Marquez, R. 2005. Obtención de emulsiones parenterales mediante el método de transición de fases. Tesis de Licenciatura. Universidad de Los Andes. Venezuela
- Mason, T., Wilking, J. y Meleson, K. 2006. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(41):635–666.
- McClements, D.J. 2013. Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. *Progress in Lipid Research*, 52(4):409–423.
- McClements, D.J. y Rao, J. 2011. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4):285–330.
- Mendoza, K., Márquez, R., Donado, A., Echenique, O., Mendoza, D. y Pérez M. 2005. Fundamentos biomoleculares de la diabetes mellitus. *Revista de la Facultad de Ciencias de Salud*, 2:135–142.
- Menzel, C., Holzeisen, T., Laffleur, F., Abdulkarim, M. y Gumbleton, M. 2018. In vivo evaluation of an oral self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for exenatide. *Journal of Controlled Release*, 277:165–172.
- Mezquita, P., Reyes, R., Moreno, O., Muñoz, M., Merino, J., Gorgojo, J., Jódar, E., Escalada, J., Gargallo, M., Soto, A., González, N., Becerra, A., Bellido, D., Botella, M., Gómez, F., López de la Torre, M. y Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. 2013. Documento de posicionamiento: evaluación y manejo de la hipoglucemia en el paciente con diabetes mellitus. Grupo de Trabajo de Diabetes Mellitus de la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición. *Endocrinología y Nutrición*, 60(9):p.517.e1-517.e18.
- Mora, Á., Aragón, D. y Ospina, L. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae*, 16(3):311–319.
- Mutaliyeva, B., Grigoriev, D., Madybekova, G., Sharipova, A., Aidarova, S.,

- Saparbekova, A. y Miller, R. 2017. Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 521:147–152.
- Niu, Z., Griffin, B., Driscoll, C. y Alonso, M. (2016). Lipid-based nanocarriers for oral peptide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106(Part B), 337–354.
- Ochoa, A., Hernández, J., Cavazos, A. y García, H. 2013. Phosphatidylcholine Enrichment with Medium Chain Fatty Acids by Immobilized Phospholipase A1 - Catalyzed Acidolysis. *Biotechnology progress*, 29(1):230–236.
- Ochoa, A.A. 2013. Desarrollo de nanoemulsiones con fosfolípidos estructurados como sistemas acarreadores de curcumina. Tesis Doctoral. Intituto Tecnológico de Veracruz. México.
- Ochoa, A., Hernández, J., Cavazos, A., Vernon, E. y García, H. 2017. Optimization of the synthesis of structured phosphatidylcholine with medium chain fatty acid. *Journal of Oleo Science*, 66(11):1207–1215.
- Olaiz-fernández, G. y Rojas, R. 2007. Diabetes mellitus en adultos mexicanos . Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud pública Méx*, 49(3):s331–s337.
- Paolino, D., Ventura, C.A. y Nisticò, S. 2002. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: Percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1–2):21–31.
- Pinto Reis, C., Neufeld, R. y Ribeiro, A. 2006. Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 2(2):53–65.
- Pouton, C.W. y Porter, C.J. 2008. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(6):625–637.
- Prusty, A.K. y Sahu, S.K. 2013. Development and Evaluation of Insulin Incorporated

- Nanoparticles for Oral Administration. *ISRN Nanotechnology*, 2013:1–6.
- Rai, V.K., Mishra, N., Yadav, K. y Yadav, N. 2018. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. *Journal of Controlled Release*, 270:203–225.
- Rao, S.V, Agarwal, P. y Shao, J. 2008. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs. II. In vitro transport study. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1–2):10–15.
- Rizzo, M., Barbieri, M., Grella, R., Passariello, N., Barone, M. y Paolisso, G. 2004. Repaglinide is more efficient than glimepiride on insulin secretion and post-prandial glucose excursions in patients with type 2 diabetes. A short term study. *Diabetes Metab*, 30:81–89.
- Ruiz, M., Escolar, A. y Mayoral, E. 2006. La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades. *Gaceta Sanitaria*, 20(1):15–24.
- Sakloetsakun, D., Dünhaupt, S., Barthelmes, J., Perera, G. y Bernkop-Schnürch, A. 2013. Combining two technologies: Multifunctional polymers and self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral insulin administration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61:363–372.
- Salinas, R., Hiriart, M., Acosta, I., Sosa, A. y Prince, J. 2016. Type 2 diabetes mellitus as a risk factor for dementia in a Mexican population. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 30(7):1234–1239.
- Salpeter, S., Greyber, E., Pasternak, G. y Salpeter, E. 2010. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 67(1):1–12.
- Salvia-trujillo, L., Qian, C., Martín-Belloso, O. y McClements, D.J. 2013. Influence of particle size on lipid digestion and β -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. *Food Chemistry*, 141(2):1472–1480.

- Santalices, I., Gonella, A., Torres, D. y Alonso, M. 2017. Advances on the formulation of proteins using nanotechnologies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 42:155–180.
- Sáyago, S., Vaquero, M. y Schultz-Moreira, A. 2008. Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutricion Hospitalaria*, 23(3):191–202.
- Senapati, P.C., Sahoo, S.K. y Sahu, A.N. 2016. Mixed surfactant based (SNEDDS) self-nanoemulsifying drug delivery system presenting efavirenz for enhancement of oral bioavailability. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 80:42–51.
- Shakeel, F., Raish, M., Anwer, M.K. y Al-Shdefat, R. 2016. Self-nanoemulsifying drug delivery system of sinapic acid: In vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, 224:351–358.
- Shao, P., Qiu, Q., Xiao, J., Zhu, Y. y Sun, P. 2017. Chemical Stability and in vitro release properties of β -carotene in emulsions stabilized by *Ulva fasciata* polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102:225–231.
- Shukla, S.N., Modi, D.C. y Shah, D.P. 2016. A review on solid self-nanoemulsifying drug delivery system: an approach for bioavailability enhancement. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(5):302–316.
- Sodeman, W. 1978. Fisiopatología clínica 2nd. Ed. Nueva editorial Interamericana. México D.F., pp 851–857.
- Solans, C. y Solé, I. 2012. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 17(5):246–254.
- Sripriya, R. y Jun, S. 2008. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs I. Formulation development. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1–2): 2–9.
- Stachurski, J. y Michałek, M. 1996. The Effect of the ζ Potential on the Stability of a

- Non-Polar Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Colloid and Interface Science*, 184(2):433–436.
- Tadros, T., Izquierdo, P. y Esquena, J. 2004. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109:303–318.
- Tébar, F. 2009. *La diabetes mellitus en la práctica clínica*. 1ra. Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, pp 21-72.
- Thomas, A., Brinkkötter, P., Schänzer, W. y Thevis, M. 2015. Metabolism of human insulin after subcutaneous administration: A possible means to uncover insulin misuse. *Analytica Chimica Acta*, 897:53–61.
- Torres, J. y Agüero, S.D. 2015. Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. *Nutr Hosp*, 31(1):76–83.
- Tracy, L., Steji, M. y Ann, J. 2005. Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical Diabetes*, 23(3):17–24.
- Tuomilehto, J., Lindström, J. y Eriksson, J.G. 2012. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England Journal of Medicine*, 344(18):1343–1350.
- Turner, R. 1998. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*, 352(9131):854–865.
- Turner, R., Cull, C., Frighi, V. y Holman, R. 1999. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *American Medical Association*, 281(21):2005–2012.
- Venkata Ramana Rao, S. y Shao, J. 2008. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs. I. Formulation development. *International Journal of Pharmaceutics*, 362(1–2):2–9.
- Vera, J.L. 1995. Liposomas En Dermatología. *Dermatologia Venezolana*, 33:15–23.
- Vikbjerg, A.F. 2006. Enzyme Catalyzed Production of Phospholipids with Modified

- Fatty Acid Profile. Tesis Doctoral. Technical University of Denmark. Dinamarca.
- Vingerhoeds, M.H., Blijdenstein, T., Zoet, F. y Van Aken, G. 2005. Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19(5):915–922.
- Wakerly, M., Pouton, C., Meakin, B. y Morton, F. 1986. Self-emulsification of vegetable oil-non-ionic surfactant mixture: a proposed mechanism of action. *ACS Symposium Series*, 311:242–255.
- Wang, L., Dong, J., Chen, J., Eastoe, J. y Li, X. 2009. Design and optimization of a new self-nanoemulsifying drug delivery system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 330(2):443–448.
- Wong, C.Y., Al-Salami, H. y Dass, C.R. 2018. Microparticles, microcapsules and microspheres: A review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 537(1–2):223–244.
- Xi, X., Feng, X., Shi, N., Ma, X., Lin, H. y Han, Y. 2016. Immobilized phospholipase A1-catalyzed acidolysis of phosphatidylcholine from Antarctic krill (*Euphausia superba*) for docosahexaenoic acid enrichment under supercritical conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 126:46–55.
- Yang, Y. y McClements, D.J. 2013. Vitamin E bioaccessibility: Influence of carrier oil type on digestion and release of emulsified α -tocopherol acetate. *Food Chemistry*, 141(1):473–481.
- Yeung, W.G., Rawlinson, W.D. y Craig, M.E. 2010. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *British Medical Journal*, (May):1–9.
- Yin, L., Ding, J., Fei, L. y He, M. 2008. Beneficial properties for insulin absorption using superporous hydrogel containing interpenetrating polymer network as oral delivery vehicles. *International Journal of Pharmaceutics*, 350(1–2):220–229.
- Yoo, H.S. 2006. Preparation of biodegradable polymeric hollow microspheres using O/O/W emulsion stabilized by Labrafil®. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 52(1):47–51.

- Yu, W., Jiang, G., Liu, D., Li, L., Chen, H., Liu, Y., Huang, Q., Tong, Z., Yao, J. y Kong, X. 2017. Fabrication of biodegradable composite microneedles based on calcium sulfate and gelatin for transdermal delivery of insulin. *Materials Science and Engineering C*, 71:725–734.
- Zhang, Q., He, N., Zhang, L., Zhu, F., Chen, Q., Qin, Y., Zhang, Z., Zhang, Q., Wang. Y He, Q. 2012. The in vitro and in vivo study on Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) based on insulin-phospholipid complex. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 8(1):90–97.
- Zhang, Z., Zhang, R. y McClements, D.J. 2017. Control of protein digestion under simulated gastrointestinal conditions using biopolymer microgels. *Food Research International*, 100(2):86–94.
- Zhao, T., No, D. S., Kim, B. H., Garcia, H. S., Kim, Y. y Kim, I. H. 2014. Immobilized phospholipase A1-catalyzed modification of phosphatidylcholine with n-3 polyunsaturated fatty acid. *Food Chemistry*, 157:132–140.

Apéndice

Apéndice A

Curva de calibración obtenida para la cuantificación de proteína por el método de Bradford

