



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Desarrollo y evaluación de un sistema autonanoemulsificable (SNEDDS) incorporado con polisacáridos mucoadhesivos para la administración de insulina por vía oral

P R E S E N T A:

María Olga Fabiola Muñoz Correa

ASESORES:

Dr. Hugo Sergio García Galindo

Dra. Rebeca García Varela

Dra. Cynthia Cano Sarmiento

H. VERACRUZ, VER. MÉXICO.

Mayo 2019

DESARROLLO Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE UN SISTEMA
AUTONANOEMULSIFICABLE (SNEDDS) INCORPORADO CON
POLISACÁRIDOS MUCOADHESIVOS PARA LA ADMINISTRACIÓN
DE INSULINA POR VÍA ORAL

Por:

María Olga Fabiola Muñoz Correa

Tesis propuesta a la

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ALIMENTOS
DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ

Como requerimiento parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Mayo 2019

RESUMEN

Muñoz Correa, María Olga Fabiola. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Abril de 2019. Desarrollo y evaluación *in vitro* de un sistema autonanoemulsificable (SNEDDS) incorporado con polisacáridos mucoadhesivos para la administración de insulina por vía oral.

Asesores Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dra. Rebeca García Varela, Dra. Cynthia Cano Sarmiento.

La diabetes mellitus Tipo 1 es una enfermedad provocada por desórdenes en la producción y utilización de la hormona insulina, siendo el principal tratamiento la administración de la hormona mediante inyección subcutánea, método que genera problemas como producir hiperinsulinemia o hipoglicemia, además de ser doloroso e incómodo. El principal problema de la vía de administración oral está asociado con la degradación de la insulina en el tracto gastrointestinal. Los sistemas autonanoemulsificables (SNEDDS) han mostrado efectividad en la administración de diferentes fármacos por vía oral; entre ellos proteínas como la insulina. Un SNEDDS es la mezcla de una fase oleosa, un surfactante, un co-surfactante y el fármaco, que forma una nanoemulsión aceite en agua (O/W) cuando se agrega a la fase acuosa aplicando agitación. Sin embargo, la biodisponibilidad de estos sistemas continúa siendo baja comparada con el método subcutáneo. Dentro de las opciones para aumentar la eficiencia de los SNEDDS se contempla la incorporación de la insulina en micelas de fosfolípidos como la fosfatidilcolina, y la agregación de polisacáridos mucoadhesivos para evitar la degradación por las enzimas estomacales y ampliar el tiempo de residencia del fármaco en el organismo, aumentando su absorción. El objetivo de este proyecto fue desarrollar y evaluar un sistema autonanoemulsificable con insulina contenida en un complejo de fosfatidilcolina modificada y con un recubrimiento exterior de los mucoadhesivos alginato de sodio y goma guar. Para cumplir con el objetivo, se siguió la siguiente metodología: 1) Modificación enzimática de la fosfatidilcolina con ácidos grasos de cadena media (AGCM), empleando la enzima PLA1; 2) Formación de un complejo insulina-fosfatidilcolina; 3) Preparación de los SNEDDS utilizando Cremophor como surfactante, Labrafil M1944CS como co-surfactante y lauroglicol FCC como fase oleosa; y adicionalmente alginato de sodio o goma guar como mucoadhesivos, caracterizándolos por tamaño de partícula e índice de polidispersidad; 4) Evaluar la bioaccesibilidad de las diferentes nanoemulsiones en un sistema de simulación digestiva *in vitro*, 5) Evaluar la citotoxicidad y la permeabilidad en línea celular Caco-2; 6) Inducción de diabetes experimental y cuantificación de biodisponibilidad en un modelo murino. Se logró una incorporación molar del 49.69 % de ácido octanoico (C8:0) en la fosfatidilcolina y esta fue

viable para realizar un complejo con la insulina. Se observó que la incorporación de un 2.5 % de complejo al SNEDDS no modificó sus características como comportamiento monomodal y tamaño de partícula. Los sistemas SNEDDS con mucoadhesivos lograron tamaños de partícula de 53.1 a 83.2 nm. En el simulador digestivo *in vitro* se obtuvo un aumento de bioaccesibilidad del 13 % en los tratamientos que incluían los mucoadhesivos. La viabilidad celular disminuyó en ambas líneas celulares hasta el 10 % con respecto al control. El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) fue calculado en 0.903×10^{-6} cm/s. En el modelo murino con diabetes inducida se obtuvo una biodisponibilidad de 2.25 % y reducción de niveles de glucosa entre 42.83 % y 61.63 % de los niveles iniciales.

ABSTRACT

Muñoz Correa, María Olga Fabiola. M. en C. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos. Abril de 2019. Development and *in vitro* evaluation of an autonomic-emulsifiable system (SNEDDS) incorporated with mucoadhesive polysaccharides for the oral administration of insulin.

Advisors: Dr. Hugo Sergio García Galindo, Dra. Rebeca García Varela, Dra. Cynthia Cano Sarmiento.

Type 1 diabetes mellitus is a disease that caused by disorders in the production and use of the hormone insulin, the main treatment being the administration of the hormone by subcutaneous injection, method that generates problems such as producing hyperinsulinemia or hypoglycemia, as well as being painful and uncomfortable. The main problem of the oral administration route is associated with the degradation of insulin in the gastrointestinal tract. The self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) have shown effectiveness in the administration of different drugs orally; among them are proteins such as insulin. A SNEDDS is the mixture of an oil phase, a surfactant, a co-surfactant and the drug, which forms an oil-in-water (O / W) nanoemulsion when added to the aqueous phase by applying agitation. However, the bioavailability of these systems remains low compared to the subcutaneous method. Among the options to increase the efficiency of SNEDDS is the incorporation of insulin in phospholipid micelles such as phosphatidylcholine, and the aggregation of mucoadhesive polysaccharides to prevent degradation by stomach enzymes and extend the residence time of the drug in the organism, increasing its absorption. The objective of this project was to develop and evaluate an self-nanoemulsifying system with insulin contained in a modified phosphatidylcholine complex and with an outer coating of the mucoadhesives sodium alginate and guar gum. To meet the objective, the following methodology was carried out: 1) Enzymatic modification of phosphatidylcholine with medium chain fatty acids (MCFA), using the enzyme PLA1; 2) Formation of an insulin-phosphatidylcholine complex; 3) Preparation of the SNEDDS using Cremophor as surfactant, Labrafil M1944CS as co-surfactant and lauroglycol FCC as oil phase; and in addition sodium alginate or guar gum as mucoadhesives, characterizing them by particle size and polydispersity index; 4) Evaluate the bioavailability of the

different nanoemulsions in a digestive simulation system in vitro, 5) Evaluate the cytotoxicity and permeability in Caco-2 cell line; 6) Induction of experimental diabetes and quantification of bioavailability in a murine model. A molar incorporation of 49.69% of octanoic acid (C8: 0) in phosphatidylcholine was achieved and this was viable to make a complex with insulin. It was observed that the incorporation of a 2.5% complex to the SNEDDS did not modify its characteristics as monomodal behavior and particle size. The SNEDDS systems with mucoadhesives achieved particle sizes of 53.1 to 83.2 nm. In the in vitro digestive simulator, an increase in bioavailability of 13% was obtained in the treatments that included the mucoadhesives. The cell viability decreased in both cell lines up to 10% with respect to the control. The coefficient of apparent permeability (P_{app}) was calculated at 0.903×10^{-6} cm / s. In the murine model with induced diabetes, a bioavailability of 2.25% and reduction of glucose levels between 42.83% and 61.63% of the initial levels were obtained.

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tablas	xii
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Diabetes mellitus	3
1.1.1 DM tipo 1	3
1.1.2 DM tipo 2	4
1.1.3 DM gestacional	6
1.2 Insulina	8
1.2.1 Síntesis de insulina	9
1.2.2 Acción de la insulina	11
1.2.3 La insulina como fármaco	12
1.2.4 Problemas de la administración de insulina	13
1.3 Encapsulación de fármacos proteicos	16
1.4 Complejos encapsulantes de proteínas	18
1.4.1 Fosfolípidos nativos y modificados	19
1.4.2 Modificación de fosfolípidos con Ácidos grasos de cadena media	21
1.5 Nanoemulsiones	22
1.5.1 Preparación de las nanoemulsiones	24
1.6 SNEDDS.....	26
1.6.1 Surfactantes.....	27
1.6.2. Valor HLB	27
1.7 Mucoadhesión	29
1.7.1 Alginato.....	29
1.7.2 Goma guar.....	30

1.8 Síntesis de antecedentes.....	31
2. JUSTIFICACIÓN	32
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general.....	34
4.2 Objetivos específicos	34
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
5.1 Modificación enzimática de fosfatidilcolina de soya con ácidos grasos de cadena media.	35
5.1.1 Cuantificación de la retención de PLA1 en duolita.....	35
5.1.2 Síntesis de fosfatidilcolina modificada (PCM) rica en AGCM a partir de fosfatidilcolina de soya.....	36
5.1.3 Determinación de la incorporación de AGCM a la fosfatidilcolina.....	36
5.1.4 Determinación del rendimiento de la reacción de acidólisis.....	37
5.1.5 Purificación de PCM por cromatografía en columna.....	37
5.3 Elaboración del complejo insulina-PC e insulina-PCM	38
5.2 Formulación de los SNEDDS.....	38
5.4 Incorporación de mucoadhesivos	39
5.5 Caracterización de las SNEDDS	41
5.5.1 Tamaño y distribución de tamaño de partícula.	41
5.5.2 Medición del potencial zeta.....	41
5.6 Bioaccesibilidad <i>in vitro</i>	41
5.7 Citotoxicidad en células Caco-2.....	43
5.8 Prueba de permeabilidad en células Caco-2	43
5.9 Evaluación de la biodisponibilidad de la insulina oral en un modelo murino	
44	
6. RESULTADOS	47

6.1 Modificación enzimática de la fosfatidilcolina de soya con ácidos grasos de cadena media.	47
6.1.1 Inmovilización de PLA1.....	47
6.1.2 Síntesis de fosfatidilcolina modificada (PCM) rica en AGCM a partir de fosfatidilcolina de soya.....	48
6.1.3 Determinación de la incorporación de AGCM a la fosfatidilcolina.....	48
6.1.4 Determinación del rendimiento de la reacción de acidólisis.....	50
6.1.5 Purificación de PCM por cromatografía en columna.....	52
6.3 Complejo insulina-fosfolípido	52
6.2 Formulación de SNEDDS	53
6.4 Incorporación del complejo insulina-fosfolípido en SNEDDS.....	56
6.5 Incorporación de mucoadhesivos en sistemas SNEDDS	59
6.6 Evaluación de bioaccesibilidad en el sistema digestivo <i>in vitro</i>	62
6.7 Prueba de citotoxicidad en células Caco-2.....	65
6.8 Permeabilidad en células Caco-2	70
6.9 Prueba de bioactividad en el modelo murino	72
6.9.1 Determinación de reducción de glucosa	73
6.9.2 Biodisponibilidad de insulina.....	77
7. CONCLUSIONES	81
REFERENCIAS.....	82

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de la insulina humana (Brange y Langkjoer, 1993).....	8
Figura 2 Estructura de preinsulina (Brunton 2012).....	10
Figura 3 Cadena de reacciones producidas por la interacción de la insulina con su receptor (Brunton, 2012).	12
Figura 4 Ilustración de dos sistemas para la encapsulación de péptidos de interés farmacéutico (Li et al., 2011).	17
Figura 5 Estructura del fosfolípido fosfatidilcolina. La estructura básica de un fosfolípido tiene una parte polar y otra no polar, conferidas por el grupo fosfato y las cadenas de ácidos grasos, respectivamente (Li et al., 2014).....	19
Figura 6 Enlaces en los que actúan las diferentes fosfolipasas (Aloulou et al., 2012).	21
Figura 7. Mecanismos fisicoquímicos de ruptura de una nanoemulsión.	24
Figura 8 Proceso de emulsificación espontánea (McClements, 2011).	25
Figura 9 Secuencia y condiciones de la evaluación in vitro.	42
Figura 10. Esquema de las partes de la placa Transwell para pruebas de permeabilidad (Corning™).....	44
Figura 11 Cinética de inmovilización de enzima PLA1 en Duolita A568	47
Figura 12 Perfil de ácidos grasos esterificados de PC: 1)13 estándar interno, 2)16:0, 3) 18:0, 4)18:1 n-9, 5)18:1 n-7, 6)18:2 n-6, 7) 18:3 n-3.	48
Figura 13 Porcentaje molar de incorporación de AGCM en PC	49
Figura 14 Perfil de ácidos grasos esterificados de PCM: 1) C8:0, 2) C13:0 estándar interno, 3) C16:0, 4) C18:0, 5) C18:2 n-6, 6) C18:3 n-3.	50
Figura 15 Rendimiento de la cinética de modificación de PC	51

Figura 16 Cromatograma inicial de la cinética de reacción de acidólisis, 1) AGCM, 2) PC	51
Figura 17 Cromatograma inicial de la cinética de reacción de acidólisis, 1) AGCM, 2) PC, 3) PCM, 4) Lisofosfatidilcolina.....	52
Figura 18 Diagrama de fases ternaria. Los puntos indican zonas de emulsificación espontánea con comportamientos monomodales. Las cruces indican áreas donde no se produjo la emulsificación espontánea.....	54
Figura 19 Comportamiento monomodal del sistemas seleccionados; a) sistema 2, b) sistema 6 y c) sistema 9.....	56
Figura 20 Sistema con a) 2.5 % de complejo y b) 10% de complejo. Se observa el sedimento en la concentración más alta de complejo.	57
Figura 21. Efecto del porcentaje de complejo en la fase oleosa sobre el tamaño de partícula, a) tamaño previo a la adición del complejo, b) 2.5% de complejo PCM c) 5% de complejo PCM d) 10% de complejo PCM.	58
Figura 22. Comportamiento bimodal de los tratamiento a) T4 y b) T8.	61
Figura 23 Cambio de la distribución de tamaño de partícula del T3 en sistema gástrico <i>in vitro</i>	63
Figura 24 Bioaccesibilidad de los Tratamientos durante las fases del sistema gástrico <i>in vitro</i> . a) sistemas libres de mucoadhesivos T1 y T5. b) Sistemas con goma guar, T2 y T6. c) Sistemas con alginato de sodio T3 y T7.....	64
Figura 25 Bioaccesibilidad final de los 6 tratamientos probados al finalizar la etapa de intestino delgado del simulador gástrico <i>in vitro</i>	65
Figura 26. Viabilidad celular de SNEDDS compuesta por Labrafil, Lauroglycol y Cremophor EL, cada concentración y líneas celulares. (n=9)	67
Figura 27 Viabilidad celular de la línea Caco-2. Se probaron 3 concentraciones de los 6 tratamientos, se observó una relación entre el aumento en la concentración de insulina y la disminución de la viabilidad. (SD n=6).....	69
Figura 28. Viabilidad celular de la línea NIH 3T3. Se probaron 3 concentraciones de los 6 tratamientos, se observó una relación entre el aumento en la concentración de insulina y la disminución de la viabilidad. (SD n=6).....	69

Figura 29. Transporte de sistemas SNEDDS a través de monocapa de células Caco-2. El tratamiento con PC modificada tiene un mayor tiempo de permeabilidad..... 71

Figura 30 Niveles de glucosa en sangre en animales experimentales sanos y con diabetes inducida. Valores de glucosa postpandrial mayores a 250 mg/dL indican la inducción de la enfermedad 73

Figura 31 Niveles de reducción de glucosa en sangre durante 8 horas después de la administración de los tratamientos, Insulina subcutánea (s.c.) 2 UI/kg, los demás tratamientos se administraron a 20 UI/kg. Los puntos representan la media \pm DS (n=3)..... 75

Figura 32 Niveles de insulina en sangre posteriores a la administración de insulina sc (2 UI/kg), administración oral de solución de insulina (50 UI/kg), y los tratamientos (50 UI/kg). Los puntos representan la media \pm DS (n=3). 78

Lista de Tablas

Tabla 1 Farmacocinética de diferentes tipos de insulina de uso clínico (De Luis y Romero, 2013).	13
Tabla 2 Características y aplicaciones para valores de HLB.	28
Tabla 3 Formulaciones para la preparación de SNEDDS	39
Tabla 4 Factores y niveles del diseño experimental para la incorporación de polisacáridos a SNEDDS.	40
Tabla 5 Tratamientos del diseño experimental.....	40
Tabla 6 Composición de las soluciones simuladoras de fluidos gástricos ((Sarkar et al., 2009)	43
Tabla 7 Tamaños de partícula de pre-formulaciones de SNEDDS	55
Tabla 8 Caracterización de sistemas con polisacáridos	60
Tabla 9 Cambio de tamaño de partícula en cada fase del simulador gástrico <i>in vitro</i>	62
Tabla 10 Efecto hipoglucémico de los tratamientos de prueba	77
Tabla 11 Parámetros farmacocinéticos después de la aplicación de los tratamientos	79
Tabla 12 Biodisponibilidad de diferentes estudios.....	80

INTRODUCCIÓN

La Diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa cuyo principal tratamiento consta de la aplicación de la hormona insulina exógena. La forma de administración más común es mediante inyecciones subcutáneas e intravenosas; sin embargo, estos son métodos que pueden generar complicaciones debido a los largos periodos en los que se aplican las inyecciones. Entre las afecciones más comunes se encuentran la lipodistrofia que ocasiona una disminución en la absorción del compuesto y posibles infecciones por punciones. Una alternativa a esta estrategia de tratamiento, que resulta ser no invasiva, es la administración por vía oral; sin embargo, debido a la naturaleza del tracto digestivo esta vía de administración tiene la problemática de la baja biodisponibilidad por degradación hidrolítica. Actualmente los sistemas autoemulsificables de liberación de fármacos (SNEDDS) han mostrado un prometedor potencial en la administración de diferentes sustancias activas. Una nanoemulsión es un sistema compuesto de una fase continua y una dispersa, además de un surfactante o emulsificante que ayuda a estabilizar el sistema, como los fosfolípidos. La implementación de fosfolípidos modificados enzimáticamente con ácidos grasos de cadena media en nanoemulsiones ha mostrado un aumento en la resistencia ante la degradación enzimática en condiciones similares a las del estómago. En diferentes sistemas de administración de fármacos se han incorporado mucoadhesivos; estos compuestos interactúan con la membrana de la mucosa intestinal, lo que produce un aumento en el tiempo de interacción del fármaco con el organismo. Entre las aplicaciones más recientes de los mucoadhesivos se encuentran su implementación en nanoemulsiones, pues también fungen como emulsificantes. El objetivo de este proyecto fue desarrollar un sistema autonanoemulsificable para la administración de insulina por vía oral. Se implementó el uso de polisacáridos como mucoadhesivos para aumentar la absorción en el intestino y la resistencia ante la degradación estomacal. Para cumplir con dicho objetivo se siguió la siguiente metodología: 1) Modificación enzimática de la fosfatidilcolina con ácidos grasos de cadena media; 2) Formación de un complejo insulina-fosfatidilcolina; 3) Formación de SNEDDS y su caracterización al medir tamaño de partícula, índice de polidispersidad y

potencial Z; 4) Evaluación en un sistema *in vitro* de simulación digestiva; 5) Evaluación de citotoxicidad y permeabilidad en la línea celular Caco-2 de cáncer de colon; y 6) Evaluación del sistema en un modelo murino con Diabetes inducida.

1. ANTECEDENTES

1.1 Diabetes mellitus

El término Diabetes mellitus (DM), es utilizado para nombrar un desorden multifactorial metabólico con múltiples orígenes, caracterizada por hiperglicemia crónica, así como el ineficiente metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas como resultado de defectos en la secreción de la hormona insulina secretada por el páncreas. La DM produce daños a largo plazo, disfunción y falla de varios órganos. De la misma manera, se pueden desarrollar diferentes signos como poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de visión y pérdida de peso, entre otros síntomas. En casos severos se presenta la ceto-ácidosis, coma diabético, amputación de extremidades y hasta la muerte si no se recibe tratamiento (Alberti y Zimmet, 1998). Algunos pacientes carecen de la manifestación de signos y síntomas durante las etapas tempranas de la patología, por lo que la patología puede ser diagnosticada hasta que se encuentra en un estado avanzado.

En México, desde 1940, la DM se ha colocado como una de las principales causas de muerte; en la década de 1990's la prevalencia de fue de entre el 8% y 9 % de la población, estimándose que para el año 2025 se podría alcanzar el 12.3% (Olaiz-Fernández *et al.*, 2007).

La clasificación de la enfermedad se basa en los resultados de glucosa en plasma después de la prueba de tolerancia oral. De acuerdo a los valores de glucosa en plasma, se establecen valores normales, límite y de DM; el valor normal para esta prueba es 140 mg/dL de glucosa en plasma, pasadas 2 horas de ingerir 75 g de glucosa; valores de 200 mg/dL y superiores indican presencia de diabetes (Seino *et al.*, 2010). La DM se clasifica generalmente de la siguiente forma: Tipo 1, Tipo 2 y Diabetes Gestacional (Kerner y Brückel, 2014).

1.1.1 DM tipo 1

DM tipo 1 (DMT1), también conocida como insulino-dependiente o infantil, se produce por la destrucción de las células- β de los islotes de Langerhans en el páncreas; dicha destrucción se puede deber a una respuesta autoinmune o de origen desconocido (Alberti y Zimmet, 1998). La destrucción de las células- β se

refleja en la falta de producción de insulina, por lo tanto, los pacientes dependen del suministro externo de insulina para poder metabolizar los carbohidratos ingeridos.

La DMT1 puede ser diagnosticada a cualquier edad, pero es una de las enfermedades crónicas más comunes entre infantes, con una mayoría de diagnósticos entre los 5 y 7 años ó cercanos a la pubertad. Esta patología presenta mayor incidencia entre hombres que en mujeres, en muchos casos se presenta un diagnóstico erróneo de la DMT2, por lo que se presume que la incidencia de la DMT1 puede estar subestimada (Seino *et al.*, 2010).

La DMT1 tiene origen en un desorden poligénico, con cerca de 40 loci (Atkinson *et al.*, 2014), por lo que familiares de estos pacientes tienen un mayor riesgo de padecerla; el 90% de los casos se presentan en familias sin DMT1 en su historial médico.

Como fue mencionado previamente, el principal tratamiento para la DMT1 es la administración de insulina exógena, comúnmente por vía subcutánea. Otras alternativas de tratamiento incluyen las bombas de insulina, dispositivos que suministran continuamente la hormona al organismo, y trasplante de páncreas (Liu *et al.*, 2015), siendo este último poco utilizado por los requerimientos médicos y posibles complicaciones post-operatorias.

1.1.2 DM tipo 2

La DM tipo 2 (DMT2) es el tipo de DM con mayor incidencia; se produce por defectos en la producción de insulina y/o la resistencia a la misma, defectos en la estructura conformacional de la insulina y la disminución en la cantidad de receptores de la insulina o su afinidad por la hormona (Mendoza *et al.*, 2005). La DMT2 está frecuentemente asociada con otras enfermedades que forman parte del síndrome metabólico, y que incluyen obesidad, afecciones cardiovasculares como hipertensión, niveles altos de triglicéridos y colesterol, entre otros (Kerner y Brückel, 2014; Seino *et al.*, 2010). Se considera que la DMT2 y las enfermedades relacionadas pueden ser prevenidas al llevar una alimentación adecuada y

realización de actividades físicas. Este tipo de diabetes es más común en personas adultas y de edades avanzadas con malos hábitos alimenticios y vida sedentaria. El diagnóstico de la enfermedad ocurre generalmente cuando se presenta una complicación asociada a un estado avanzado de hiperglucemia (Diabetes Prevention Program Research Group, Ujhelyi; Kerner y Brückel, 2014). Algunos estudios han revelado que en los casos de personas obesas la cantidad de receptores de insulina se encuentran disminuidos, además de un aumento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias que pueden bloquear la cascada de señalización de la insulina. Como respuesta el organismo incrementa la secreción de insulina, esto aunado a la disminución de receptores de insulina genera hiperinsulinemia en la mayoría de los pacientes con DMT2 (Mendoza *et al.*, 2005).

De acuerdo con resultados presentados por la Encuesta Nacional de Salud del año 2000 (Olaiz-Fernández *et al.*, 2007), en México se encontró un incremento en el diagnósticos de la DMT2 ligado con el aumento de edad, una mayor incidencia en el sexo femenino y personas con antecedentes familiares de DM. Durante el año 2000 el 7.5% de la población mayor de 20 años tenía un diagnóstico de DMT2; para el año 2012 dicha cantidad aumentó al 9.17% de la población adulta, lo que ha llevado a considerar a la DMT2 como una epidemia que trae consigo otras enfermedades de alto riesgo, originando además un aumento en los gastos de salud pública para la atención de los pacientes. Los costos de atención a personas con esta patología varían de los \$700 a los \$5,200 dólares anuales considerando los costos de laboratorio y medicación (Hernández-Ávila *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2018)

El tratamiento para esta enfermedad varía, dependiendo el estado de desarrollo en que se diagnóstica, al no ser un tipo de DM dependiente de la insulina, la administración de la misma se contempla como un tratamiento posterior a la utilización de otros medicamentos, entre los que se encuentran: metformina para disminuir la producción hepática de glucosa, estimuladores de insulina (sulfonilureas y glinidas), e inhibidores de alfa-glucosidasas que retrasan la absorción de glucosa (Alberti y Zimmet, 1998).

1.1.3 DM gestacional

La DM gestacional (DMG) se refiere a hiperglicemia producida por la intolerancia a carbohidratos durante el embarazo (Alberti y Zimmet, 1998). Se considera a la DMG a los casos identificados durante el periodo gestacional, sin importar que la intolerancia persista después del embarazo. Mujeres diagnosticadas con DM tipo 1 o 2 previo al embarazo no entran dentro de este grupo. La DMG afecta a alrededor del 7% de las mujeres embarazadas, lo equivalente a aproximadamente 200,000 casos por año (Kerner y Brückel, 2014).

Los valores normales de concentración de glucosa postprandial suelen ser más elevados durante el primer y la mitad del segundo trimestre de embarazo tanto en mujeres sanas como en mujeres con DMG. De acuerdo a pruebas establecidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), los valores de glucosa en plasma de la prueba de tolerancia oral a la glucosa deben ser mayores a 126 mg/dL para la prueba rápida, y 140 mg/dL en la prueba pasadas 2 horas, para poder diagnosticar DMG. Sin embargo, existen diferentes criterios para la prueba de tolerancia oral de glucosa.

La DMG se caracteriza por la resistencia a la insulina, lo que produce la hiperinsulinemia; dicha resistencia se inicia en el segundo trimestre y permanece hasta el final del embarazo. La sensibilidad a la insulina se ve reducida hasta en un 80%, esto es debido a las hormonas secretadas por la placenta: progesterona, cortisol, prolactina y hormona de crecimiento. La resistencia a la insulina durante la gestación es importante para garantizar que el feto tenga un buen suministro de glucosa, cambiando el metabolismo de la madre para que utilice lípidos en lugar de carbohidratos (Setji *et al.*, 2005). Esta resistencia a insulina, normal durante el embarazo, se ve potenciada en mujeres con DMG.

El tratamiento para pacientes con DMG incluye el control médico de la dieta, en este tratamiento se adecua la alimentación para la madre y el feto, considerando las calorías necesarias para el peso de la madre y para mantener valores normales de glucosa, evitando la cetosis. En casos donde el control de la alimentación no logra mantener los niveles de glucosa cerca a los valores normales o se observa un

crecimiento excesivo del feto, se emplea la terapia de insulina, con insulina humana o un análogo de rápida acción. El tratamiento con insulina mostró ser seguro tanto para la madre como para el feto, pues en diversos estudios no se encontraron trazas de insulina en la placenta (Jovanovic *et al.*, 1999), las dosis a suministrarse se deben ajustar cuidadosamente a los requerimientos de cada paciente.

Además de los cuidados que la madre debe llevar durante la gestación, es necesario que se realice un control médico después del parto, por el alto riesgo de padecer DMT2 en un futuro.

1.2 Insulina

La insulina humana es una proteína de peso molecular de 5.8 kDa, formada por 51 aminoácidos, distribuidos en dos cadenas de polipéptidos, las cadenas A y B. Las cadenas están unidas por dos enlaces tipo puente disulfuro, como se muestra en la Figura 1. La cadena A tiene 21 aminoácidos y la B 30, los residuos marcados en color negro indican los aminoácidos que deben mantenerse invariables para asegurar la estructura de la molécula (Brange y Langkjær, 1993; Sarmiento *et al.*, 2006).

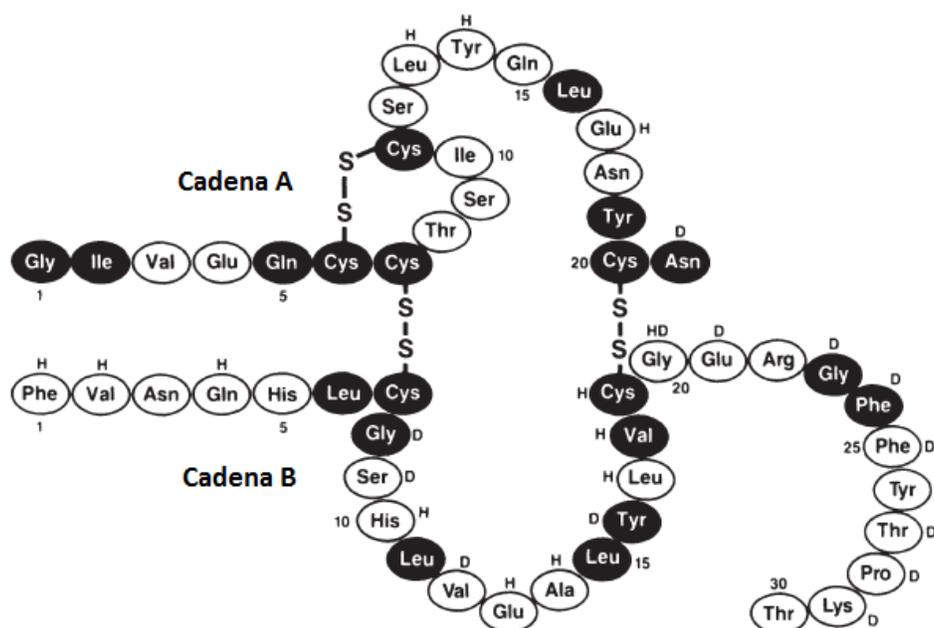


Figura 1. Estructura de la insulina humana (Brange y Langkjær, 1993).

La estructura de la insulina es variable de especie a especie, en farmacéutica se utilizan las variantes más parecidas a la estructura de la insulina humana, como la insulina bovina, que en la cadena A contiene alanina en la posición 8 y valina en la posición 8; la cadena B tiene alanina en la posición 30; la insulina porcina sólo tiene la variación del aminoácido en la cadena A, posición 8.

1.2.1 Síntesis de insulina

El páncreas es el órgano donde se lleva a cabo la síntesis de la insulina; los islotes de Langerhans pancreáticos son el sitio específico donde ocurre dicha síntesis. En los islotes se encuentran cuatro tipos de células que se encargan de secretar diferentes hormonas; las células β secretan insulina, las células α secretan glucagón, las células δ somatostatina y las células F sintetizan el polipéptido pancreático (Brunton, 2012; De Luis y Romero, 2013).

El precursor de la insulina es una cadena de 110 aminoácidos llamada preproinsulina. La preproinsulina pasa al retículo endoplásmico rugoso, donde el péptido señal, constituido por 24 aminoácidos, se desdobla para formar preinsulina. En la molécula de preinsulina se forman los enlaces disulfuro que otorgan la estructura conformacional fundamental. La preinsulina consta de 86 aminoácidos, como se muestra en la Figura 2, la preinsulina humana es modificada a insulina en el aparato Golgi, donde por medio de proteólisis se elimina la sección del péptido conector, sitios de ruptura se muestran en la mencionada Figura 2, al cortar el péptido conector se forman las dos cadenas de péptidos, A y B. Las enzimas que se encargan del corte del péptido conector son endoproteasas, PC2 y PC3 (Brunton, 2012).

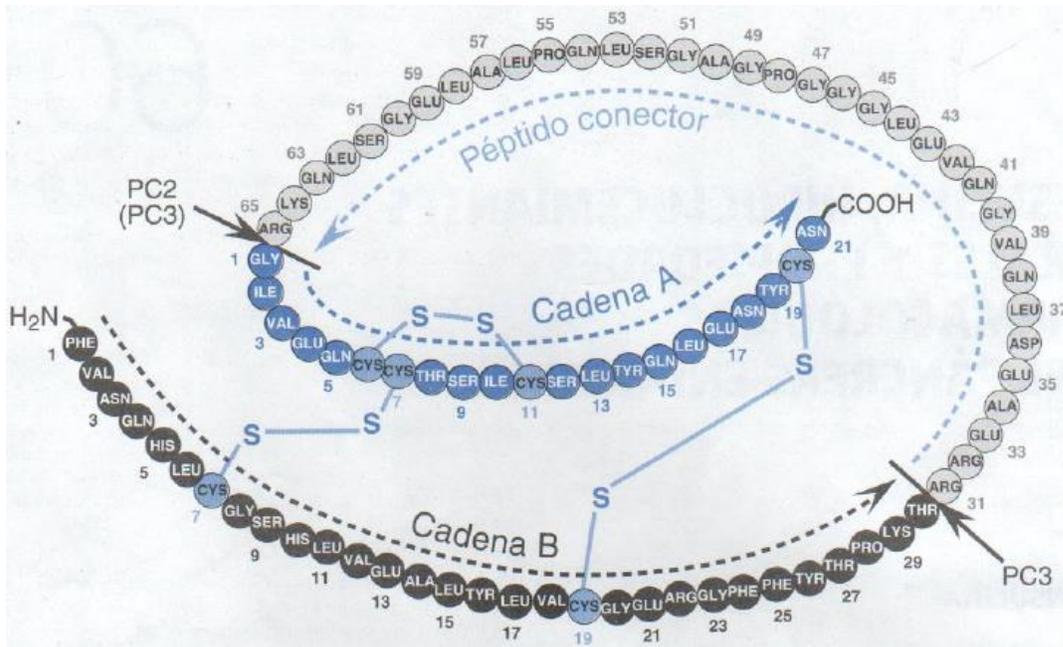


Figura 2 Estructura de preinsulina (Brunton 2012).

La estructura cristalina de la insulina muestra que las dos cadenas de aminoácidos tienen varias regiones alfa-hélice. Las cadenas A y B aisladas son inactivas, la insulina puede estar en forma de monómero, dímero o hexámero cuando se encuentra en solución. En el páncreas, la insulina se almacena en forma de hexámeros, mismos que son coordinados por dos moléculas de zinc. El monómero de insulina es la forma activa (Brunton, 2012).

La síntesis y secreción de insulina es regulada por la interrelación de los nutrientes, hormonas gastrointestinales, hormonas pancreáticas y neurotransmisores del sistema autónomo (Brunton, 2012). El consumo o presencia de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y cuerpos cetónicos favorecen la secreción de insulina. La glucosa es el principal estímulo para la secreción de insulina en humanos, la liberación de insulina se ve estimulada por gastrina y secretina.

La secreción de la insulina promovida por glucosa presenta dos fases, en la primera se alcanza un máximo después de 2 minutos de la ingesta y es de corta duración, la segunda fase es de inicio tardío, que tiene una duración prolongada y variable.

1.2.2 Acción de la insulina

La insulina es liberada desde las células- β a la sangre; en ayuno los niveles de insulina en sangre son de 0.5 ng/mL en la distribución periférica y de 2 a 4 ng/mL en vena porta. Al ingerir alimentos, las concentraciones de insulina aumentan rápidamente en la vena porta y en paralelo se aumenta en circulación periférica. La vida media de la insulina en plasma es de 5-6 minutos (Brunton, 2012).

La insulina desencadena una serie de reacciones a nivel celular: controla la captación, utilización y almacenamiento intracelular de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos; bloquea procesos catabólicos como la desintegración de glucógeno, grasa y proteína. La principal acción de la insulina es el transporte de glucosa hacia tejidos, la glucosa entra a las células por difusión facilitada, mediante transportadores, se consideran cinco, de GLUT1 a GLUT5. Estos transportadores son glucoproteínas de membrana integrales; cada uno posee dominios α que abarcan la membrana. La acción de la insulina es estimular el transporte de glucosa al favorecer la translocación dependiente de energía de las vesículas que contienen los transportadores GLUT1 y GLUT4 hacia la membrana, como se observa en la Figura 3. La membrana celular tiene receptores para la insulina, que median reacciones de fosforilación al unirse la insulina al receptor (Brunton, 2012).

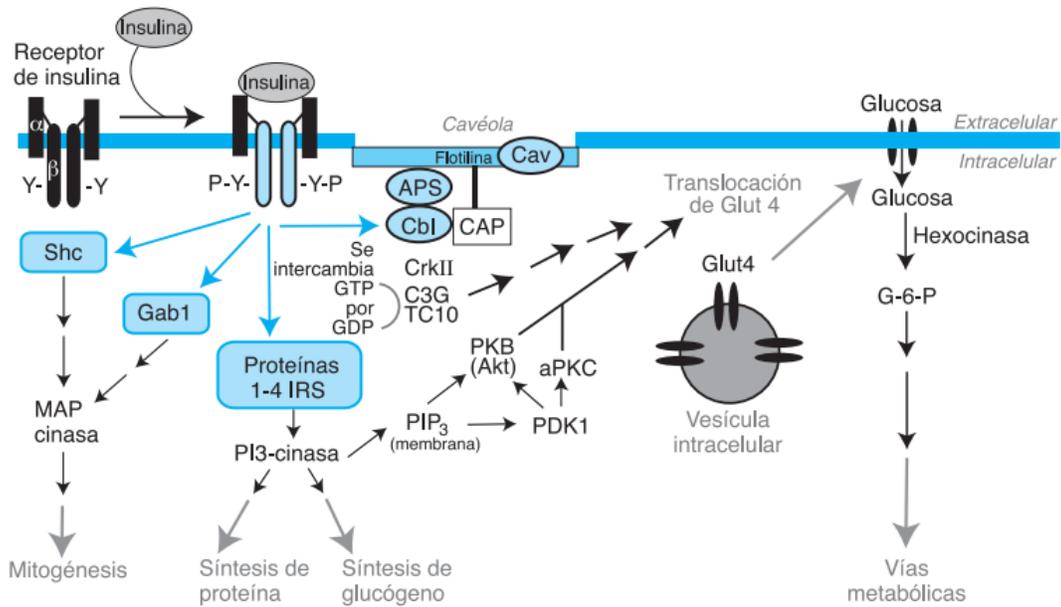


Figura 3 Cadena de reacciones producidas por la interacción de la insulina con su receptor (Brunton, 2012).

1.2.3 La insulina como fármaco

Como fue previamente establecido, la insulina es el agente terapéutico principal en el tratamiento de DMT1, y uno de los más usados en casos de DMT2 y DMG. Históricamente se han utilizado diferentes tipos de insulina para el tratamiento de la diabetes como insulina bovina y porcina, y recientemente humana, gracias al desarrollo de técnicas de ADN recombinante se han logrado sintetizar análogos de insulina humana en sistemas bacterianos (Brunton, 2012; Mayer *et al.*, 2007). Actualmente, se utiliza insulina humana y sus análogos, pero cada tipo de insulina tiene su perfil de acción. En la Tabla 1 se muestran algunos de los tipos más comunes de insulina y su perfil; en el caso de la insulina Glargina y Determir no se cuenta con un tiempo máximo de acción, ya que son insulinas de larga duración.

Tabla 1 Farmacocinética de diferentes tipos de insulina de uso clínico (De Luis y Romero, 2013).

Tipo de insulina	Inicio de acción	Acción máxima (h)	Duración de la acción (h)
Humana regular	30-60 min	2-4	5-7
Lispro	5-15 min	1-2	2-4
Aspártica	10-20 min	1-3	3-5
Glulisina	5-15 min	1-2	4-6
Glargina	1-2 h	-	24
Detemir	1-2 h	-	16-24

Los análogos de insulina (lispro, aspártica, glulisina), poseen modificaciones en algunos aminoácidos, lo que cambia su estructura y produce una vida media más larga, a la vez que imita el perfil de acción de la insulina endógena y reduce el riesgo de picos postprandiales de glucemia y posibles hipoglucemias nocturnas.

La dosis de insulina que se debe administrar cada paciente es ajustada a los requerimientos individuales y al tipo de insulina que se vaya a administrar. En todos los casos trata de simularse el proceso normal de secreción de insulina que se estimula con la ingesta de alimentos.

1.2.4 Problemas de la administración de insulina

La insulina exógena suele administrarse principalmente por vía subcutánea, para alcanzar condiciones cercanas a los valores de normales de glucosa, y por ende es necesaria la administración de múltiples dosis. En la absorción de la insulina influyen diversos factores, entre los que destacan el sitio de inyección, ya que esto determina el flujo sanguíneo subcutáneo, y por ende la distribución del fármaco.

Los sitios de inyección son en tejidos subcutáneos de abdomen, muslo, glúteos o brazo; la absorción más rápida ocurre en abdomen. Es necesario hacer una rotación

de los sitios de inyección pues repeticiones en el mismo sitio producen lipohipertrofia o lipoatrofia.

La lipohipertrofia (aumento de los depósitos de grasa subcutánea) y la lipoatrofia (atrofia de la grasa subcutánea), son reacciones asociadas a las altas concentraciones de insulina en los sitios de inyección (Brunton, 2012). Ambos problemas se ven aumentados si las inyecciones son repetidas en los mismos lugares y causan una absorción irregular de la insulina, pues disminuye la biodisponibilidad de la misma, lo que a su vez ocasiona valores inadecuados de glucosa en sangre.

La lipoatrofia es más común en personas jóvenes, ocurre comúnmente entre los 6-24 meses de tratamiento con inyecciones subcutáneas. Este problema ocurre en el 25-55% de los pacientes que utilizan insulinas sin purificar y en menos del 10% que utilizan insulina de alta pureza (Richardson & Kerr, 2003). La recomendación general para el tratamiento de esta atrofia es dejar de utilizar el área para las inyecciones; sin embargo, los pacientes eventualmente vuelven a utilizar dichas áreas pasado un tiempo recuperación insuficiente. Dicho proceso produce una recaída y la necesidad de inyectar en otras áreas cercanas.

La lipohipertrofia es el problema de piel asociado al tratamiento de insulina más común, con una incidencia del 30% en pacientes con DMT1 (Richardson y Kerr, 2003). En este caso las células son atrofiadas por la acumulación de grasa, proceso que es inducido por el efecto lipogénico de la insulina. Con el desarrollo de la hipertrofia decrece la irrigación sanguínea de la zona y disminuye la absorción de la insulina.

Otros problemas asociados a las inyecciones de insulina son alergias a los componentes y estabilizantes de las soluciones, principalmente el Zinc, reacciones idiosincráticas en la piel produciendo comezón, enrojecimiento y pigmentación de las zonas afectadas (Richardson y Kerr, 2003).

Para la correcta aplicación de las inyecciones subcutáneas de insulina es necesario contar con conocimientos y prácticas adecuadas, evitando la aparición de

infecciones en la piel o sistémicas y la pérdida de la actividad de la insulina. Aunado a esto, la mayoría de los pacientes desarrollan ansiedad ante las punciones (Zambanini *et al.*, 1999). Adicionalmente, las inyecciones de insulina producen hipoglucemias e hiperinsulinemia; estos problemas se han visto disminuidos con la utilización de los análogos de insulina; sin embargo, su costo los vuelve poco accesibles para la mayoría de los pacientes. La hiperinsulinemia conduce a un aumento en la captación de glucosa, en la síntesis de glucógeno, ácidos grasos y triglicéridos y se asocia con el desarrollo de arterosclerosis, cáncer y desordenes metabólicos (Kanzarkar *et al.*, 2015).

Debido a los problemas asociados a la administración subcutánea de insulina se han estudiado otras posibles vías de administración y otros métodos menos invasivos y de fácil utilización para pacientes.

1.3 Encapsulación de fármacos proteicos

En el mercado farmacéutico mundial, el 10% de fármacos son de origen proteico, con ganancias estimadas en aproximadamente \$40 billones de dólares por año (Bruno *et al.*, 2014). El principal método de administración es la inyección subcutánea, que tiene como principal desventaja la necesidad de conocimientos y prácticas adecuadas para su aplicación, implica un gasto económico por la compra de jeringas, algodón e hisopos. Esta estrategia genera una gran cantidad de desechos, además de producir problemas de piel en el caso de enfermedades crónicas por las repetidas inyecciones en las mismas zonas; es un método invasivo y poco cómodo para el paciente.

La administración de este fármaco por vías alternas tiene diferentes problemas, principalmente su baja biodisponibilidad. La administración por vía oral de insulina solo ha logrado >10% de biodisponibilidad (Gonçalves *et al.*, 2016).

Se han estudiado diferentes estrategias mediante la encapsulación para aumentar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los fármacos proteicos. La encapsulación es el proceso de atrapamiento de una molécula bioactiva en una matriz protectora. En el caso de los fármacos de origen proteico, se han estudiado diferentes sistemas de encapsulación que permitan al péptido o proteína superar las diferentes posibles degradaciones que ocurren en el tracto digestivo. Los principales sistemas son los siguientes:

- Liposomas: Vesículas artificiales que consisten en una o más bicapas lipídicas de fosfolípidos que rodean un volumen acuoso y cuya estructura se asemeja a las membranas celulares (Chen *et al.*, 2011).
- Nanopartículas: Son sistemas formados por compuestos gelificables y coloidales, degradables o no, generalmente de polímeros naturales, sintéticos o semi-sintéticos, que contienen una sustancia activa. Existen dos subtipos de estos sistemas: nanoesferas, en donde la sustancia activa es adsorbida en la superficie, o disuelta en el interior de la partícula; y,

nanocápsulas, que son vesículas en donde el compuesto activo está en el núcleo, rodeado por una capa de polímero protector (Choonara *et al.*, 2014)

- Nanoemulsiones: Son dispersiones de aceite y agua con un tamaño de partícula de entre 20 y 500 nm, por la posibilidad de solubilizar compuestos lipofílicos e hidrofílicos es posible su utilización para una amplia gama de fármacos (Muheem *et al.*, 2016).
- Complejos: Estos consiguen la interacción directa entre las cargas del compuesto bioactivo y la matriz protectora, logrando la formación de interacciones no covalentes. Generalmente se utilizan surfactantes para la formación de complejos (Li *et al.*, 2011). En la Figura 4 se puede observar la formación de un complejo surfactante-péptido y la solubilización del mismo en un lípido.

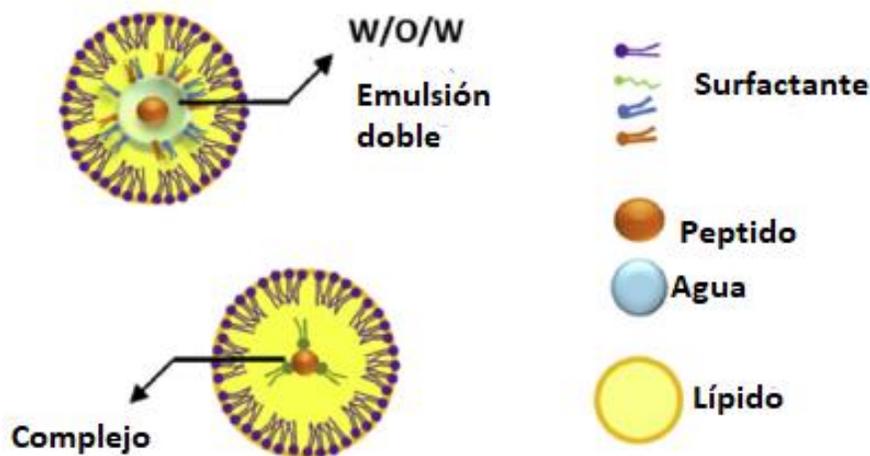


Figura 4 Ilustración de dos sistemas para la encapsulación de péptidos de interés farmacéutico (Li *et al.*, 2011).

1.4 Complejos encapsulantes de proteínas

Entre las diferentes opciones para encapsular una proteína se encuentra la formación de complejos de proteínas hidrofílicas, como la insulina, utilizando una molécula anfifílica, permitiendo la interacción de cargas entre la proteína y la molécula encapsulante. Se ha estudiado la interacción entre proteínas iónicas y las cargas iónicas opuestas de la cabeza polar de ácidos grasos, agentes surfactantes o polímeros hidrofóbicos (Sun *et al.*, 2011). Los complejos tienen la ventaja de cambiar la solubilidad de las proteínas, haciéndolas más lipofílicas cuando el complejo se realiza con fosfolípidos.

Diferentes estudios han realizado complejos con quitosano, desoxicolato de sodio, estearato, dodecilsulfato de sodio, oleato de sodio y principalmente con fosfolípidos, entre los que destacan la fosfatidilcolina de soya (Griesser *et al.*, 2017; Kuche *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012).

La utilización de fosfolípidos para la formación de complejos presenta diversas ventajas, ya que los complejos formados pueden ser administrados por vía oral, teniendo un mecanismo de absorción similar al de los nutrientes que ingresan al tracto gástrico, son biodegradables y no tóxicos (Kuche *et al.*, 2019). El mecanismo en el que actúan los fosfolípidos para formar complejos y encapsular proteínas se basa en las interacciones de las partes polares del fosfolípido con enlaces peptídicos y aminoácidos, formando puentes de hidrógeno, y la parte hidrofóbica de la molécula se encuentra hacia afuera (Zhou *et al.*, 2012).

Cabe señalar que los complejos formados entre proteínas y fosfolípidos pueden ser agregados a diversos sistemas de administración de fármacos, como las nanoemulsiones, micelas o nanopartículas, esto debido a la capacidad emulsificante que presentan los fosfolípidos, por lo que a continuación se hablará un poco más estas moléculas.

1.4.1 Fosfolípidos nativos y modificados

Como se mencionó anteriormente, los fosfolípidos tienen la capacidad de encapsular proteínas y formar complejos utilizables para la administración vía oral de la proteína encapsulada. Los fosfolípidos son moléculas de naturaleza lipídica que contienen fósforo, están presentes en todas las membranas celulares formando la bicapa. Estructuralmente son derivados del glicerol, al igual que los triglicéridos. Existen dos tipos de fosfolípidos: los esfingolípidos que tienen en el esqueleto de glicerol, esfingosina, un ácido graso y el grupo polar de fosfato; y, los glicerofosfolípidos, que están formados por una molécula de glicerol a la que están unidos dos ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2. Dichos ácidos pueden variar en la longitud de la cadena carbonada y en la insaturación. En la posición sn-3 del fosfolípido está unida una molécula de ácido fosfórico, que da un carácter polar a esta sección del fosfolípido. El ácido fosfórico a su vez se enlaza a diferentes tipos de moléculas, como la colina o la serina; estos últimos grupos dan el nombre al fosfolípido: fosfatidilcolina y fosfatidilserina (Li *et al.*, 2014).

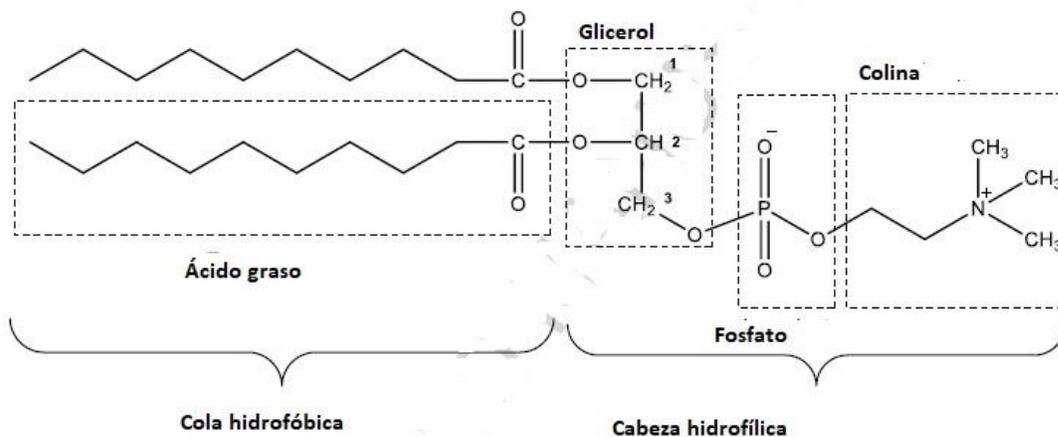


Figura 5 Estructura del fosfolípido fosfatidilcolina. La estructura básica de un fosfolípido tiene una parte polar y otra no polar, conferidas por el grupo fosfato y las cadenas de ácidos grasos, respectivamente (Li *et al.*, 2014)

Dentro de las propiedades de los fosfolípidos se encuentra su naturaleza anfifílica, que les permite actuar como emulsificantes, al tener una parte polar y una no polar, pueden interactuar para formar micelas en sistemas de agua/aceite, arreglándose de la forma más favorable de acuerdo a su polaridad. El carácter anfifílico de los fosfolípidos se puede describir en relación a su valor HLB (valor de balance hidrofílico-lipofílico), lo que indica su capacidad como emulsificante (van Hoogevest, 2017).

Los fosfolípidos tienen diferentes áreas de aplicación, actualmente se investiga su potencial como acarreadores en sistemas farmacéuticos, por ello es importante contar con fosfolípidos con las características específicas para dicha aplicación. La extracción específica de un tipo de fosfolípido resulta compleja; por ello, una alternativa para la obtención de fosfolípidos específicos es su modificación.

Los fosfolípidos se pueden modificar por vía química y/o enzimática, siendo el método enzimático el más eficiente por su especificidad; las enzimas que pueden ser usadas para la modificación de fosfolípidos las enzimas lipasas y fosfolipasas.

Las reacciones para la modificación de fosfolípidos incluyen la hidrólisis, transesterificación y transfosfatilación, siendo las enzimas lipasas y fosfolipasas las más estudiadas. Las fosfolipasas tienen un papel muy importante en la regulación celular e hidrólisis de fosfolípidos en diferentes enlaces ester, como se muestra en la Figura 6. La fosfolipasa A1 (PLA1), hidroliza los enlaces ester de la posición sn-1, la fosfolipasa A2 (PLA2) hidroliza los enlaces en la posición sn-2, Fosfolipasa B (PLB) que actúa en los enlaces que la A1 y A2, fosfolipasa C (PLC) hidroliza los enlaces fosfodiéster de la estructura del glicerol, y la fosfolipasa D hidroliza los enlaces entre el fosfato y los grupos polares (Hama *et al.*, 2015).

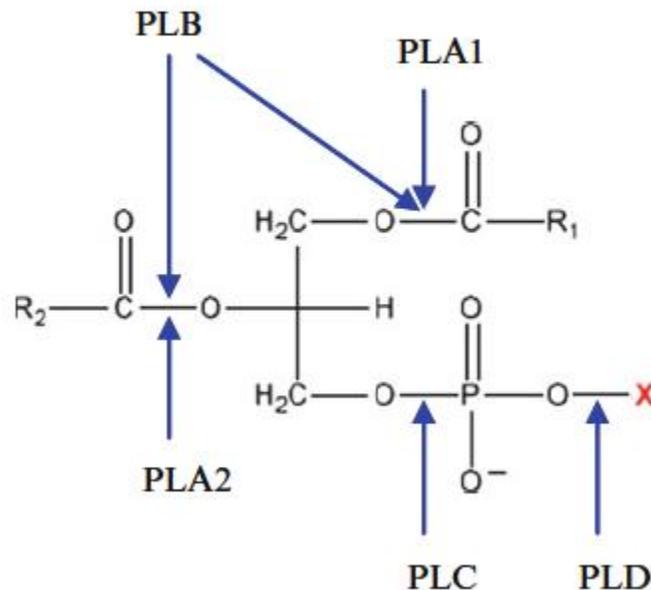


Figura 6 Enlaces en los que actúan las diferentes fosfolipasas (Aloulou *et al.*, 2012).

La transesterificación o acidólisis, es el reemplazo de los ácidos grasos originales con ácidos grasos externos. Generalmente se seleccionan ácidos grasos que sean difíciles de encontrar de forma natural en los fosfolípidos, como ácidos grasos de cadena media saturados. La reacción de acidólisis es realizada por las enzimas PLA1, PLA2 y lipasas.

1.4.2 Modificación de fosfolípidos con Ácidos grasos de cadena media

Los ácidos grasos de cadena media (AGCM) son cadenas alifáticas de 6-10 carbonos, en los aceites comestibles están presentes el ácido caproico (6:0), caprílico (8:0) y caprico (10:0). Los MCFA representan del 7.3 al 15 % de los ácidos grasos en aceites como el de coco, palma, mantequilla, leche y queso. Los ácidos grasos de cadena media han sido estudiados para ser implementados en la alimentación humana y para ayudar en el tratamiento de algunos trastornos, pues

los AGCM son absorbidos de forma directa del hígado y son utilizados como fuente de energía sin necesidad del intermediario carnitina para el ingreso a la mitocondria.

Diversos estudios han demostrado que los AGCM tienen efectos benéficos en el tratamiento del Síndrome Metabólico, principalmente se ha observado que aumenta el gasto energético postprandial después del consumo de AGCM comparado con el consumo de ácidos grasos de cadena larga. También se ha observado una disminución en el porcentaje de grasa y peso corporal después de dietas de 12 semanas en las que se consumían cantidades de 10 g de AGCM. Estudios sobre el efecto de AGCM en ratas y humanos con DM se observó que los sujetos experimentales que tenían una dieta con AGCM además de la menor acumulación de grasa, tenían mejor tolerancia a la glucosa, de igual forma se observó protección contra la lipotoxicidad y puede reducir la resistencia a la insulina en ratas con DM2 (Nagao y Yanagita, 2010).

En aplicaciones farmacéuticas, se ha estudiado el efecto de los AGCM como agentes que mejoran la permeabilidad de fármacos hidrofílicos a través las membranas. Se ha estudiado el efecto de estos ácidos grasos en el transporte a través del intestino, utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* con células Caco-2 (Lindmark *et al.*, 1998), en pruebas de permeabilidad con monocapas de Caco-2 los AGCM indujeron un rápido incremento de la permeabilidad epitelial para el paso de moléculas hidrofílicas marcadas.

En el presente trabajo los ácidos grasos de cadena media se utilizarán para modificar fosfatidilcolina de soya y con la molécula modificada se formará un complejo con la proteína insulina.

1.5 Nanoemulsiones

Una emulsión consiste en una mezcla de dos líquidos inmiscibles, generalmente aceite y agua, donde uno de los líquidos dispersos forma gotas en el otro líquido (McClements & Rao, 2011). El sistema en el que las gotas de aceite se dispersan en agua se denominan aceite en agua (O/W), los sistemas en los que gotas de agua se dispersan en aceite se llaman agua en aceite (W/O). Debido a la naturaleza inmiscible de sus componentes, las emulsiones tienden a separarse en las fases

que las forman, como efecto de distintos mecanismos como la floculación, coalescencia o maduración de Ostwald. En la Figura 7 se pueden ver los diferentes mecanismos de separación de una nanoemulsión.

En las nanoemulsiones los tamaños de glóbulo están en un rango de 20 a 200 nm (Cavazos-Garduño *et al.*, 2015). Las nanoemulsiones han servido como sistemas de liberación en diferentes formulaciones; por ejemplo, espumas, cremas, líquidos y aerosoles; así como en diversos otros productos y para numerosas aplicaciones industriales y farmacéuticas.

Los sistemas de nanoemulsiones son termodinámicamente inestables, pero cinéticamente estables. La estabilidad cinética puede ser mejorada al controlar la composición, el tamaño de partícula o incorporando estabilizadores como emulsificantes, modificadores de textura o retardantes de maduración (McClements, 2011). Esto hace que la composición típica de las nanoemulsiones incluya, además del aceite y agua, un emulsificante.

El tamaño de partícula es una de las principales propiedades a determinar al caracterizar una nanoemulsión, el tamaño de partícula influye en otras características como la apariencia de la nanoemulsión, la estabilidad y la absorción, diámetros menores a 200nm son claras y translúcidas. En una nanoemulsión los tamaños de partícula no siempre son uniformes, por lo que los resultados pueden representarse como una campana de distribución del tamaño, para nanoemulsiones estables es recomendable distribuciones monomodales o solo una campana. (McClements, 2011).

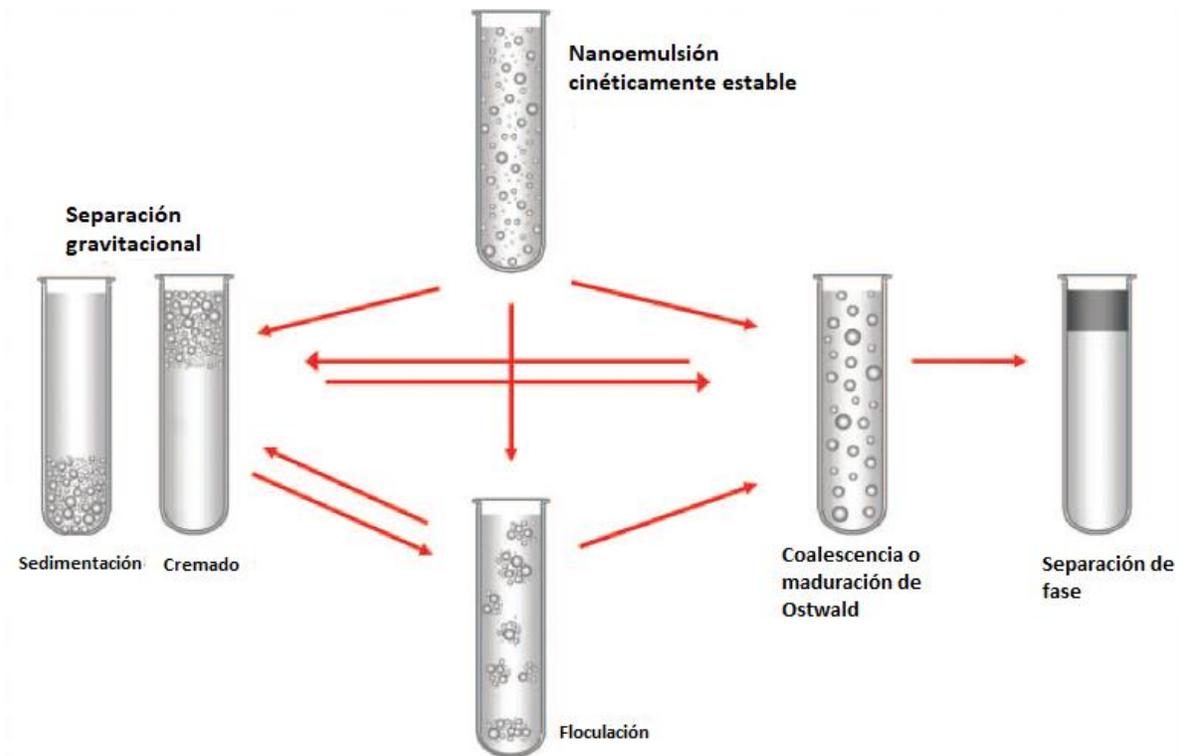


Figura 7. Mecanismos físico-químicos de ruptura de una nanoemulsión.

1.5.1 Preparación de las nanoemulsiones

Existen dos métodos principales para la preparación de nanoemulsiones; métodos de alta y de baja energía. Los métodos de alta energía utilizan equipos mecánicos capaces de generar una disruptura intensa con lo que se forman pequeñas gotas, mientras que los métodos de baja energía se basan en la alteración de la composición y las condiciones ambientales para la formación de las partículas de la nanoemulsión.

1.6.1.1 Métodos de alta energía

Los métodos de alta energía utilizan homogenizadores, equipos capaces de generar intensas energías disruptivas que pueden entremezclar las fases acuosa y oleosa hasta formar pequeñas gotas. Algunos de estos son el homogenizador de válvula de alta presión, el microfluidizador y el sonicador. Este es el método más usado para la preparación de nanoemulsiones a escala industrial, por la versatilidad de sus aplicaciones, al permitir formar emulsiones con diferentes materiales y puede

estandarizarse para garantizar tamaños de partícula homogéneos (McClements, 2011)

1.6.1.2 Métodos de baja energía

Los métodos de baja energía se basan en la formación espontánea de pequeñas gotas de aceite dentro de los sistemas mixtos aceite-agua-emulsificante, cuando la solución o las condiciones ambientales están alteradas; por ejemplo, la inversión de fases y los métodos de emulsificación espontánea.

1.6.1.2.1 Emulsificación espontánea

La emulsificación espontánea o autoemulsificación es un método de baja energía que emplea la liberación de energía química por un proceso de dilución en fase continua. Primeramente todos los componentes compatibles con agua como solvente, surfactante o cosurfactante, se mezclan para agregar la fase orgánica, los componentes oleosos; la dilución y cambio en alguna de las condiciones ambientales, generalmente la aplicación de agitación suave, produce la formación de pequeñas gotas, aumento del área interfacial y la formación de un sistema metaestable; en la Figura 8 se observa el proceso de autoemulsificación.



Figura 8 Proceso de emulsificación espontánea (McClements, 2011).

1.6 SNEDDS

Los sistemas preparados utilizando métodos de baja energía o emulsificación espontánea y que se utilizan en aplicaciones farmacéuticas se denominan sistemas auto-emulsificables de liberación de fármacos (SEDDS) o sistemas auto-nanoemulsificables de liberación de fármacos (SNEDDS). Un SNEDDS es la mezcla de la fase oleosa, surfactante, co-surfactante y compuesto farmacéutico, que forma rápidamente una nanoemulsión O/W cuando se agrega a la fase acuosa, aplicando agitación. El tamaño de glóbulo está entre 50 y 300 nm (McClements y Rao, 2011).

Los sistemas SNEDDS pueden formarse en el tracto gastrointestinal, pues las condiciones acuosas y movimientos del aparato digestivo proporcionan la fase acuosa y agitación necesaria para la auto-emulsificación. Los otros componentes del sistema incluyen a la fase oleosa, surfactantes, cosurfactantes y compuesto bioactivo.

La fase oleosa del SNEDDS puede ser acilglicérols, ácidos grasos, incluso el mismo fármaco puede ser tomado como la fase lipofílica. Los surfactantes recomendables son los de origen no iónico con un alto valor del HLB, como los glicéridos etoxilados o polietoxilados como Tween 80 o Cremophor EL. Por lo general, la concentración del tensoactivo debe oscilar entre el 30 y 60% del peso total del SNEDDS para poder lograr emulsiones estables. El co-surfactante tiene como función mejorar las propiedades de auto-nanoemulsificación y generalmente se emplean surfactantes con bajo valor del HLB; también son empleados alcoholes u otras sustancias como el glicerol (Wang *et al.*, 2009).

Los sistemas SNEDDS han sido utilizados para la administración de fármacos con baja solubilidad en agua, como los antiinflamatorios no esteroideos. De igual forma, la administración de proteínas de interés farmacéutico es un reto, debido a su cualidad hidrofílica, por lo que un SNEDDS preparado con un complejo de fosfolípido-péptido puede ser una alternativa para la administración de este tipo de fármacos (Karamanidou *et al.*, 2015). La versatilidad de los sistemas SNEDDS permiten su aplicación para la administración de una gran variedad de compuestos

activos, tanto hidrofílicos como lipofílicos, siendo sistemas con un gran potencial en la industria farmacéutica.

1.6.1 Surfactantes

Son moléculas que reduce la tensión superficial entre la fase dispersa y la continua, mejorando la estabilidad de la emulsión y brindan protección contra la agregación de las gotas. También son llamados emulsificantes o tensoactivos. En los métodos de baja energía, como la emulsificación espontánea, el surfactante facilita la formación de las pequeñas gotas (Gupta *et al.*, 2016).

Surfactantes iónicos: Son compuestos cargados, la mayoría negativamente. Estos surfactantes pueden ser usados la preparación de nanoemulsiones de baja y alta energía, pero deben limitarse a aplicaciones donde se requiera poca cantidad de compuesto, pues en grandes niveles causan irritación. Algunos de estos compuestos son alginato laúrico, DATEM, CITREM, lecitina y ácidos grasos (McClements, 2011).

Surfactantes no iónicos: Estos compuestos carecen de carga, se utilizan por su baja toxicidad e irritabilidad; además es aplicable en los dos métodos de formación de nanoemulsiones, algunos ejemplos son: sorbitan monooleato, eter de polioxietileno, Tween y Spans (McClements y Rao, 2011).

Surfactantes zwitterionicos: Poseen dos cargas opuestas, pueden tener una carga neta negativa, neutra o positiva dependiendo del pH de la solución en la que se encuentren, los fosfolípidos son uno de los más comunes surfactantes zwitterionicos; en este grupo también se encuentran las proteínas (McClements y Rao, 2011).

1.6.2. Valor HLB

El balance hidrófilo-lipófilo (HLB) es una escala desarrollada por Griffin, para determinar cuál surfactante es el adecuado para la preparación de una emulsión estable. El valor HLB es un número que indica la afinidad relativa del surfactante por la fase oleosa o acuosa; una molécula con un valor HLB alto tiene una alta cantidad de grupos hidrofílicos (Sarker, 2005).

En la Tabla 2 se pueden observar rangos de valores HLB, características y aplicaciones de los mismos. Con estos datos se puede seleccionar un surfactante con base al tipo de emulsión que se desea obtener o las características deseadas.

Tabla 2 Características y aplicaciones para valores de HLB.

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

Fuente: Cavazos 2013.

El surfactante utilizado para la formulación del SNEDDS debe poseer un HLB mayor a 12 (alta hidrofiliidad), esto permitirá que rápidamente se formen grandes gotas de aceite en la dispersión acuosa. El co-surfactante mejora las propiedades de auto-nanoemulsificación, ayudando a que las gotas reduzcan el tamaño, los co-surfactantes generalmente utilizados tienen un bajo valor HLB (1-6) (Shukla *et al.*, 2016).

Los estudios sobre sistemas SNEDDS han estado enfocándose en mejorar la absorción del compuesto farmacológico, por lo que además de mejorar las relaciones entre los componentes, se estudia la incorporación de SNEDDS en capsulas y en otros sistemas que permitan aumentar la biodisponibilidad y bioaccesibilidad del medicamento, una de estas estrategias es aumentar el tiempo de permanencia de la nanoemulsión en el organismo.

1.7 Mucoadhesión

La mucoadhesión es la interacción entre la superficie de la mucosa gastrointestinal con un compuesto. Este proceso puede aumentar el tiempo de residencia de un fármaco en el sitio de absorción y incrementando la absorción al sistema circulatorio (Makhlof *et al.*, 2011).

Existen diversos polímeros que poseen propiedades mucoadhesivas, entre ellos los polisacáridos, que son preferidos por ser seguros para el consumo humano, y se han utilizado previamente como excipientes farmacéuticos. Algunos polisacáridos mucoadhesivos son el quitosano, el alginato de sodio, las ciclodextrinas, el dextrano, la pectina, la goma xantana, la goma guar y la goma arábica.

Los compuestos mucoadhesivos pueden formar enlaces con la mucina presente en la membrana epitelial del intestino. Los enlaces pueden ser distintos, dependiendo de la estructura del mucoadhesivo, generando principalmente puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals. Es importante remarcar que los mucoadhesivos tienen diferente fuerza de adhesión de acuerdo a la carga que poseen. Generalmente se considera a los polímeros aniónicos más activos, y por ende tienen una mayor capacidad adhesiva.

La capacidad de los mucoadhesivos para aumentar el tiempo de contacto con las células encargadas de absorber los nutrientes y fármacos permite que la utilización de este tipo de compuestos para aumentar la absorción de compuestos encapsulados en nanoemulsiones, formando una capa protectora del mucoadhesivo sobre las partículas oleosas de las nanoemulsiones.

1.7.1 Alginato

El alginato es aplicado en biomedicina por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y mucoadhesividad. Estructuralmente es un co-polímero conformado por bloques de ácido β -D-manurónico (M) y ácido α -L-glucurónico (G); la secuencia de los bloques GM puede ser separada por un bloque G o estar alternados. Los bloques M son flexibles, los G son inflexibles y los bloques MG tienen una flexibilidad intermedia.

El polisacárido es extraído de algas pardas y es usualmente modificado para formar sales de amonio, potasio, sodio y calcio; dichas sales son solubles en agua. Las sales de alginato, como el alginato de sodio, forman geles cuando se mezclan con una solución de calcio, pues crean enlaces entre los bloques G de diferentes regiones del polímero (Tønnesen y Karlsen, 2002; Nur y Vasiljevic, 2017).

El alginato se ha aplicado para encapsular diferentes compuestos de interés e incluso se ha utilizado para la encapsulación de bacterias probióticas y enzimas, tanto para consumo humano como para aplicaciones industriales.

1.7.2 Goma guar

Es un polímero de D-galactosa y D-manosa extraído de *Cyamopsis tetragonolobus*. La manosa forma una cadena lineal unida por enlaces $\beta(1-4)$, a la que se unen residuos de galactosa por enlaces 1-6. Al hidratarse la goma guar forma coloides viscosos (Sinha y Kumria, 2001; Thombare *et al.*, 2016).

La goma guar ha sido utilizada como agente retardante en tabletas, en especial se ha utilizado en medicamentos para el colon, por su resistencia a las enzimas y condiciones gástricas, siendo susceptible a las bacterias del intestino grueso, haciendo que el fármaco sea liberado en el sitio que se espera. Actualmente se investiga la aplicación de la goma guar para el desarrollo de sistemas que permitan la administración de proteínas por vía oral (Prabaharan, 2011), lo que permitiría producir métodos no invasivos para más fármacos, en especial para el tratamiento de enfermedades crónicas.

1.8 Síntesis de antecedentes

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica, el principal tratamiento es la administración subcutánea de insulina, una hormona producida por el páncreas que regula la utilización de glucosa por las células. Dado que la administración de la insulina es un método invasivo, incomodo y que puede producir problemas en la piel si no se realiza adecuadamente, se ha investigado la posible administración por vías alternativas, como la vía oral. La vía oral representa un reto, pues las proteínas son degradadas en las diferentes etapas del sistema gastrointestinal. Para poder administrar proteínas por vía oral la estrategia más adecuada es encapsular la proteína en alguna matriz que la proteja de las enzimas gástricas, del pH del estómago y se pueda absorber en el intestino. Una de las formas para encapsular la proteína es formar un complejo con alguna molécula anfifílica, siendo los fosfolípidos los más utilizados y versátiles.

Las proteínas encapsuladas en complejos de fosfolípidos pueden ser incorporadas en sistemas autonanoemulsificable para la administración de fármacos, (SNEDDS), estos sistemas son nanoemulsiones conformadas por un surfactante, co-surfactante, fase oleosa y fármaco, que al estar en contacto con agua y agitación suave forman una nanoemulsión con tamaños menores a los 200 nm. Estos sistemas son estudiados para la administración de diferentes compuestos, entre los que se encuentra la insulina, al estar la proteína en un complejo con fosfolípidos es lipofílica y se puede incorporar fácilmente en la fase oleosa del sistema. Aunque estos sistemas permiten que un alto porcentaje de la proteína llegue al intestino para ser absorbida, no se ha logrado llegar a los niveles sanguíneos de insulina que sean similares a los de la inyección subcutánea. La absorción de insulina contenida en un sistema SNEDDS puede ser aumentada al utilizar un recubrimiento para las partículas oleosas, con mucoadhesivos que ayuden a aumentar el tiempo de contacto del SNEDDS con las células intestinales y con ello se aumente la absorción de insulina.

2. JUSTIFICACIÓN

La administración de insulina por vía subcutánea representa un reto para los pacientes, que requieren conocimientos y prácticas adecuadas para la correcta aplicación de las inyecciones. La aplicación continua de inyecciones subcutáneas provoca lipodistrofias, y una eventual reducción en la absorción de la insulina. La administración oral de insulina representa un método no invasivo y de fácil uso por el paciente y representa menos riesgos, así como biodisponibilidad similar a las inyecciones subcutáneas. Los sistemas SNEDDS formulados a partir de complejos de insulina-fosfolípidos modificados, y con un recubrimiento externo de mucoadhevisos son una alternativa a la administración oral de insulina que permitirá mantener la bioactividad de la proteína de forma similar a la inyección de insulina.

3. HIPÓTESIS

La incorporación de polisacáridos como mucoadhesivos a SNEDDS de complejo insulina-fosfolípido aumentarán la biodisponibilidad de la insulina, administrada por vía oral, en modelos *in vitro*, e *in vivo*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de polisacáridos en la biodisponibilidad de insulina incorporada en SNEDDS.

4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar un sistema SNEDDS formando un complejo de insulina con fosfolípidos modificados.
- Incorporar el sistema SNEDDS en una red de polisacáridos.
- Evaluar la bioaccesibilidad de la insulina en un sistema *in vitro*.
- Estudiar la posible citotoxicidad del sistema SNEDDS y la permeabilidad de la insulina en células Caco-2.
- Realizar un estudio farmacocinético del sistema en un modelo murino.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos a utilizar en este trabajo experimental fueron grado analítico o HPLC. La fosfatidilcolina de Soya con 95% de pureza fue marca Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). La fosfolipasa PLA1 Lecitase® Ultra de NOVO (Salem, VA). Ácido caprílico Cremphor EL, Goma Guar, Alginato de sodio, dimetil sulfoxido, mucina, albumina bovina, pepsina y lipasa fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El Lauroglycol FCC y Labrafil M1944CS fueron de la marca Gattefossé. El reactivo para la prueba MTS, CellTiter96 fue de la marca Promega.

5.1 Modificación enzimática de fosfatidilcolina de soya con ácidos grasos de cadena media.

5.2.1 Inmovilización de enzima PLA1 en Duolita

La inmovilización de la enzima PLA1 se realizó de acuerdo al método establecido por García *et al.* (2008). Brevemente, se pesaron 100 g del concentrado enzimático Lecitase® Ultra (1.5% de proteína) y se mezcló con un volumen en relación 1:1 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 y 50°C. Pasadas 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 y se tomaron muestras de 50 µL para la determinación de proteína libre.

5.1.1 Cuantificación de la retención de PLA1 en duolita

La determinación de la adsorción de la PLA1 en la duolita se realizó mediante la cuantificación de proteína por el método espectrofotométrico de Bradford, empleando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para la curva de calibración. Las muestras tomadas de 50 µL durante el proceso de inmovilización 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 dejó reposar por 10 minutos y posteriormente se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. (Baeza-Jiménez *et al.*, 2012; Esperón *et al.*, 2017)

5.1.2 Síntesis de fosfatidilcolina modificada (PCM) rica en AGCM a partir de fosfatidilcolina de soya

La síntesis de PCM se llevó a cabo mediante la reacción enzimática de acidólisis, en la que se utilizó la PLA1 inmovilizada. Se siguieron las condiciones de Bravo (2018), la fosfatidilcolina de soya se disolvió en hexano por medio de ultrasonificación, en una relación 1:4 de fosfatidilcolina y solvente. Una vez disuelta se llevó a reacción con 10% de enzima inmovilizada, una relación molar 1:16 de sustratos (PC:AGCM), 300 rpm y 50°C.

Para elaborar cinéticas de reacción, se tomaron muestras de 50 μL a los tiempos 0, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas de la reacción, para determinar la incorporación de los AGCM a la fosfatidilcolina.

5.1.3 Determinación de la incorporación de AGCM a la fosfatidilcolina

La incorporación de AGCM a la fosfatidilcolina de soya se analizó mediante cromatografía de gases (CG). Los ácidos grasos esterificados se derivatizaron a metil ésteres por metilación alcalina; para ello se tomaron 15 mg de la mezcla de reacción y se le incorporo 100 μL de ácido tridecanoico-metil-éster diluido en hexano (50 mg de ácido tridecanoico-metil-éster en 10 mL de hexano); posteriormente, el solvente se removió con nitrógeno. Se añadieron 2.5 mL de metóxido de sodio 0.5 N en metanol y la reacción se mantuvo a 80 °C por 10 minutos; después las muestras se enfriaron en un baño de hielo por 1 minuto. Se adicionaron 2 mL de hexano grado HPLC y se agitó para incorporar los componentes en la fase orgánica. Se agregaron 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. (Ochoa *et al.*, 2013)

Para el análisis se inyectó 1 μL 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 m X 0.25 mm X 0.25 mm). El programa de calentamiento de la columna se realizó con una temperatura inicial de 190°C por 1 minuto, seguido de una rampa de 4 °C por minuto hasta 210 °C. El tiempo de corrida de 30 minutos. El puerto de inyección se mantuvo a 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. Los cromatogramas obtenidos se analizaron para determinar la presencia de los ácidos grasos de cadena media incorporados (Esperón *et al.*, 2017).

5.1.4 Determinación del rendimiento de la reacción de acidólisis

El rendimiento de la reacción de acidólisis se determinó mediante el uso de HPLC fase normal, para lo que 2 mg de las muestras de reacción se diluyeron con 1.5 mL de hexano grado HPLC, la mezcla se pasó por filtros de nylon para jeringa de 0.45 μm . Se inyectaron 15 μL al equipo que tienen una bomba binaria Waters 1525, un inyector automático Waters 717plus y un detector UV-Visible (Waters 2487) a 203 nm y 215 nm, la columna fue Econosil Sílica 5U de fase normal (250 x 4.6 mm) de Alltech, ajustada a 40°C. La fase móvil empleada fue 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)

5.1.5 Purificación de PCM por cromatografía en columna

Para purificar la PCM se utilizó cromatografía en una columna de 560 mm de largo por 55 mm de diámetro, empacada con 600 g de sílica gel de 60-200 mesh de diámetro medio de partícula y 60 Å de diámetro medio de poro (Sigma Aldrich). La fase móvil fue cloroformo para la separación de los ácidos grasos y metanol para la de fosfolípidos (Bravo, 2018).

5.3 Elaboración del complejo insulina-PC e insulina-PCM

La formación de complejos de insulina con fosfolípido normal y modificado se realizó siguiendo el método de Zhou *et al.* (2012), utilizando insulina humana en polvo con 27 UI/mg. Para realizar el complejo se tomó una relación molar de 1:8 insulina-fosfolípido (modificado y sin modificar); cada componente se colocó en un matraz redondo y se disolvió en un solvente. Para la insulina fueron 10 mL de metanol acidificado con 0.1% de ácido trifluoroacético; y para la PC y la PCM se utilizó éter etílico en una relación 9:1.

Una vez disueltos independientemente, se mezclaron en un matraz de rotavapor, donde se eliminó con vacío todo el solvente presente. El complejo fue completamente evaporado con nitrógeno, para eliminar residuos de solventes y se dejó en vacío por 12 horas. Posteriormente se recolectó y guardó en un frasco ámbar y en refrigeración, hasta agregarse a la fase oleosa de la nanoemulsión.

5.2 Formulación de los SNEDDS

De inicio, se realizó una pre-formulación de SNEDDS considerando lo reportado por Bravo (2018), para reproducir las formulaciones con mejores comportamientos y seleccionarlas para su posterior aplicación, las pre-formulaciones se muestran en la Tabla 3. En estas SNEDDS la fase oleosa fue lauroglycol FCC, el surfactante fue Cremophor EL y el co-surfactante Labrafil M1944CS, y estuvieron libres de insulina, ya que fueron para determinar comportamientos. A las formulaciones seleccionadas se les adicionaron de 2.5 a 10 mg del complejo insulina-fosfatidilcolina.

En las SNEDDS finales, la fase oleosa se formó al mezclar el complejo insulina-fosfatidilcolina a lauroglycol FCC y los tensoactivos y co-tensoactivos mencionados anteriormente. Se mezclaron las distintas fases a 500 rpm a temperatura ambiente por 15 minutos. La mezcla final se dispersó en buffer de fosfato 0.1 M, pH 6.8, a 50 rpm, con lo que se formó el sistema SNEDDS. Este sistema se caracterizó al medir tamaño de partícula, y se realizó un diagrama de fases ternario con el software

SigmaPlot, para determinar las formulaciones en la zona de emulsificación espontánea.

Tabla 3 Formulaciones para la preparación de SNEDDS

Formulación	Fase oleosa Lauroglycol FCC (mg)	Surfactante Cremophor EL (mg)	Co-surfactante Labrafil M1944 (mg)
1	100	300	150
2	100	300	250
3	100	500	150
4	100	500	250
5	100	700	150
6	100	700	250
7	300	300	250
8	300	500	250
9	500	500	250
10	500	700	50
11	500	700	150
12	500	700	250

5.4 Incorporación de mucoadhesivos

Los polisacáridos mucoadhesivos se disolvieron en buffer de fosfato de pH7. La relación final del sistema fue 1:1 de solución de polisacáridos y SNEDDS. Se mezclaron las soluciones a 500 rpm y temperatura ambiente por 30 minutos; finalmente se ajustó el pH a 3 para promover la absorción de los polímeros mucoadhesivos. Para esta etapa experimental se llevó a cabo un diseño 2³, del cual los factores y niveles se muestran en la Tabla 4, mientras que en la Tabla 5 se muestran los tratamientos desarrollados.

Tabla 4 Factores y niveles del diseño experimental para la incorporación de polisacáridos a SNEDDS.

Factores	Niveles
Fosfolípido	Modificado (M) Sin modificar (S)
Alginato	0% 0.05%
Goma guar	0% 1%

Tabla 5 Tratamientos del diseño experimental

Tratamiento	Fosfolípido	Alginato	Goma guar
1	S	0%	0%
2	S	0%	1%
3	S	0.05%	0%
4	S	0.05%	1%
5	M	0%	0%
6	M	0%	1%
7	M	0.05%	0%
8	M	0.05%	1%

5.5 Caracterización de las SNEDDS

5.5.1 Tamaño y distribución de tamaño de partícula.

El tamaño de glóbulo y la distribución se determinó mediante la técnica de dispersión de luz dinámica utilizando un equipo Zetasizer Nano–ZS90 (Malvern Instruments), con un intervalo de detección de 0.3 nm a 5 μm , acorde a la norma ISO 13321:1996. Se tomaron 50 μL de la emulsión y se diluyeron en 1 mL de agua milli-Q y se colocaron en una celda para ser leído el tamaño del glóbulo. Se midió el tamaño y dispersidad de los glóbulos de los sistemas, antes y después de la incorporación de los polisacáridos

5.5.2 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). Para llevarlo a cabo 40 μL del SNEDDS se diluyeron en 1 mL de agua milli-Q y se llevaron a una celda. Se midió el potencial de los sistemas antes y después de la incorporación de los polisacáridos.

5.6 Bioaccesibilidad *in vitro*

Se estudió el efecto de las condiciones gastrointestinales sobre los sistemas SNEDDS. Para ello los sistemas se introdujeron en un sistema de simulación gástrico *in vitro* en las condiciones establecidas por Sarkar *et al.* (2009) y McClements y Li (2010). El sistema que consiste de dos reactores: en el primero se simulan las condiciones de boca y estómago y en el segundo las del intestino delgado; una bomba de infusión para agregar las soluciones simuladoras de fluidos gástricos, parrillas de agitación para proporcionar la temperatura y movimientos peristálticos. En la Figura 9 se puede observar el proceso general que se llevó a cabo para el análisis, el tiempo de retención en cada etapa y las condiciones. La composición de las soluciones simuladoras de los fluidos gastrointestinales se muestra en la Tabla 6. Al finalizar cada etapa se tomó una muestra y se analizó el

tamaño de partícula; al finalizar la simulación del intestino delgado se midió la cantidad disponible de insulina en la solución, para estimar el valor de bioaccesibilidad. La insulina se midió mediante la prueba ELISA para insulina.

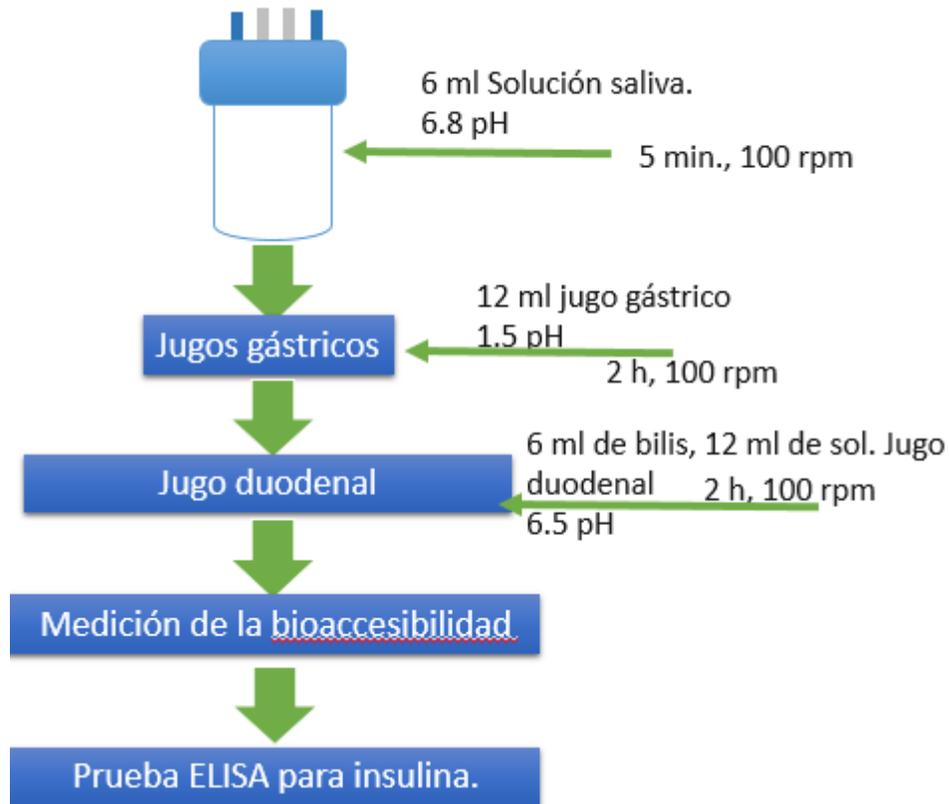


Figura 9 Secuencia y condiciones de la evaluación *in vitro*.

Tabla 6 Composición de las soluciones simuladoras de fluidos gástricos ((Sarkar *et al.*, 2009)

Saliva		g/L	Estómago		g/L	Intestino		g/L
Cloruro de sodio	NaCl	1.594	Cloruro de sodio	NaCl	2	Sales biliares		46
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	0.328	Ácido clorhídrico	HCl	7	Cloruro de calcio	Ca ₂ Cl	110
Fosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	0.636	Pepsina		3.2	Cloruro de sodio	NaCl	5
Cloruro de potasio	KCl	0.202				Lipasa		15
Citrato de potasio	K ₃ C ₆ H ₅ O ₇ H ₂ O	0.308						
Urea	H ₂ NCONH ₂	0.198						
Sal sódica de ácido láctico	C ₃ H ₅ O ₃ Na	0.146						
Mucina		0.3						

5.7 Citotoxicidad en células Caco-2

Para la prueba de citotoxicidad se siguió la metodología expuesta por García-Varela *et al.* (2016). Brevemente, se utilizó el reactivo MTS, una sal de tetrazolio que se reduce en presencia de metasulfato de fenazina. La prueba se realizó en placas de 96 pocillos. Los sistemas SNEDDS en diferentes concentraciones se pusieron en contacto directo con las células Caco-2 cultivadas previamente y se incubaron por 48 horas. La absorbancia se midió a 490 nm, 1 hora después de agregar el reactivo MTS. Se determinó el porcentaje de viabilidad celular.

5.8 Prueba de permeabilidad en células Caco-2

La prueba se llevó a cabo según la técnica Zhang *et al.* (2012), utilizando células Caco-2. El establecimiento de la monocapa celular en la membrana porosa de las

placas Transwell se realizó en las condiciones indicadas por van Breemen y Li (2005). Una vez establecida la monocapa que simula la monocapa intestinal humana, se pusieron en contacto con el SNEDDS en el compartimento superior de la placa que se muestra en la Figura 10. Las placas se mantuvieron en agitación y se tomaron muestras del permeado que se encontraba en el compartimento inferior para realizar una cinética de permeabilidad durante 6 horas. Al material que pasó por la membrana se les analizó con ensayo ELISA para determinar la cantidad de insulina que logró atravesar las células.

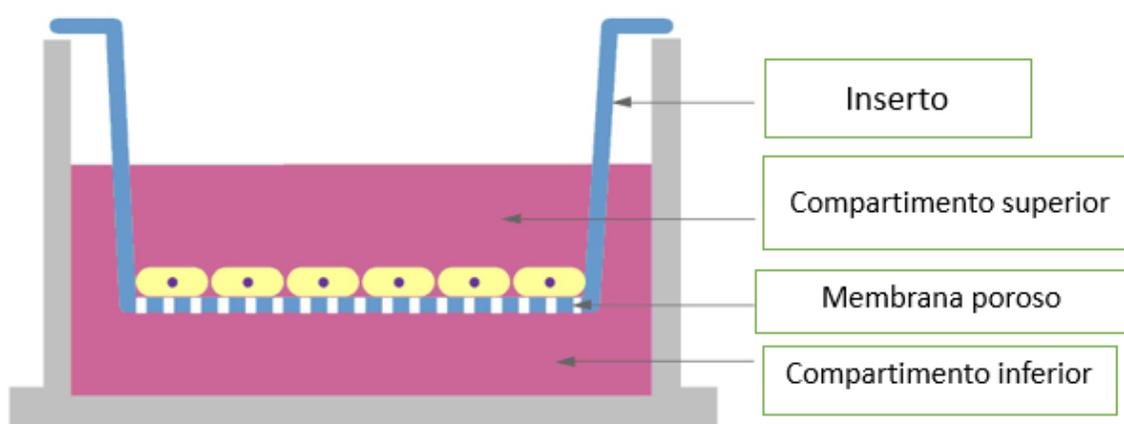


Figura 10. Esquema de las partes de la placa Transwell para pruebas de permeabilidad (Corning™).

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

Las ratas Wistar macho con una edad de 11 semanas se obtuvieron del bioterio de La Universidad Cristóbal Colón Campus Calasanz en cajas de prolipropileno y se transportaron hasta el bioterio de experimentación del Laboratorio de Química de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Durante su estancia los roedores se mantuvieron bajo las condiciones señaladas por la Norma Oficial Mexicana-NOM-062-ZOO-1999; cada roedor estuvo en una jaula individual, la alimentación fue con alimento peletizado de la marca Teklad Global Rodent Diets y agua *ad libitum*; la temperatura del bioterio se mantuvo en $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se proporcionaron ciclos

de luz y oscuridad de 12 horas. Diariamente se revisó que las condiciones ambientales se mantuvieran y se realizó la limpieza de las jaulas. El periodo de adaptación al bioterio fue de 7 días desde la llegada de los roedores. Se monitoreó el peso de los roedores al final del periodo de adaptación.

Al término de la semana de adaptación, a cada animal le fue administrada una dosis única de estreptozotocina por vía intraperitoneal de 55 mg.Kg^{-1} de peso corporal, empleando un volumen de $0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$ de peso corporal. Las soluciones de estreptozotocina fueron preparadas antes de su utilización, disolviendo la cantidad necesaria del compuesto en amortiguador citrato de sodio 100 mM , $\text{pH } 4.5$.

Para evitar la muerte de los roedores por hipoglicemia, producto de la acción de la estreptozotocina, se proporcionó agua con un 15% de glucosa por 24 horas; después de este tiempo se reanudó la alimentación normal. Se monitoreó la variación de niveles de glucosa y peso antes y 6 días después de la inducción de diabetes.

El nivel de glucosa en sangre de los animales se cuantificó mediante el método enzimático GOD-POD (Kit Bio-Glucosa MEXLAB). Las muestras sanguíneas de $200 \mu\text{L}$ se extrajeron mediante la técnica de corte de cola y recolectaron en microtubos eppendorf de 1.5 mL . Después de 20 min de reposo, las muestras ya coaguladas se centrifugaron a 5500 rpm por 5 min a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ para separar el plasma del paquete globular y se almacenaron a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su utilización. Una muestra de $10 \mu\text{L}$ de plasma se mezcló con 1 mL del reactivo GOD-POD e incubó 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 del kit de determinación; los valores se expresaron en mg/dL .

Para evaluar la biodisponibilidad de la insulina cargada en las SNEDDS, se formaron 7 grupos de ratas Wistar diabéticas con 3 individuos cada uno. Las ratas tuvieron un ayuno de 12 horas antes del tratamiento y durante las 8 h 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

subcutánea a una concentración de 2 UI/kg, al grupo 3 se le administró insulina libre a concentración de 50 UI/kg. Los tratamientos SNEDDS desarrollados fueron preparados a una concentración de 50UI/kg de insulina, y se administraron los tratamientos T2, T3, T6 y T7 en un volumen de 2.5 mL utilizando una cánula. Después de la administración de los tratamientos se tomaron muestras de sangre desde el tiempo 0, 1, 2, 4, 6 8 h después de la administración del tratamiento. Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior evaluación con un kit ELISA para insulina (Mexlab) y determinación de glucosa.

Una vez calculados los valores de glucosa e insulina se determinó el porcentaje disminución de glucosa mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nivel de glucosa} = \left(\frac{\text{Nivel de glucosa medido}}{\text{Nivel de glucosa inicial}} \right) \times 100$$

Donde el nivel de glucosa inicial es el determinado al tiempo 0 y nivel de glucosa medido es la cantidad determinada al tiempo al que se quiera determinar el nivel de reducción. El porcentaje de biodisponibilidad de la insulina se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%BD = \left[\frac{(AUC_{oral})(Dosis_{s.c})}{(AUC_{s.c})(Dosis_{oral})} \right] \times 100$$

Donde:

AUC_{oral} es el área bajo la curva de insulina del tratamiento a evaluar

$AUC_{s.c.}$ es el área bajo la curva de la cantidad de insulina subcutánea

$Dosis_{oral}$ dosis de insulina oral administrada, 50 UI/kg

$Dosis_{s.c}$ dosis de insulina subcutánea administrada 2 UI/kg

6. RESULTADOS

6.1 Modificación enzimática de la fosfatidilcolina de soya con ácidos grasos de cadena media.

6.1.1 Inmovilización de PLA1

El soporte utilizado para la inmovilización de la enzima fue Duolite A568, una resina polimérica de intercambio aniónico. Se realizó una cinética de 12 horas y se calculó la adsorción de la enzima en el soporte por el método de Bradford (1976). Se tomó una muestra del sobrenadante en diferentes tiempos de la cinética, y se midió la cantidad de proteína que no fue retenida. La cinética se muestra en la Figura 11. Previamente se obtuvo una curva de calibración con albúmina, que se encuentra anexa. La máxima incorporación se logró a las 8 horas y fue del 95.4%, absorbiendo 40 mg/mL de PLA1, ya que se partió de esa concentración inicial. Trabajos anteriores muestran incorporaciones similares, como Garcia *et al.* (2008), quienes alcanzaron la inmovilización del 70% de PLA1 de una suspensión con concentración de 75 mg/mL. De igual forma Ochoa *et al.* (2013) lograron inmovilizar el 61% y 46 mg/mL. Las diferencias en el porcentaje de inmovilización se deben mayormente a la concentración inicial de enzima.

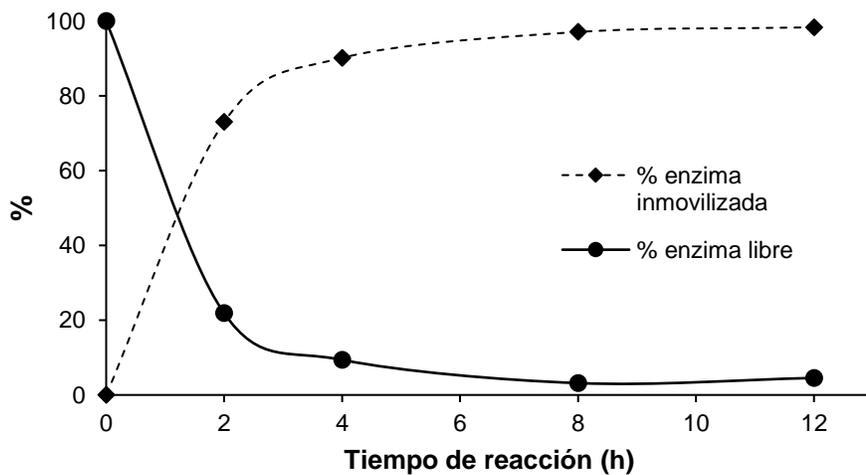


Figura 11 Cinética de inmovilización de enzima PLA1 en Duolite A568

6.1.2 Síntesis de fosfatidilcolina modificada (PCM) rica en AGCM a partir de fosfatidilcolina de soya

La enzima inmovilizada se utilizó en la reacción de modificación de fosfatidilcolina de soya (PC), previamente fue secada. La reacción se llevó a cabo de acuerdo a lo mencionado en la sección de Materiales y Métodos. Cada gramo de PC utilizada se disolvió en 4 mL de hexano, ácido caprílico en relación molar 1:16 respecto a la PC, temperatura de 50°C, 10% de enzima inmovilizada y agitación orbital de 300 rpm. Se realizó una caracterización de la PC para determinar los ácidos grasos presentes. Los resultados obtenidos mostraron la siguiente composición: ácido palmítico (C16:0) 12.89%, ácido esteárico (C18:0) 3.02%, ácido oleico (C18:1 n-9) 9.07%, ácido vaccénico (C18:1 n-7) 1.69%, ácido linoleico (C18:2 n-6) 66.51%, ácido α -linolénico (C18:3 n-3) 6.83%.

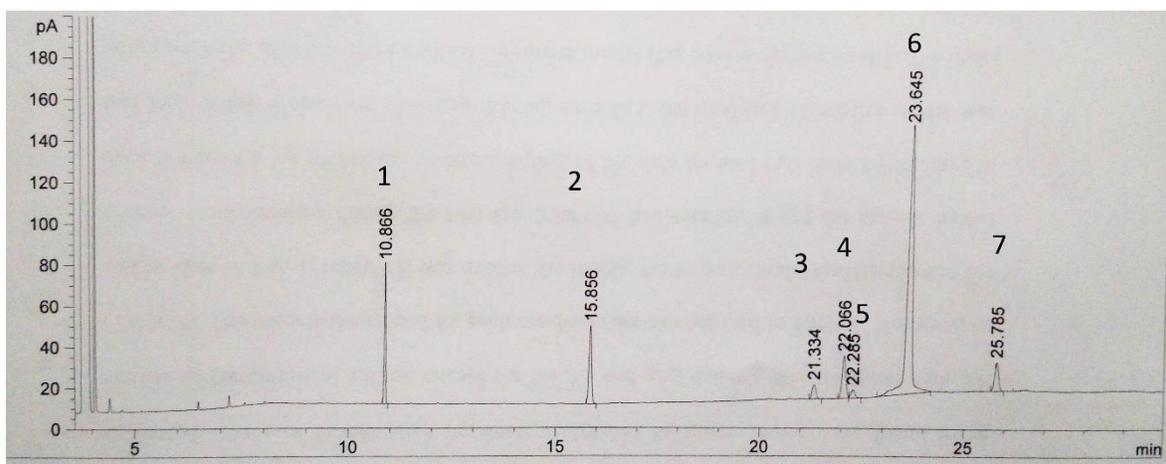


Figura 12 Perfil de ácidos grasos esterificados de PC: 1)13 estándar interno, 2)16:0, 3) 18:0, 4)18:1 n-9, 5)18:1 n-7, 6)18:2 n-6, 7) 18:3 n-3.

6.1.3 Determinación de la incorporación de AGCM a la fosfatidilcolina

Se tomaron muestras de la reacción de modificación en los tiempos 0, 4, 12, 24 y 48 horas. Las muestras se derivatizaron a metilesteres para inyectarlas al cromatógrafo de gases, de acuerdo a la metodología marcada anteriormente. En la

Figura 14 se muestra el perfil de ácidos grasos de la PCM: el pico 1 es el correspondiente al ácido graso de cadena media incorporado. El mayor porcentaje de incorporación de AGCM se logró a las 24 horas, como se muestra en la Figura 13, siendo del 49.69 % en relación molar. Este rendimiento es mayor a los reportados por Vikbjerg *et al.*, (2006) de 27.3-37%, quienes realizaron el enriquecimiento con el mismo ácido graso que en este trabajo, pero utilizaron la enzima PLA2. Trabajos en los que se utilizó la enzima PLA1 como Ochoa *et al.* (2013) y Garcia *et al.* (2008) muestran resultados de incorporación entre 37-41% en relación molar. La diferencia entre los resultados bibliográficos y los obtenidos se deben a la utilización de un medio con solvente, ya que en presencia del hexano puede ocurrir un fenómeno de migración de grupos acilos, que permite la incorporación del ácido graso en las posiciones sn-1 y sn-2 de la molécula de PC. Esto coincide con lo reportado por Bravo (2018), quien obtuvo un rendimiento del 57.44%, ya que las condiciones de reacción fueron iguales. También es importante señalar que en el presente trabajo se utilizó una menor cantidad de enzima y el mismo tiempo de reacción que en el trabajo de Ochoa, donde se utilizó 16% de enzima y se obtuvo una incorporación menor.

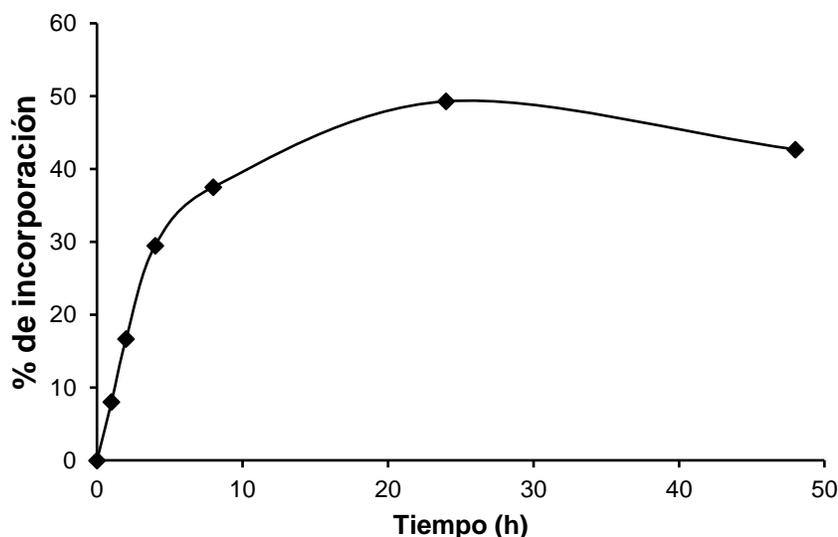


Figura 13 Porcentaje molar de incorporación de AGCM en PC

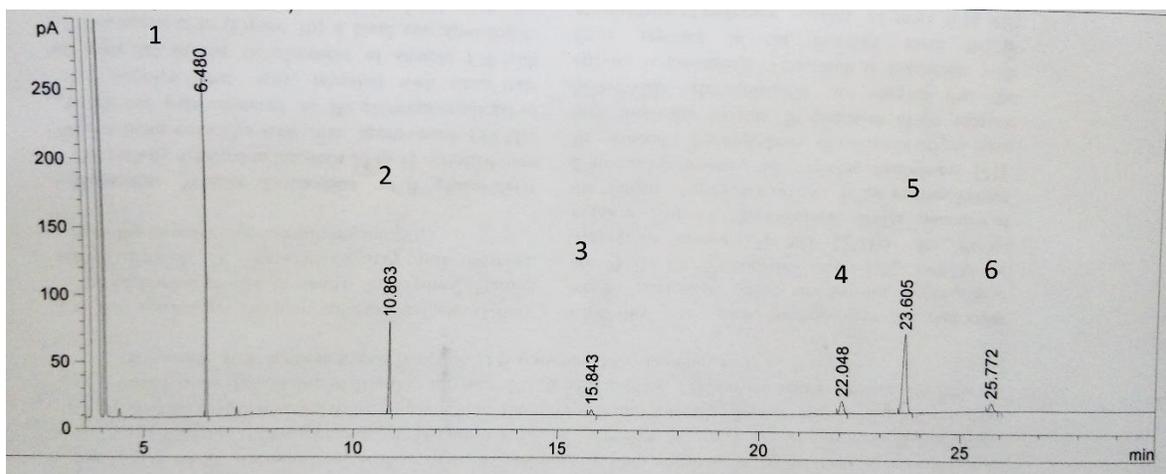


Figura 14 Perfil de ácidos grasos esterificados de PCM: 1) C8:0, 2) C13:0 estándar interno, 3) C16:0, 4) C18:0, 5) C18:2 n-6, 6) C18:3 n-3.

6.1.4 Determinación del rendimiento de la reacción de acidólisis

El rendimiento de modificación de PC a PCM se determinó por HPLC de acuerdo al apartado de Materiales y Métodos; la máxima modificación se obtuvo a las 24 h, con 47.7%; esto se puede observar en la Figura 15. Se realizó una curva de calibración de PC para las determinaciones de rendimiento, en las Figura 16 y Figura 17 se muestran los cromatogramas de HPLC del tiempo inicial y final de la reacción, donde se observa la formación de PCM y de lisofosfatidilcolina. El rendimiento de la reacción fue mayor a los reportados por Ochoa, García y Vikbjerg, pero es menor al reportado por Bravo, lo cual puede deberse a la edad de la enzima utilizada y la posición en la que se inmovilizó, ya que aunque se inmovilizó una mayor cantidad de enzima, los sitios activos podrían no estar disponibles para realizar la reacción, explicando de esta forma que el rendimiento no sea el mismo (Hama *et al.*, 2015).

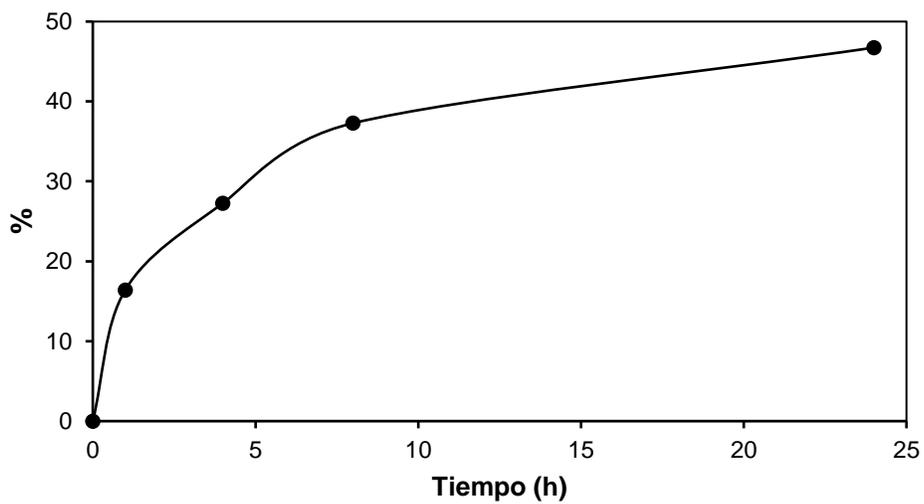


Figura 15 Rendimiento de la cinética de modificación de PC

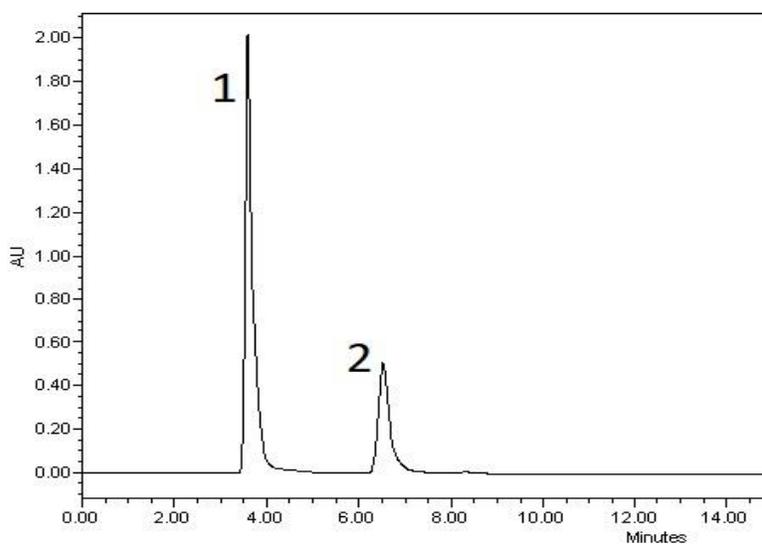


Figura 16 Cromatograma inicial de la cinética de reacción de acidólisis, 1) AGCM, 2) PC

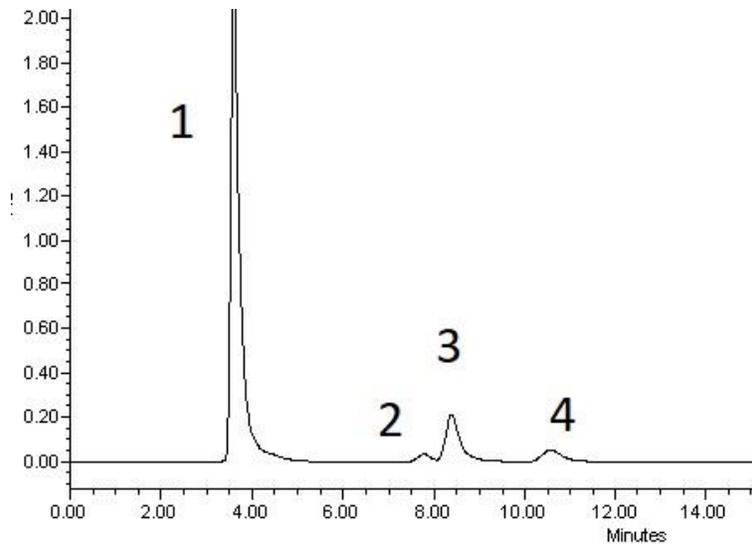


Figura 17 Cromatograma inicial de la cinética de reacción de acidólisis, 1) AGCM, 2) PC, 3) PCM, 4) Lisofosfatidilcolina

6.1.5 Purificación de PCM por cromatografía en columna

Se obtuvieron 14 g de PCM y 45.4 g de ácidos grasos después de la evaporación del solvente con rotavapor, recuperando un 80% de la PCM.

6.3 Complejo insulina-fosfolípido

Se preparó un complejo de PC y PCM. Después de la eliminación de solvente y secado se obtuvo el complejo, con un 90% de atrapamiento de insulina. Este valor difiere del obtenido por Zhou *et al.* (2012), debido al tipo de fosfolípido utilizado, ya que en el presente estudio se utiliza un fosfolípido modificado enzimáticamente, lo que podría generar inestabilidad al tener de ácidos grasos de diferentes tamaños, o requerir condiciones diferentes de solubilidad (Hama *et al.*, 2015) .

6.2 Formulación de SNEDDS

Siguiendo las formulaciones descritas por Bravo (2018) para la preparación de SNEDDS, se procedió a probar las que produjeron tamaños de partícula menores y comportamiento monomodal. Se probaron 12 sistemas: los factores como la estabilidad, la capacidad de solubilización de los surfactantes en agua para una auto nanoemulsificación eficiente, una relación surfactante/co-surfactante se consideraron en la formulación y selección de los SNEDDS. Para ello se obtuvo el diagrama de fases ternarias que se muestra en la

Figura 18. El diagrama de fases ternarias se relacionó con la distribución del tamaño de partícula y la emulsificación espontánea de los sistemas formulados. Se observaron sistemas que formaban nanoemulsiones espontaneas monomodales, y sistemas con dificultad de solubilización que formaban nanoemulsiones multimodales. Los sistemas que presentaron una mayor cantidad de surfactante en la relación entre surfactante/co-surfactante, fueron los que tuvieron una autonanoemulsificación más rápida. La cantidad de fase oleosa no tuvo influencia en la formación de la nanoemulsión. Esto es coincidente con lo reportado por Tran et al., (2016) y por Kassem et al., (2016), donde se observó que la relación surfactante/co-surfactante influye directamente en la formación de la nanoemulsión y en el tamaño de partícula, el aumento en el co-surfactante disminuye la emulsificación. Al igual que en los estudios mencionados, en el presente no se observó influencia directa de la fase oleosa en la emulsificación.

Los SNEDDS en el área de nanoemulsiones multimodales se descartaron porque esta distribución puede producir coalescencia y baja estabilidad en la nanoemulsión

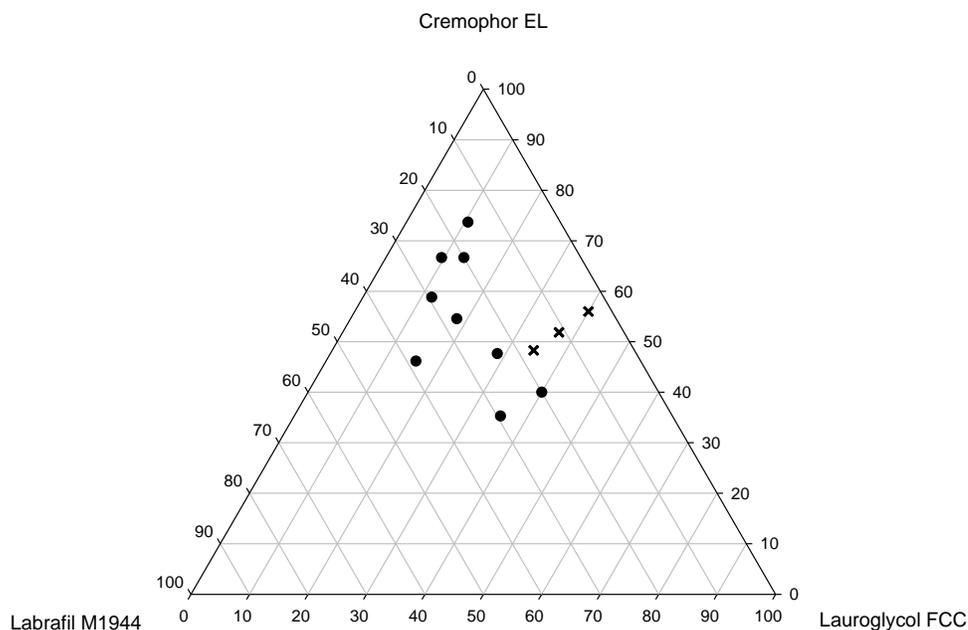


Figura 18 Diagrama de fases ternaria. Los puntos indican zonas de emulsificación espontánea con comportamientos monomodales. Las cruces indican áreas donde no se produjo la emulsificación espontánea.

El tamaño de partícula, D90 y PDI de 9 sistemas monomodales seleccionados del diagrama de fases ternarias, se muestran en la Tabla 7. Estos datos coinciden con los reportados por Bravo-Alfaro (2018). Aquellos tratamientos con los mejores resultados fueron seleccionados para agregar el recubrimiento mucoadhesivo. Para la siguiente etapa del estudio, se seleccionaron los sistemas 2, 6 y 9, debido a su tamaño de partícula y valores de PDI más pequeños (Ochoa *et al.*, 2016) y diferentes composiciones, que nos permitieron observar su comportamiento en la incorporación de mucoadhesivos. La distribución de tamaño de partícula monomodal de estos sistemas se muestra en la Figura 19.

Tabla 7 Tamaños de partícula de pre-formulaciones de SNEDDS

Sistema	Tamaño promedio (nm)	D90 (nm)	PDI
1	23.53 ± 0.92 ^a	27.36 ± 0.39 ^a	0.17 ± 0.05 ^c
2	27.90 ± 1.07 ^b	33.95 ± 1.98 ^b	0.08 ± 0.01 ^d
3	22.43 ± 0.61 ^a	25.11 ± 0.27 ^a	0.23 ± 0.02 ^b
4	21.59 ± 0.86 ^a	26.03 ± 0.94 ^{ad}	0.12 ± 0.03 ^{cd}
5	21.85 ± 1.02 ^a	24.1 ± 0.43 ^c	0.37 ± 0.03 ^a
6	18.56 ± 0.51 ^c	22.43 ± 0.87 ^{cd}	0.10 ± 0.01 ^d
7	43.71 ± 1.52 ^d	50.53 ± 3.17 ^e	0.13 ± 0.01 ^{cd}
8	26.97 ± 1.72 ^b	31.43 ± 2.68 ^b	0.17 ± 0.03 ^c
9	33.66 ± 1.37 ^e	39.68 ± 2.76 ^f	0.11 ± 0.02 ^{cd}

Valores reportados de media ± desviación estándar (n=6). Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05). El valor D90 significa que el 90% de las partículas tiene un tamaño inferior a dicho valor. El Índice de Polidispersidad (PDI) es el coeficiente entre la desviación estándar del tamaño de partícula y el tamaño promedio.

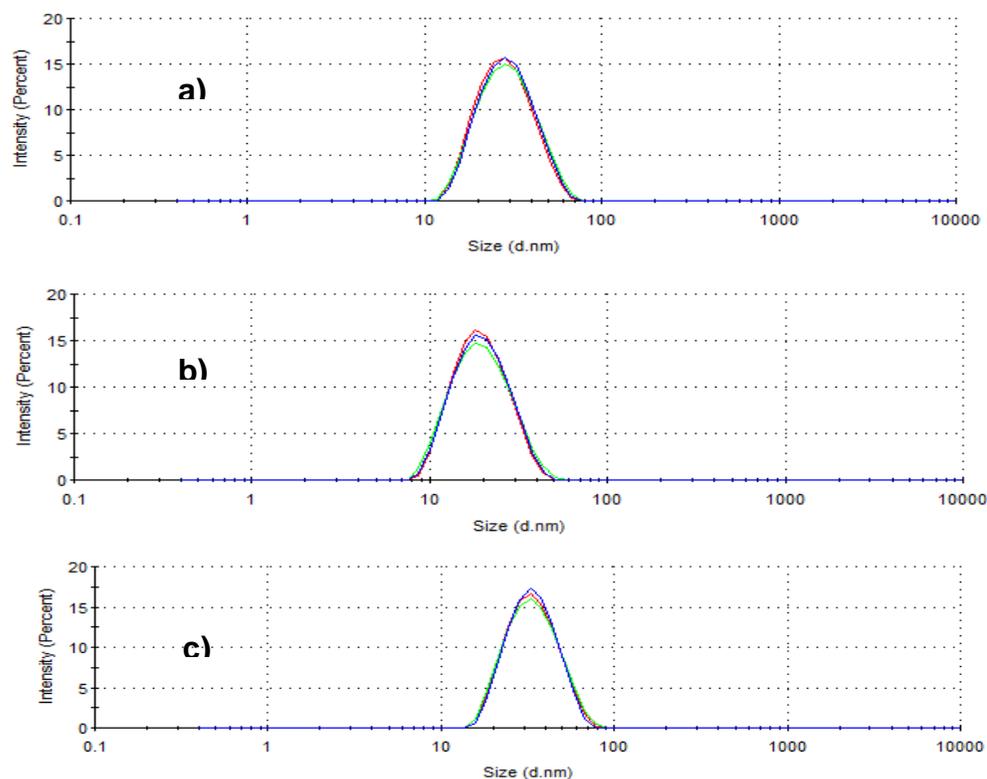


Figura 19 Comportamiento monomodal del sistemas seleccionados; a) sistema 2, b) sistema 6 y c) sistema 9.

6.4 Incorporación del complejo insulina-fosfolípido en SNEDDS

Para determinar la capacidad de solubilidad del complejo en la fase oleosa (Labarafil M1944 CS), se probaron porcentajes de 2.5, 5 y 10% de complejo. Esta prueba se realizó en el sistema 2, a diferencia de lo reportado por Bravo (2018), se tiene una solubilidad hasta el 10%, aunque el tamaño de partícula aumentó con el porcentaje de complejo incorporado, se obtuvieron tamaños por debajo de 100 nm y comportamientos monomodales. Dicha diferencia se puede atribuir al método con el que se preparó el complejo, pues en el trabajo de Bravo el complejo se hizo mediante liofilización, teniendo que utilizar varios ciclos de congelado para lograr el complejo final, con lo que se pudo generar un complejo de mayor tamaño. En la Figura 21 se observa el efecto en el tamaño de partícula y su distribución en cada porcentaje de complejo. A pesar de que el tamaño de partícula no difiere significativamente, en el porcentaje más alto se observó sedimentación (Figura 20)

y la campana de distribución con menor repetitividad. Se decidió utilizar 2.5% de complejo, por haber generado el menor tamaño de partícula.

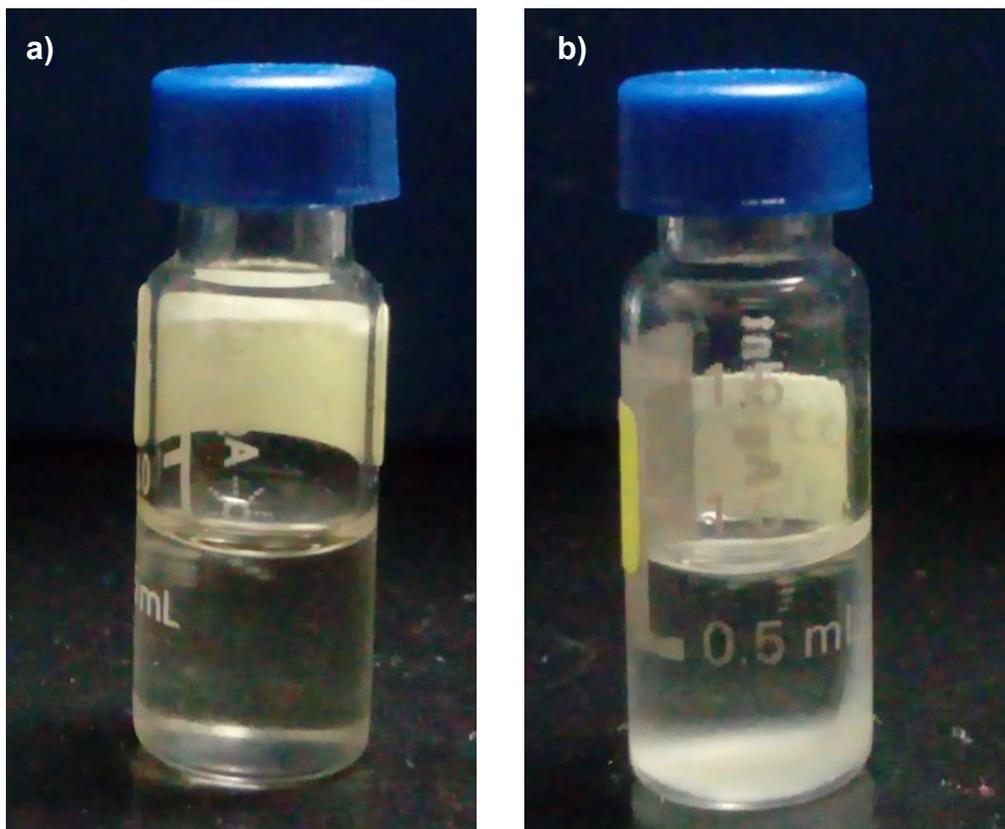


Figura 20 Sistema con a) 2.5 % de complejo y b) 10% de complejo. Se observa el sedimento en la concentración más alta de complejo.

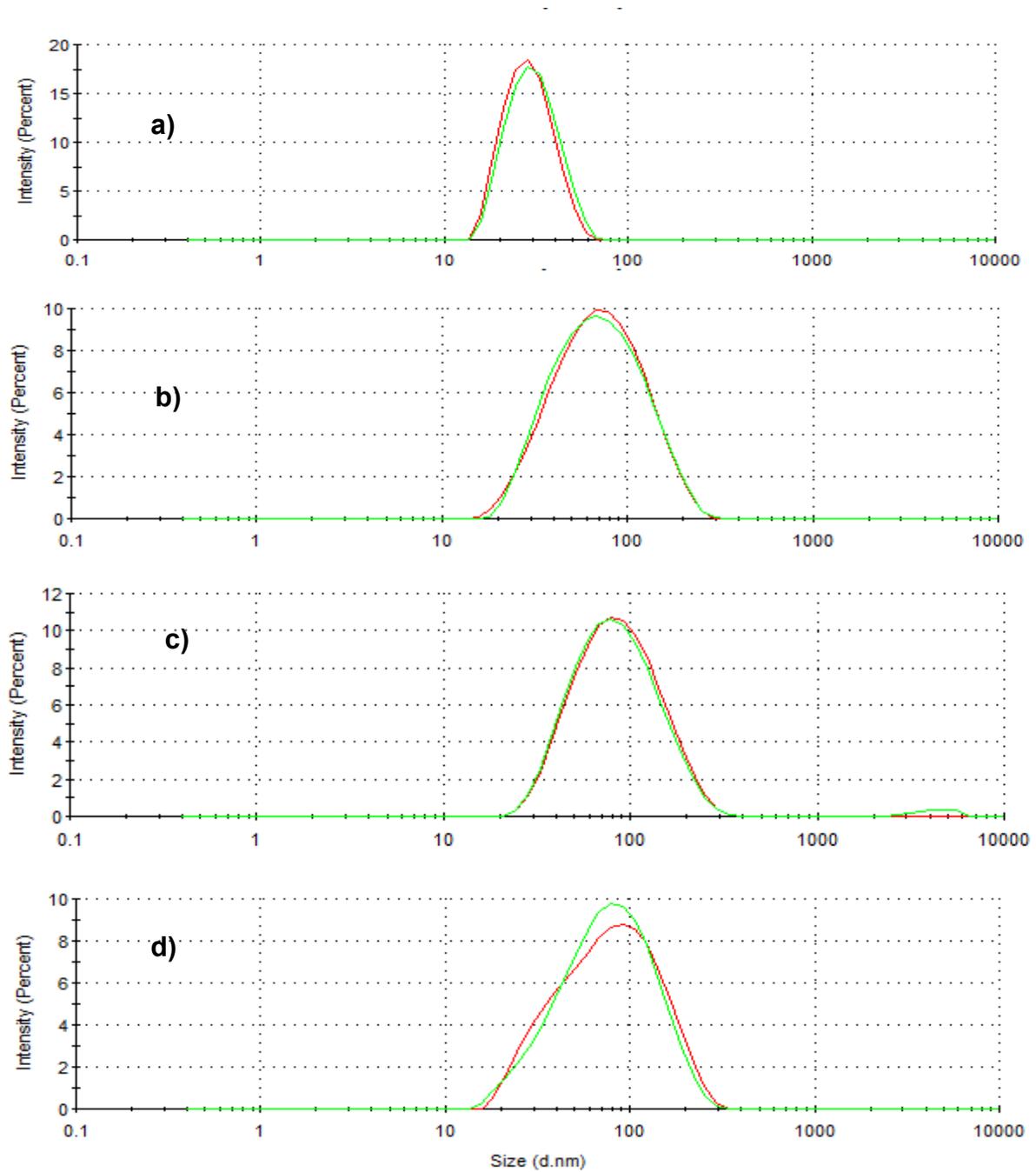


Figura 21. Efecto del porcentaje de complejo en la fase oleosa sobre el tamaño de partícula, a) tamaño previo a la adición del complejo, b) 2.5% de complejo PCM c) 5% de complejo PCM d) 10% de complejo PCM.

6.5 Incorporación de mucoadhesivos en sistemas SNEDDS

De acuerdo a lo mostrado en la sección de materiales y métodos, se estudiaron diferentes tratamientos. Se puede observar un aumento en el tamaño en comparación con los sistemas libres que se muestran en la Tabla 8; este aumento se atribuye al recubrimiento generado cuando se agregaron mucoadhesivos a la superficie de las partículas de aceite de nanoemulsión; consistente con los datos reportados por Choi *et al.* (2011). El sistema 6 (S6) no mostró un aumento considerable en el tamaño promedio o D90, lo que significa que este sistema no logró la incorporación de polisacáridos, posiblemente debido a su composición, que contiene una alta cantidad de Cremophor EL, que genera diferentes interacciones o repulsiones entre el carboxilo. Grupos en los polisacáridos y en la superficie de las partículas. Los datos corresponden al informe de Guzey y McClements (2006). Por este motivo se descartó el S6. El sistema 9 (S9) también se descartó porque produjo tamaños de partículas y valores D90 de alrededor de 100 nm.

El sistema 2 (S2) se empleó para realizar pruebas digestivas agregando el complejo de PC y PCM. Se eligió este sistema porque requería la relación más baja de surfactante y co-surfactante y tenía un valor bajo de PDI, lo que aseguraba tamaños de partículas menos dispersos. Los tratamientos 4 y 8 fueron rechazados porque produjeron distribuciones de tamaño bimodal, en las que el segundo pico (2000 nm) representaba el 3% de las partículas.

Tabla 8 Caracterización de sistemas con polisacáridos

Tratamiento	Tamaño promedio (nm)	D90 (nm)	PDI
S2 T1	27.90 ± 1.07 ^{fg}	33.95 ± 1.98 ^a	0.08 ± 0.01 ^a
S2 T2	80.70 ± 0.36 ^c	83.2 ± 1.82 ^a	0.10 ± 0.01 ^a
S2 T3	57.10 ± 2.31 ^d	67.06 ± 2.72 ^a	0.16 ± 0.02 ^b
S2 T4	47.50 ± 0.19 ^e	99.7 ± 2.09 ^a	0.20 ± 0.01 ^b
S2 T5	28.97±0.21 ^{fg}	27.36 ± 0.25 ^a	0.16 ± 0.06 ^b
S2 T5	82.96±0.35 ^c	82.77± 2.74 ^a	0.17 ± 0.04 ^b
S2 T7	58.78±0.88 ^d	67.06 ± 2.72 ^a	0.18 ± 0.05 ^b
S2 T8	49.08±4.19 ^e	53.1 ± 2.080 ^a	0.24 ± 0.06 ^b
S6 T1	18.56 ± 0.51 ^h	22.43 ± 0.87 ^a	0.10 ± 0.01 ^a
S6 T2	31.80 ± 5.32 ^f	24.6 ± 1.71 ^a	0.49 ± 0.015 ^c
S6 T3	21.54 ± 0.21 ^{gh}	25.7 ± 0.26 ^a	0.15 ± 0.01 ^b
S6 T4	23.04 ± 0.13 ^{gh}	26.33 ± 0.12 ^a	0.22 ± 0.01 ^b
S6 T5	18.40 ± 0.58 ^h	22.8 ± 0.86 ^a	0.11 ± 0.08 ^a
S6 T6	33.47 ± 4.38 ^f	23.07 ± 2.69 ^a	0.54 ± 0.02 ^d
S6 T7	27.57 ± 2.13 ^{fg}	25.1 ± 2.16 ^a	0.25 ± 0.05 ^b
S6 T8	27.43 ± 1.31 ^{fg}	41.33 ± 1.52 ^a	0.16 ± 0.03 ^b
S9 T1	33.66 ± 1.37 ^f	39.68 ± 2.76 ^a	0.11 ± 0.02 ^a
S9 T2	117.93 ± 1.21 ^a	3271 ± 2759.82 ^b	0.26 ± 0.02 ^b
S9 T3	97.64 ± 5.04 ^b	155 ± 39.05 ^a	0.23 ± 0.01 ^b
S9 T4	103.23 ± 1.47 ^b	100.66 ± 5.86 ^a	0.23± 0.01 ^b
S9 T5	34.79 ± 0.36 ^f	38.46 ± 3.08 ^a	0.31 ± 0.01 ^c
S9 T6	122.23 ± 2.70 ^a	2973.33 ± 129.4 ^b	0.22 ± 0.05 ^a
S9 T7	101.7 ± 4.01 ^b	210.33 ± 83.06 ^a	0.25 ± 0.05 ^b
S9 T8	121.95 ± 3.01 ^a	298.33 ± 22.898 ^a	0.33 ± 0.07 ^c

3 sistemas SNEDDS fueron utilizados para representar el tamaño de partícula. Promedio de los valores ± SD (n=6). Letras diferentes significan diferencia significativa (p<0.05).

Se decidió utilizar el sistema 2 (S2) para realizar las pruebas de digestibilidad, agregando el complejo de PC y PCM. Los tratamientos 4 y 8 mostrados en la Tabla 8 se descartaron por presentar comportamientos bimodales. En la Figura 22, el segundo pico representa un 3% de las mediciones y los tamaños en este pico ronda los 2000 nm.

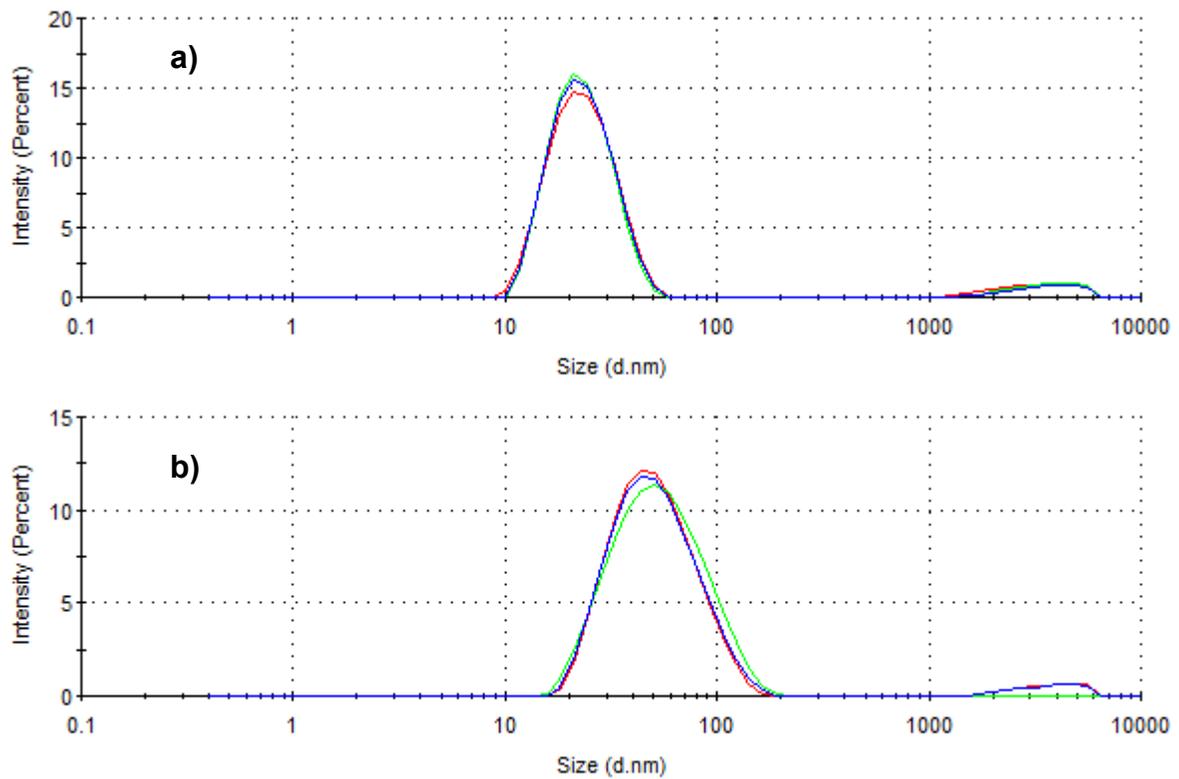


Figura 22. Comportamiento bimodal de los tratamiento a) T4 y b) T8.

6.6 Evaluación de bioaccesibilidad en el sistema digestivo *in vitro*

Los tratamientos, excluyendo 4 y 8, fueron sometidos a las condiciones descritas en la metodología. En todos los tratamientos se observó un cambio en el tamaño de partícula después de pasar a través de cada fase gástrica. En la etapa de boca, se observaron partículas de tamaño micrométrico. Se ha sugerido que estas partículas son agregados que se forman por la interacción con la mucina que está presente en esta fase, siendo posible que la mucina se adhiera a la superficie de las partículas de la nanoemulsión (Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2015). En la etapa de estómago, el tamaño de partícula también aumentó, aunque este aumento no fue significativo, y también se observaron agregados. En este caso, se propone un aumento del tamaño de partícula debido a la interacción con las enzimas y sales presentes; algunas partículas pueden verse afectadas por las condiciones ambientales, producir la ruptura y liberar la insulina, que se hidroliza por la pepsina y se desnatura por el pH bajo. El mayor aumento de tamaño se produjo en la etapa del intestino delgado, donde se alcanzaron tamaños de hasta 1500 nm. Este aumento se ha asociado con la actividad de las enzimas, el valor del pH y el movimiento peristáltico que tienen un efecto en los mucoadhesivos, haciendo que la red estructurada que forman se pierda y se desencadene la liberación de partículas oleosas (Zhao *et al.*, 2010). Además, el pH básico causaría la disociación del complejo insulina-PC (Li *et al.*, 2011; McClements, 2015; Zhang *et al.*, 2017). En los tratamientos que no incluyeron mucoadhesivos T1 y T5 mostrados en la Tabla 9, el tamaño de partícula aumentó a 66-230 nm en la etapa de intestino delgado. La Figura 23 muestra el cambio en la distribución del tamaño de partícula en un sistema con alginato de sodio.

Tabla 9 Cambio de tamaño de partícula en cada fase del simulador gástrico *in vitro*

PDI	Inicial (nm)	Boca (nm)	Estómago (nm)	Intestino (nm)
T1	33.95 ± 1.98 ^a	44.60 ± 1.91 ^b	59.23 ± 1.51 ^c	66.86 ± 0.87 ^d
T2	55.83 ± 2.74 ^a	56.03 ± 2.40 ^a	58.70 ± 5.63 ^a	1846.6 ± 13.12 ^b

T3	49.58 ± 0.69 ^a	52.8 ± 3.04 ^a	101.16 ± 4.7 ^a	1506.6 ± 23.65 ^b
T5	48.96 ± 0.83 ^a	54.99 ± 1.64 ^a	75.1 ± 2.15 ^a	231.66 ± 0.24 ^b
T6	50.53 ± 4.49 ^a	57.46 ± 3.40 ^a	58.33 ± 3.2 ^a	1483.33 ± 68.3 ^b
T7	46.35 ± 0.61 ^a	51.25 ± 0.34 ^a	56.3 ± 3.2 ^a	807.73 ± 49.5 ^b

Al final de cada etapa se calculó la cantidad de insulina presente y el porcentaje de bioaccesibilidad. Los resultados se muestran en la Figura 24. La bioaccesibilidad se ve mayormente disminuida entre la fase de boca y estómago, y este comportamiento se observa en todos los tratamientos.

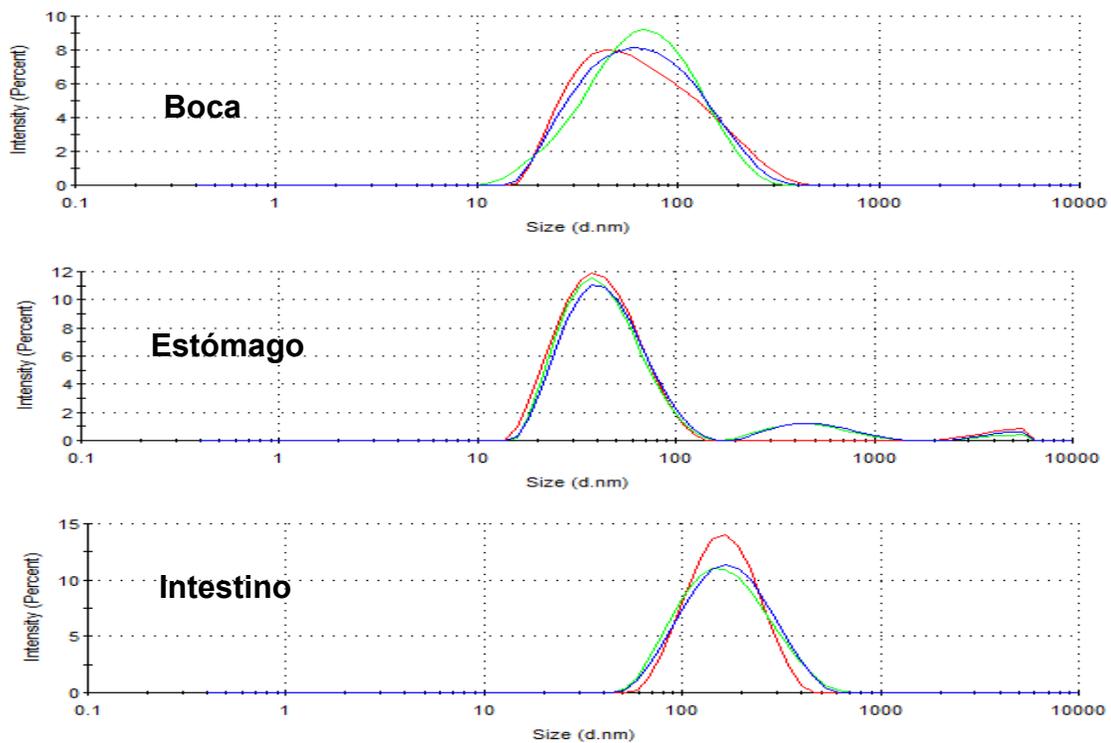


Figura 23 Cambio de la distribución de tamaño de partícula del T3 en sistema gástrico *in vitro*

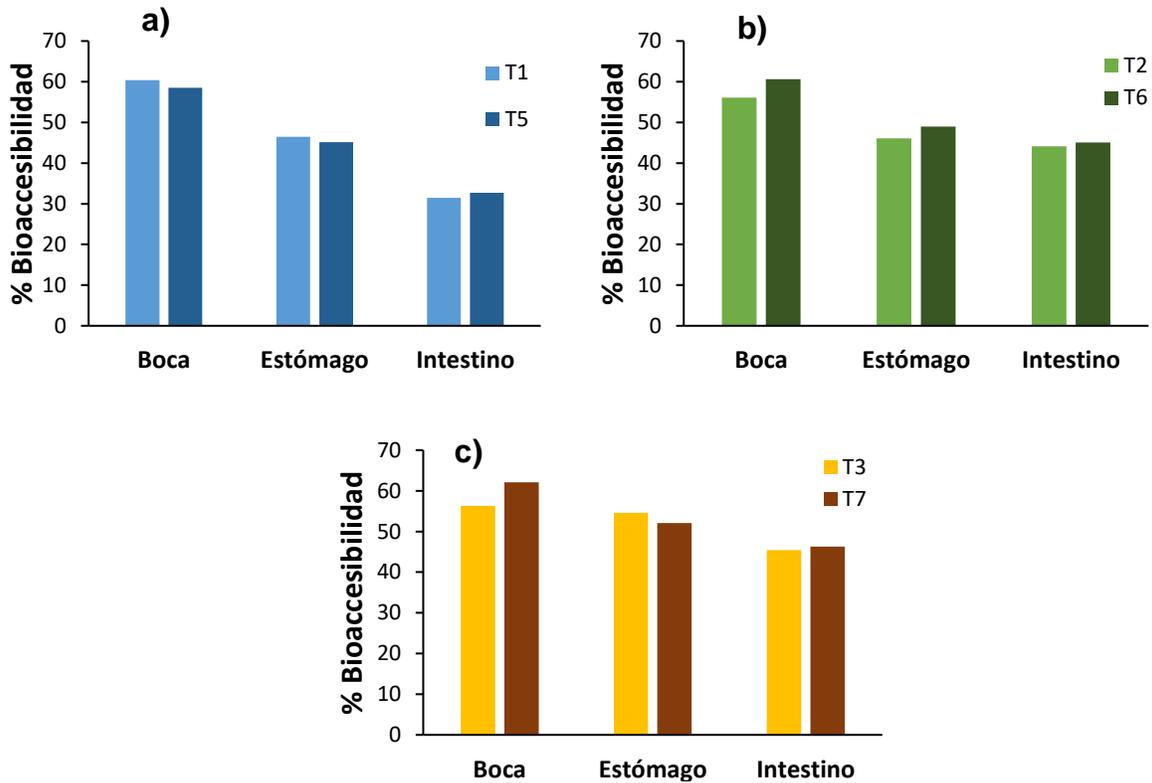


Figura 24 Bioaccesibilidad de los Tratamientos durante las fases del sistema gástrico *in vitro*. a) sistemas libres de mucoadhesivos T1 y T5. b) Sistemas con goma guar, T2 y T6. c) Sistemas con alginato de sodio T3 y T7.

El porcentaje de bioaccesibilidad calculado con la muestra tomada al final de la fase del intestino delgado se muestra en la Figura 25, donde se puede observar una diferencia significativa que puede ser causada por el mucoadhesivo, con mayor biodisponibilidad en los tratamientos que usaron cualquiera de los mucoadhesivos. Los valores obtenidos fueron entre 40-46.3% con respecto a la cantidad de insulina presente en la fase inicial. Este valor fue más alto que el reportado por Sakloetsakun *et al.* (2013), quienes encontraron que después de 4 horas solo quedaba el 10-8% de la insulina. Esto significa que el sistema desarrollado aumentó la protección de la insulina ante las condiciones gástricas y sugiere la posibilidad de usar estos sistemas como estrategias confiables de administración de insulina por vía oral.

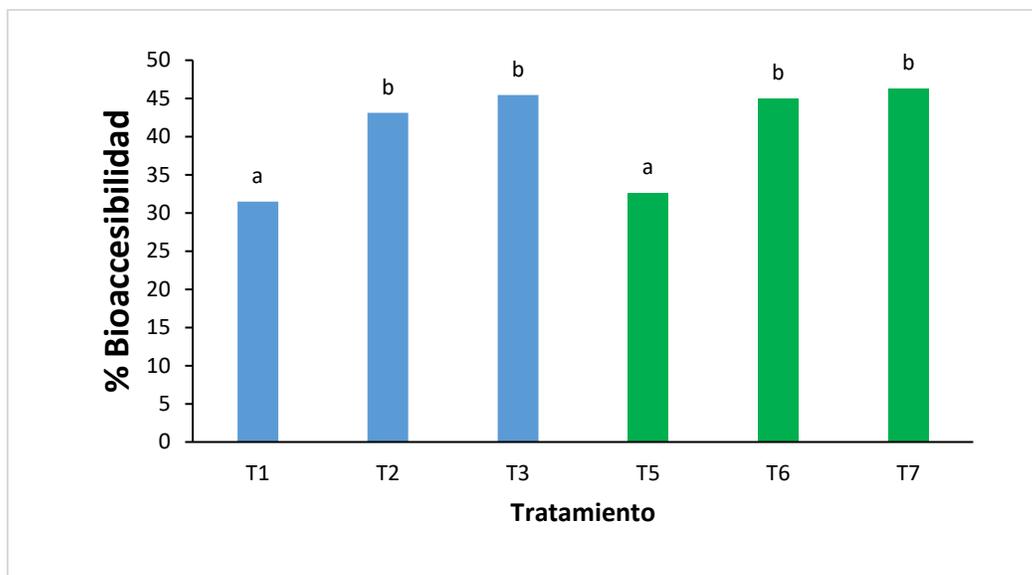


Figura 25 Bioaccesibilidad final de los 6 tratamientos probados al finalizar la etapa de intestino delgado del simulador gástrico *in vitro*

En un escenario *in vivo*, las partículas de nanoemulsión y sus productos de digestión pueden ser absorbidos una vez en el tracto gastrointestinal; por lo tanto, no se han completado los puntos exactos de absorción. Diferentes autores han planteado la hipótesis de que la absorción se lleva a cabo por las células epiteliales y las células M y son altamente dependientes del tamaño de las partículas. Además, las nanopartículas podrían ser del tamaño apropiado para pasar entre uniones de células epiteliales apretadas o absorbidas por el transporte pasivo o activo de la membrana celular (McClements y Rao, 2011).

6.7 Prueba de citotoxicidad en células Caco-2

Las muestras T1, T2 y T3 contienen el complejo insulina-Pc nativa, mientras que en las muestras T5, T6 y T7 el complejo contiene PC modificada. Los tratamientos T1, y T5 no contienen recubrimiento, los T2 y T6 contienen goma guar como mucoadhesivo y los T3 y T7 contienen alginato de sodio.

Los tratamientos fueron desarrollados a partir de SNEDDS, por lo que se probó la citotoxicidad de la mezcla de surfactantes y fase oleosa. Los compuestos han sido probados anteriormente de forma individual, y en mezclas diferentes a las desarrolladas en este trabajo. El Lauroglycol FCC no mostró toxicidad en células Caco-2 al ser puesto a una concentración del 0.001%, mediante el método MTT (Ujhelyi *et al.*, 2012). Un sistema desarrollado con Lauroglycol FCC y Labrafil M1944 produjo una disminución en la viabilidad celular de hasta el 20% en células endoteliales de aorta bovina (BAEC), utilizando concentraciones de 25 y 50 μM (Amri *et al.*, 2014). El Cremophor EL ha sido más estudiado debido a su amplio uso en la farmacéutica, principalmente en composiciones para solubilizar compuestos anticancerígenos, y ha mostrado una citotoxicidad del 40% al estar de forma individual y hasta el 10% al estar combinado con ácidos grasos de cadena media (Bu *et al.*, 2016; Gelderblom *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos al evaluar los surfactantes de este trabajo se observan en la Figura 26. Las concentraciones de prueba 1, 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ del SNEDDS mostraron citotoxicidad en las dos líneas celulares; la menor viabilidad se produjo a la concentración más alta, lo que se relaciona con el trabajo de Bu, donde se observa el mismo efecto, pero a diferencia del trabajo antes mencionado, el tiempo de incubación con el SNEDDS fue mayor, logrando una mayor interacción entre los componentes y las células. En el SNEDDS desarrollado el componente principal es Cremophor, por lo que es posible atribuir la citotoxicidad a este compuesto. Uno de los mecanismos posibles para generar el daño celular es la interacción de los surfactantes, en especial el Cremophor, con los fosfolípidos de la membrana, que puede acarrear a una disrupción de la misma, llevando a una reducción en actividad metabólica y posteriormente a la muerte celular (McClements, 2011).

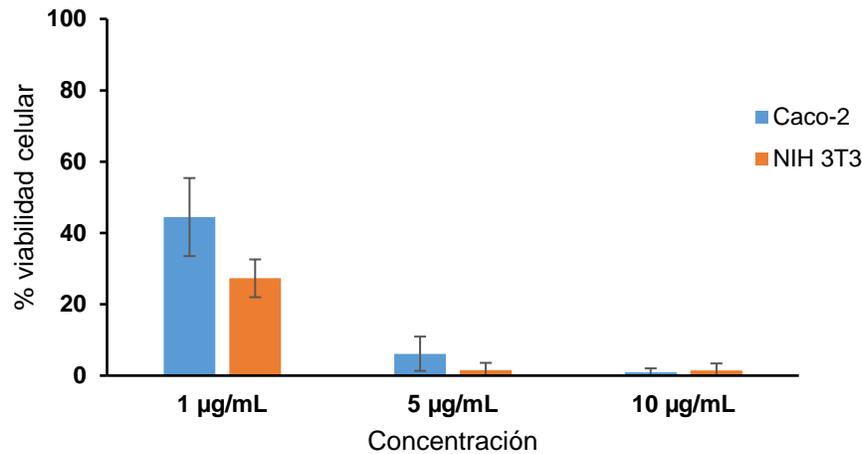


Figura 26. Viabilidad celular de SNEDDS compuesta por Labrafil, Lauroglycol y Cremophor EL, cada concentración y líneas celulares. (n=9)

La viabilidad celular en este estudio resultó inferior a la reportada por Sakloetsakun *et al.*, (2013), estudio en el que se reporta una viabilidad celular del 80-90 % después de un periodo de incubación de 3 a 6 horas. Considerando el tiempo de incubación, en el presente estudio fue de 48 horas, lo que pudo permitir mayor contacto entre la nanoemulsión y las células. De igual forma, diferentes investigadores han reportado que los compuestos presentes en un sistema SNEDDS como surfactantes y co-surfactantes pueden actuar como agentes desestabilizantes de la membrana celular (Balakumar *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014), pudiendo hacer que la membrana fuera más permeable a compuestos, y se comprometiera su integridad y homeostasis.

Como se mencionó, el tiempo de incubación influye directamente en la respuesta celular: Zhang *et al.* (2012) estudiaron las mismas concentraciones que el presente trabajo, encontrando que en células MDCK (Madin Darby Canine Kidney) se observaba una disminución de la viabilidad, quedando entre el 90-80 % de las células viables a las 4 horas de incubación; posteriormente, esta viabilidad continuó disminuyendo a mayor tiempo de incubación. La disminución de la viabilidad está relacionada con el tiempo de exposición a los surfactantes, por la acción que tienen como potenciadores de la permeabilidad en las membranas celulares. Zhang *et al.*

(2012), desarrollaron un sistema SNEDDS que difiere al desarrollado en este trabajo en la fase oleosa y co-surfactante, siendo el Cremophor EL, el componente coincidente en ambos sistemas.

En la Figura 27 se observa que la reducción en la viabilidad celular en células Caco-2 está directamente relacionada con la cantidad de insulina presente. No se observa diferencia significativa entre los tratamientos a la concentración 1; a esta concentración no se advierten los efectos de los surfactantes sobre la viabilidad celular. En la segunda concentración se observa una disminución en la viabilidad celular en los tratamientos que contienen PC modificada, lo que indica una mayor actividad de la insulina en estos tratamientos. Anteriormente se consideró que la modificación de la PC con ácidos grasos de cadena media podría facilitar la incorporación a la célula, y al lograr una mayor incorporación se observaría la muerte celular por alteración en la homeostasis celular.

Se observó además un efecto protector dado por el mucoadhesivo que se utiliza en cada tratamiento, los tratamientos 2 y 6 que utilizan el mismo mucoadhesivo tienen las viabilidades más altas a la concentración de 125 mUI/MI. Esta relación entre concentración y viabilidad está dada por la cantidad de solutos que se introducen en la célula; al aumentar la cantidad de nanoemulsión de prueba aumenta la cantidad de surfactantes; esto incrementa la inestabilidad de la membrana y el número de nanopartículas que entran la célula. La viabilidad celular también se ve afectada por la presencia de insulina, pues podría ejercer todos sus efectos metabólicos el inicio de interacción con la membrana celular. Las concentraciones de prueba de insulina se consideraron para ser mayores a la concentración máxima de la hormona en sangre, que está estimada en 0.250 mUI/mL (Melmed *et al.*, 2016); aún en concentraciones altas se obtienen viabilidades de hasta el 80%, lo que sugiere que el tratamiento es seguro.

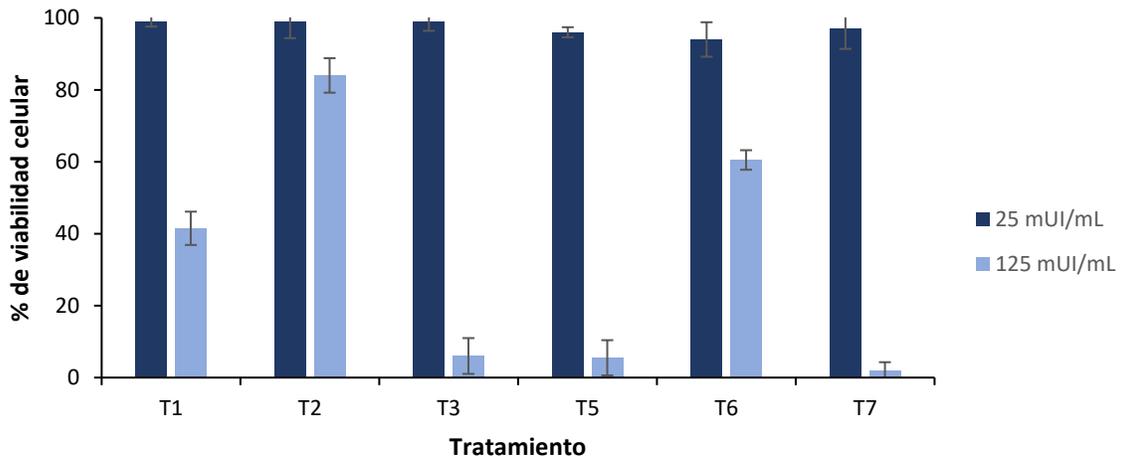


Figura 27 Viabilidad celular de la línea Caco-2. Se probaron 3 concentraciones de los 6 tratamientos, se observó una relación entre el aumento en la concentración de insulina y la disminución de la viabilidad. (SD n=6).

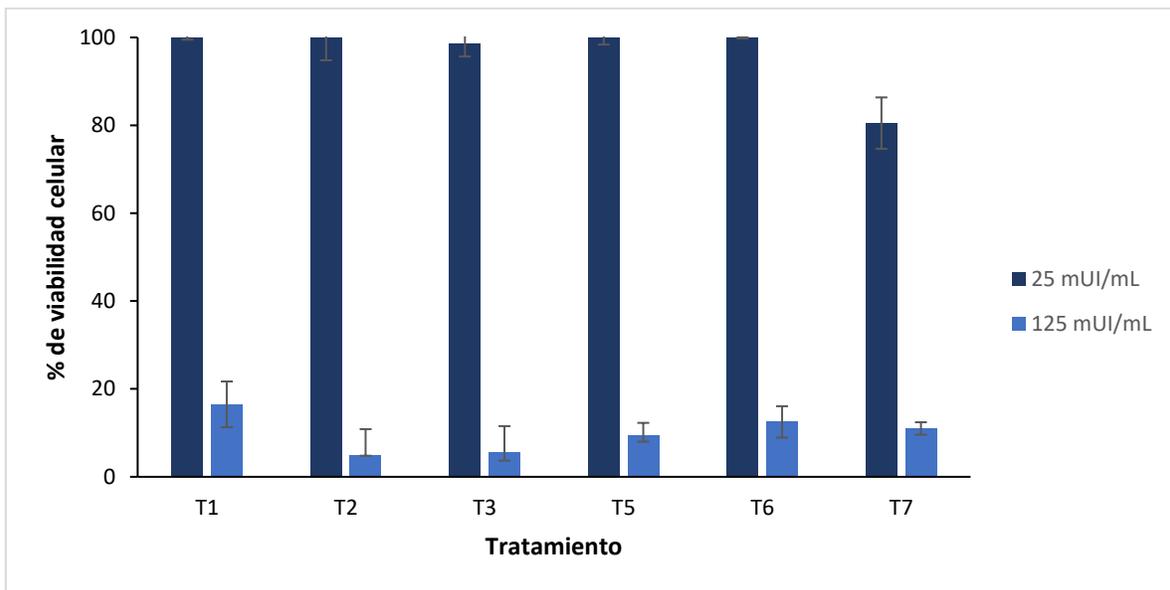


Figura 28. Viabilidad celular de la línea NIH 3T3. Se probaron 3 concentraciones de los 6 tratamientos, se observó una relación entre el aumento en la concentración de insulina y la disminución de la viabilidad. (SD n=6).

La viabilidad en la línea celular NIH 3T3 se esquematiza en la Figura 28, se observa que es menor que en Caco-2, esto se debe a la diferencia de origen de las células en diferentes estudios: por ejemplo, el realizado por Kashani *et al.* (2014),

donde se estudian diferentes extractos. En todos los casos, NIH 3T3 mostró menor viabilidad y valores de IC₅₀ menores a los de HT-29 y Caco-2. En el caso de este trabajo, se observó una disminución de la viabilidad relacionada con la concentración de insulina presente en la nanoemulsión. Esto indica que a mayor contenido de nanoemulsión la estabilidad de la célula se ve afectada por los motivos anteriormente mencionados: la disrupción y permeabilidad de la membrana y acción metabólica de la insulina. En cuanto al tipo de tratamiento, se observa mayor viabilidad en los tratamientos 2 y 6, en los que el mucoahdesivo es goma guar, este efecto puede atribuirse a la adhesión en la membrana celular, lo que podría provocar un retraso en la entrada en la célula, y al evitar que los surfactantes estén en contacto directo con la membrana celular, el aumento en la permeabilidad es menor. Entre los tratamientos que tienen alginato de sodio no se observa diferencia significativa y los tratamientos sin recubrimiento, que incluyen la PC modificada tienen una viabilidad menor. Esto se observó de igual forma en la línea celular Caco-2 y se atribuyó a los ácidos grasos de cadena media que facilitaron la entrada en la célula.

La evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones a base de lípidos y sus componentes individuales es un requisito previo para seleccionar formas de dosificación y para probar dichas formas de dosificación para determinar la permeación y absorción de fármacos *in vitro* e *in vivo*.

6.8 Permeabilidad en células Caco-2

En cuanto a los resultados de permeabilidad, se estimó el coeficiente de permeabilidad aparente del T3 en 0.903×10^{-6} cm/s y del T7 en 0.598×10^{-6} cm/s. Los coeficientes de permeabilidad que se consideran altos son mayores a 1×10^{-6} cm/s y los coeficientes bajos 1×10^{-7} cm/s (Artursson *et al.*, 2012). Los valores obtenidos indican que las nanoemulsiones tienen permeabilidad media. En el estudio realizado por Zhang *et al.* (2012), el tiempo de permeabilidad fue de 4 horas, mayor al reportado en este trabajo; el coeficiente de permeabilidad no fue calculado.

En un estudio donde se evaluaron liposomas de insulina por 4 horas el coeficiente de permeabilidad aparente fue de 0.664×10^{-6} cm/s. Dicho resultado puede ser menor debido al efecto que tienen los surfactantes en la permeabilidad celular. Otros estudios han mostrado un aumento en la permeabilidad de marcadores como Manitol al probarse en conjunto con sistemas SNEDDS (Li *et al.*, 2014).

Los dos tratamientos de prueba mostraron valores diferentes de permeabilidad, de acuerdo al tipo de fosfolípido con el que se elaboró el complejo de insulina. El complejo de insulina-PC resultó más fácilmente permeable, mientras que el tratamiento con PC modificada mostró un coeficiente de permeabilidad aparente más bajo y el tiempo de permeabilidad fue más largo, como se observa en la Figura 29. Esto puede ofrecer una ventaja al mostrar que se puede dar un perfil de liberación prolongada de insulina por parte del sistema.

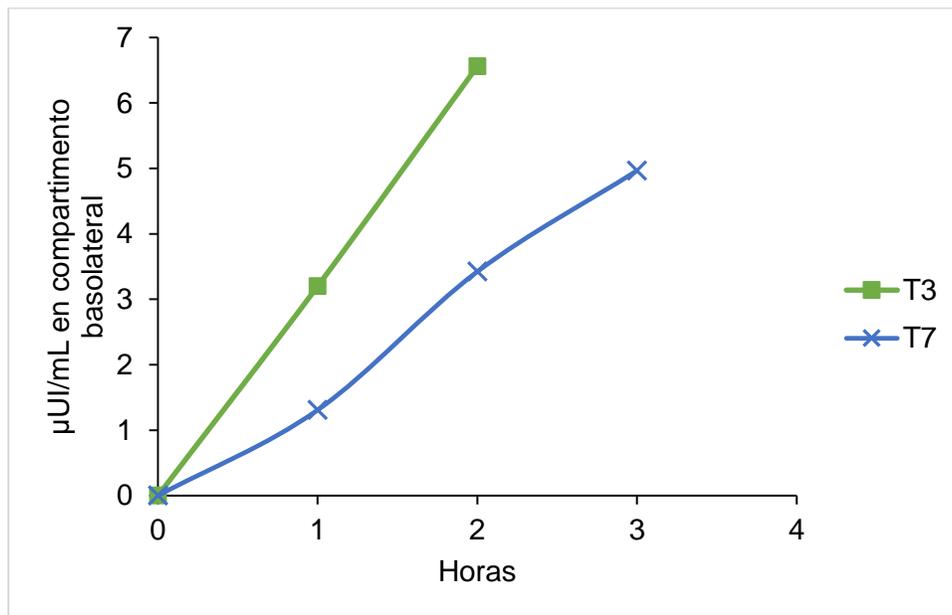


Figura 29. Transporte de sistemas SNEDDS a través de monocapa de células Caco-2. El tratamiento con PC modificada tiene un mayor tiempo de permeabilidad.

Existe una relación entre el tamaño de partícula, la concentración de insulina y el mucoadhesivo utilizado con la viabilidad celular. Esto puede ser debido al aumento

de la permeabilidad celular por interacción de la membrana con el mucoadhesivo y la actividad metabólica de la insulina. La baja en la viabilidad celular demuestra que la nanoemulsión entra en las células y que la insulina es viable al tener actividad biológica. La mezcla de surfactante, co-surfactante y fase oleosa mostró mayor citotoxicidad que la nanoemulsión, por estar a altas concentraciones, mayores a las presentes en la nanoemulsión de prueba.

Las dos líneas celulares probadas mostraron perfiles coincidentes de viabilidad en los mismos tratamientos, pero NIH 3T3 mostró mayor sensibilidad que Caco-2, lo cual es soportado por la literatura. La prueba de permeabilidad mostró que el sistema desarrollado permite el cruce de la insulina por la monocapa de células que simulan el intestino delgado a una velocidad cercana a la determinada para compuestos altamente absorbidos por el organismo.

6.9 Prueba de bioactividad en el modelo murino

Para la prueba de biodisponibilidad de insulina, se dejó un grupo testigo de 3 roedores sanos, y el resto fueron sometidos a la inyección intraperitoneal de estreptozotocina para promover la destrucción de las células β del páncreas y producir los síntomas asociados a la diabetes mellitus tipo 1. En la Figura 30 se muestran los niveles de glucosa del grupo testigo y de los grupos enfermos. Las muestras fueron tomadas postprandial; los niveles elevados de glucosa en el grupo enfermo indican que hay poca producción de insulina y la glucosa consumida no es aprovechada por las células, al permanecer en el torrente sanguíneo.

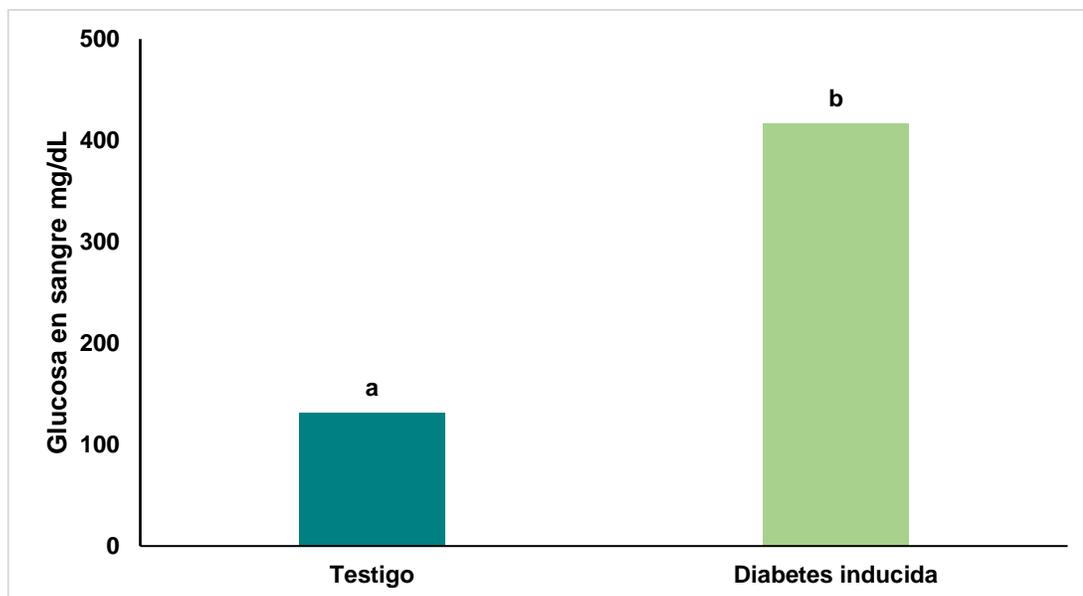


Figura 30 Niveles de glucosa en sangre en animales experimentales sanos y con diabetes inducida. Valores de glucosa postprandial mayores a 250 mg/dL indican la inducción de la enfermedad

Al comprobar los niveles de glucosa elevados y síntomas de diabetes, como pérdida de peso y poliuria, se procedió al estudio de la biodisponibilidad de insulina administrada por vía oral. Ocho horas antes del estudio se retiró el alimento a los animales experimentales para generar un estado de ayuno. Se administraron los tratamientos de acuerdo a lo establecido en la metodología.

6.9.1 Determinación de reducción de glucosa

Las muestras de sangre colectadas fueron centrifugadas y se cuantificó la cantidad de glucosa en suero, para posteriormente determinar el porcentaje de disminución de los niveles de glucosa. Estos resultados se muestran en la Figura 31. Se observa como el grupo testigo, al que no se le administró ningún tratamiento tiene fluctuaciones en el porcentaje de niveles de glucosa, llegando a tener más de 100 %, esto se puede explicar al proceso de gluconeogénesis, ya que el organismo trata de mantener niveles adecuados de glucosa para el funcionamiento de los órganos como el cerebro. La administración de la insulina libre en solución produjo una baja marginal en los niveles de glucosa, ya que la proteína fue degradada por las

condiciones de pH, sales y enzimas presentes en el sistema gastrointestinal. La mayor disminución de glucosa fue de 2.56 ± 0.96 . En la Tabla 10 se puede observar los niveles de glucosa inicial y final. El grupo en el que se administra insulina subcutánea produjo la mayor disminución en niveles de glucosa, 76.88 ± 2.11 % una hora posterior a la inyección; dicha disminución muestra la tendencia característica de la insulina subcutánea, que tiene una acción inmediata al entrar al torrente sanguíneo.

De los tratamientos desarrollados en el presente trabajo, el Tratamiento T6 de Goma guar-PCM fue el que ejerció la mayor disminución en los niveles de glucosa a las 4 horas de la administración. Diferentes estudios señalan que la goma guar posee propiedades hipoglucemiantes y aumenta la sensibilidad de la insulina (Butt *et al.*, 2007; Groop *et al.*, 1993; Saeed *et al.*, 2012; Winocour *et al.*, 2009); estos efectos han sido estudiados tanto en individuos sanos como enfermos de diabetes tipo 1 y 2. El mecanismo de acción que provoca los efectos antes mencionados no ha sido elucidado. Además de las propiedades hipoglucemiantes de la goma guar, se observó de forma *in vitro* que era un recubrimiento resistente a las condiciones gástricas, pues se puede considerar como una fibra no digerible que es fermentada hasta el intestino grueso, característica que se ha aprovechado para utilizarla en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos que tengan como diana el colon (Prasad *et al.*, 1998; Sinha y Kumria, 2001). El tratamiento T2, de goma guar-PC tuvo una disminución de niveles de glucosa sostenidos, manteniendo una disminución desde 60% hasta 46 % entre las 2 y las 8 horas.

El tratamiento T3 de alginato de sodio-PC mostró un perfil de reducción de glucosa sostenida desde las 2 hasta las 8 horas, la mayor disminución se observó a las 2 horas, y se aprecia en la Figura 31. El tratamiento T7 de alginato de sodio-PCM tuvo una menor disminución en los niveles de glucosa comparado con el T3, aunque no hubo diferencia significativa entre estos tratamientos. Después del tiempo de máxima disminución de niveles de glucosa, estos se elevaron hasta alcanzar el valor inicial a las 8 horas de la administración del tratamiento; este comportamiento puede

deberse a que el sistema ha liberado la cantidad de insulina contenida, dicha insulina fue utilizada y el organismo trata de nivelar la cantidad de glucosa.

En los 4 tratamientos se observaron perfiles similares; si bien no fueron entre los tratamientos que contenían el mismo polisacárido como recubrimiento, fue en el tipo de fosfolípido con el que se preparó el complejo insulínico, los complejos con PC mantuvieron la reducción de los niveles de glucosa por 6 horas. Por otro lado los complejos con PCM tuvieron una fluctuación en la reducción de glucosa, si bien, la mayor reducción del estudio se da al utilizar uno de estos complejos, el valor no se mantiene por más de 1 hora, esto puede deberse a que la PCM tiene ácidos grasos de cadena media, los cuales son más permeables a la membrana celular (Ochoa *et al.*, 2013), razón por la que la insulina contenida en el complejo es absorbida por el intestino y transportada a las células diana.

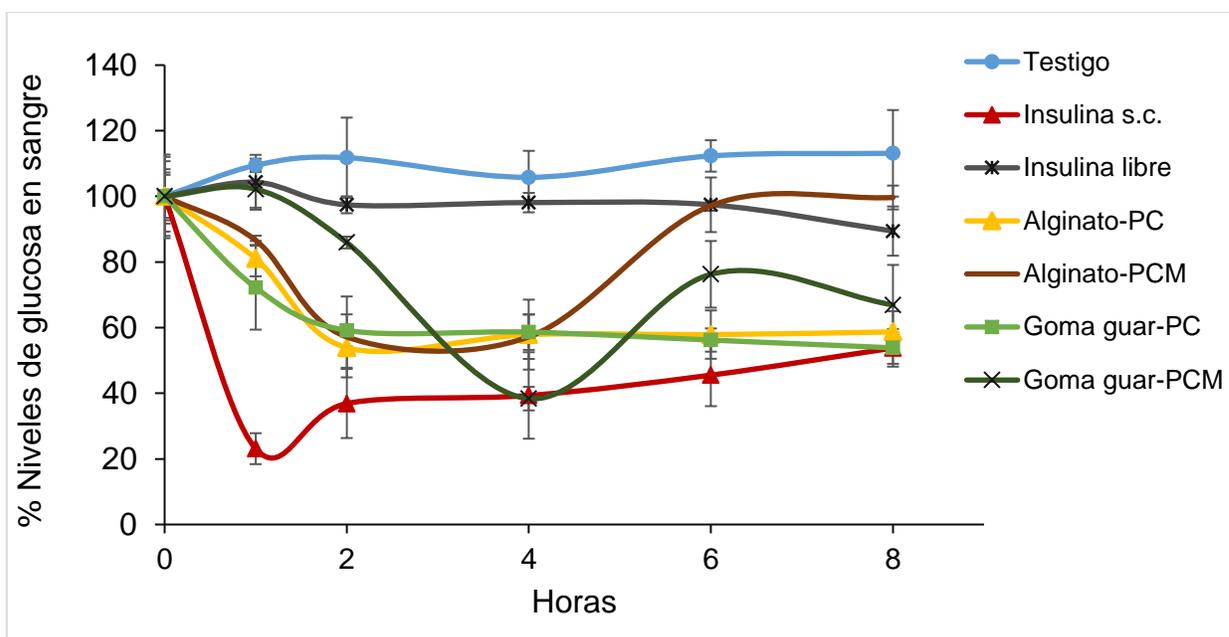


Figura 31 Niveles de reducción de glucosa en sangre durante 8 horas después de la administración de los tratamientos, Insulina subcutánea (s.c.) 2 UI/kg, los demás tratamientos se administraron a 20 UI/kg. Los puntos representan la media \pm DS (n=3)

Los valores normales de glucosa en sangre en ayuno oscilaron de 70 a 100 mg/dL (Seino *et al.*, 2010). Como se observa en la Tabla 10, los tratamientos lograron una reducción de la glucosa a niveles normales y los mantuvieron hasta por 6 horas. En

contraparte, la insulina subcutánea redujo los niveles de glucosa hasta 35.22 mg/dL, valores muy por debajo de los considerados normales. La hipoglucemia es un problema que afecta comúnmente a los pacientes dependientes de administración de insulina por vía subcutánea; esta condición puede afectar a órganos como el cerebro y se ha asociado a daño neuronal (Demirbilek y Hussain, 2017; Di Lorenzi Bruzzone *et al.*, 2018; Mengual Ballester *et al.*, 2010; Rovira, 2013). Los tratamientos desarrollados en este estudio mantuvieron los niveles de glucosa dentro de los límites normales y no produjeron hipoglucemia.

Todos los tratamientos produjeron un porcentaje de reducción mayor al obtenido por el estudio más cercano realizado por Bravo (2018), donde los mayores niveles de fueron de 35.6 % y 36.1 %. En estudios realizados por Li *et al.* (2014) se obtuvo una disminución de niveles de glucosa de hasta el 38% para un sistema SNEDDS en el que se administraron 50 UI/kg; por otro lado, Zhang (2012) obtuvo una reducción del 70.8% administrando un sistema SNEDDS con un complejo de fosfatidilcolina e insulina y con una dosis de 300 UI/kg. Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los reportados anteriormente se puede observar que se obtuvieron reducciones de niveles de glucosa superiores a sistemas SNEDDS con dosis similares, y esta reducción es cercana a la disminución obtenida el sistema que administró una dosis de insulina superior.

Tabla 10 Efecto hipoglucémico de los tratamientos de prueba

Tratamiento	Dosis UI/kg	% de Reducción de niveles de glucosa	Glucosa inicial mg/dL	Glucosa final mg/dL	T(h)
Testigo	0	-			-
Insulina libre	50	2.56±0.96 ^d	205.26±12.0	183.55±2.9	4
Insulina s.c.	2	76.88±2.11 ^a	163.70±2.1	35.22±4.7	1
Alginato-PC T3	50	46.12±5.39 ^c	160.08±8.2	86.20±6.1	2
Alginato-PCM T6	50	42.83±1.40 ^c	155.71 ±7.2	88.61±1.7	2
Goma guar-PC T2	50	46.15±5.73 ^c	168.71±12.7	90.98±5.7	8
Goma guar-PCM T7	50	61.63±5.64 ^b	210.65±6.5	80.83±3.58	4

Los resultados expresan la media ± DS (n=3). Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa (p<0.05).

6.9.2 Biodisponibilidad de insulina

Para la determinación de insulina se utilizó el suero obtenido de las muestras sanguíneas recolectadas y se uso de acuerdo a las indicaciones del kit ELISA MexLab. En la Tabla 11 se muestran las concentraciones máximas de insulina y el tiempo en el que se obtuvieron. Como era esperado, la insulina subcutánea presentó la mayor cantidad de insulina en suero, con 190.74 ±17.26 µUI/mL a 1 hora de la administración de 2 UI/kg. De los tratamientos desarrollados el que obtuvo la mayor cantidad de insulina fue el T7 Goma guar-PCM con 95.30±10.0.

Se observó una relación entre la mayor cantidad de insulina en suero y el punto de mayor reducción de niveles de glucosa, lo cual es acorde a lo reportado por Bravo (2018), al haber una cantidad de insulina alta en sangre viable para realizar su actividad biológica, los niveles de glucosa fueron reducidos.

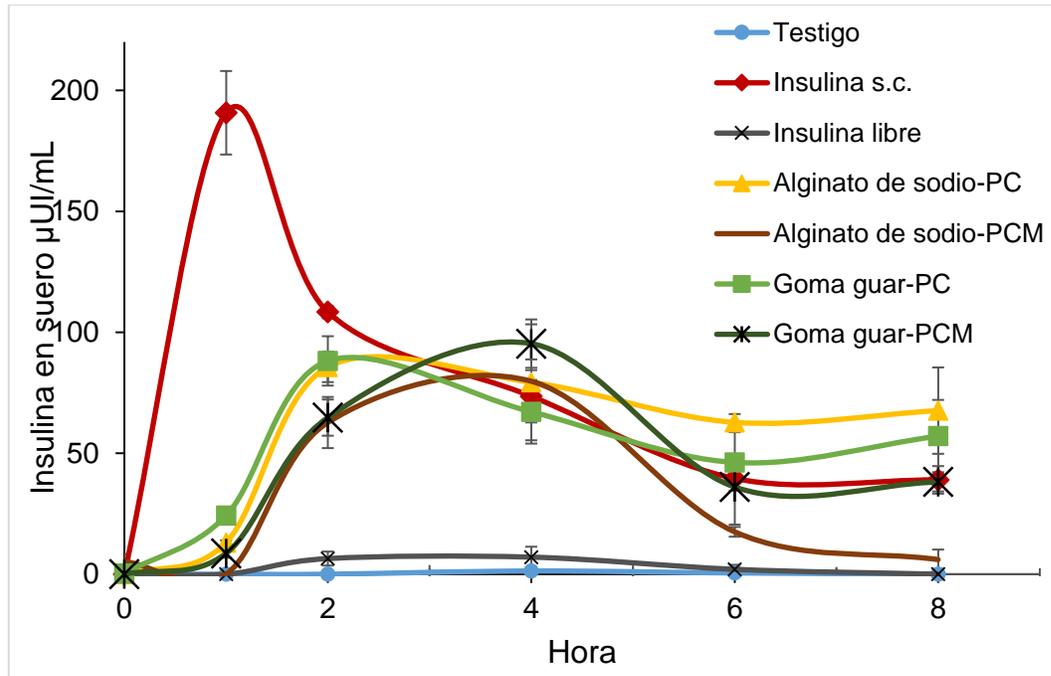


Figura 32 Niveles de insulina en sangre posteriores a la administración de insulina sc (2 UI/kg), administración oral de solución de insulina (50 UI/kg), y los tratamientos (50 UI/kg). Los puntos representan la media \pm DS (n=3).

El porcentaje de biodisponibilidad relativa se calculó con la ecuación mostrada en materiales y métodos, tomando como referencia el área bajo la curva de la insulina subcutánea. Estos resultados se describen en la Tabla 11. No se observaron diferencia significativas entre los 4 tratamientos desarrollados con polisacáridos mucoadhesivos, aunque el mayor porcentaje de biodisponibilidad se dio en el tratamiento T3, desarrollado con alginato de sodio y PC. Por los resultados obtenidos de mayor reducción de niveles de glucosa y mayor cantidad de insulina en suero, se esperaría que el mayor porcentaje de biodisponibilidad se obtuviera en el tratamiento con goma guar-PCM; una explicación para esto es la diferencia de los mucoadhesivos utilizados. En el tratamiento con mayor biodisponibilidad el alginato forma una red que utiliza iones de calcio para estabilizarse. En el intestino

hay un intercambio de estos iones y la liberación de las partículas oleosas es mantenida por la concentración de iones, produciendo así una liberación de insulina más sostenida y constante (Li *et al.*, 2011; Tokle *et al.*, 2012), como se observa en la Figura 32. En cambio, la goma guar solo está adherida a las partículas del SNEDDS por fuerzas superficiales; al romperse estas fuerzas por las condiciones intestinales, las partículas liberadas inician su paso al torrente sanguíneo (Prasad *et al.*, 1998; Saeed *et al.*, 2012; Sinha y Kumria, 2001).

Tabla 11 Parámetros farmacocinéticos después de la aplicación de los tratamientos

Tratamiento	Dosis UI/kg	C _{max} (μUI/mL)	T(h)	%BD relativa
Testigo	0	-	-	
Insulina libre	50	7.02±4.30 ^a	4	0.12^a
Insulina s.c.	2	190.74±17.26 ^e	1	100
Alginato-PC T3	50	85.68±6.27 ^c	2	2.25^b
Alginato-PCM T6	50	79.76±9.02 ^b	2	1.71^b
Goma guar-PC T2	50	88.16±10.20 ^c	2	1.95^b
Goma guar-PCM T7	50	95.30±10.0 ^d	4	1.69^b

Los resultados expresan la media ± DS (n=3). Valores con letras diferentes presentan diferencia significativa (p<0.05).

En relación con otros reportes, se muestran diferentes valores de biodisponibilidad relativa y las dosis administradas. El valor de biodisponibilidad obtenido en el presente trabajo es de 2.25%, mayor al estudio más cercano realizado por Bravo

(2018), de 1.8%; esto se explica por la utilización de los mucoadhesivos como protección adicional y para aumentar el contacto con la mucosa intestinal. El trabajo de Sakloetsakun et al. (2013), en el que se reporta el uso de polímeros funcionales y SNEDDS, encapsulando un SNEDDS en una cubierta de capa entérica, logró solo una biodisponibilidad relativa de 0.106%.

Aumentar la biodisponibilidad oral de insulina sigue siendo un reto que se debe abordar. Hasta el momento la mayor biodisponibilidad es de 7.7 %, para un sistema de nanopartículas formadas a partir de complejos de insulina con fosfolípidos y polímeros como PLGA, (Cui *et al.*, 2006). La aplicación de este tipo de polímeros e incluso la liofilización de SNEDDS y la integración en capsulas de liberación prolongada pueden ser alternativas que ayuden a aumentar la biodisponibilidad de la insulina oral y lograr que esta forma de administración sea eficiente.

Tabla 12 Biodisponibilidad de diferentes estudios

Trabajo	Dosis UI/kg	%BD relativa
Cui <i>et al.</i> , 2006	20	7.7%
Sakloetsakun <i>et al.</i> , 2013	20	0.106%
Li <i>et al.</i> , 2014	50	0.43%
Bravo, 2018	50	1.77%
Presente trabajo	50	2.25%

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas por el presente trabajo se pueden concretar en los siguientes puntos:

- Se obtuvieron sistemas auto-nanoemulsificables con tamaños de partícula entre 27.36 – 50.53 nm con comportamiento monomodal
- Al agregar los mucoadhesivos se obtuvieron tamaños de partícula entre 53.1-83.2 nm
- La incorporación del mucoadhesivo aumentó el porcentaje de insulina disponible en la fase de intestino delgado en un modelo *in vitro*, logrando 46.3%
- Existe una relación entre el tamaño de partícula, la concentración de insulina y el mucoadhesivo utilizado con la viabilidad celular. La baja en la viabilidad celular demuestra que la nanoemulsión entra en las células y que la insulina es viable al tener actividad biológica
- Se logró la inducción de diabetes mellitus Tipo 1 en un modelo murino. Al probar 4 de los tratamientos desarrollados se logró un efecto hipoglucémico, de hasta el 61% en 4 horas
- Se alcanzó una biodisponibilidad máxima de 2.25%, con el tratamiento T3 (alginato de sodio-pc) con respecto al método subcutáneo y no se observó diferencia significativa entre las biodisponibilidades de los otros tratamientos
- Se observó un aumento en la biodisponibilidad y reducción de niveles de glucosa con respecto a los SNEDDS sin recubrimiento, lo que indica que la aplicación de mucoadhesivos efectivamente aumenta el tiempo de contacto de las partículas con las células

REFERENCIAS.

- Alberti, K. G. M. M. y Zimmet, P. Z. (1998). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, **15(7)**, 539–553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9136\(199807\)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9136(199807)15:7<539::AID-DIA668>3.0.CO;2-S)
- Aloulou, A., Ali, Y. Ben, Bezzine, S., Gargouri, Y., y Gelb, M. H. (2012). Phospholipases: an overview. *Lipases and phospholipases*, **861**, 63–85. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5>
- Amri, A., Le Clanche, S., Thérond, P., Bonnefont-Rousselot, D., Borderie, D., Lai-Kuen, R., ... Charrueau, C. (2014). Resveratrol self-emulsifying system increases the uptake by endothelial cells and improves protection against oxidative stress-mediated death. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **86(3)**, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.10.015>
- Artursson, P., Palm, K., y Luthman, K. (2012). Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **64(SUPPL.)**, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.005>
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., y Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, **383(9911)**, 69–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60591-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60591-7)
- Baeza-Jiménez, R., González-Rodríguez, J., Kim, I.-H., García, H. S., y Otero, C. (2012). Use of immobilized phospholipase A1-catalyzed acidolysis for the production of structured phosphatidylcholine with an elevated conjugated linoleic acid content. *Grasas y Aceites*, **63(1)**, 44–52. <https://doi.org/10.3989/gya.045211>
- Balakumar, K., Raghavan, C. V., selvan, N. T., prasad, R. H., y Abdu, S. (2013). Self nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) of Rosuvastatin calcium: Design, formulation, bioavailability and pharmacokinetic evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **112**, 337–343.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.025>

Brange, J. y Langkjær, L. (1993). Insulin Structure and Stability, (**1922**), 315–350.

https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1236-7_11

Bruno, B. J., Miller, G. D., y Lim, C. S. (2014). Basics and recent advances in peptide and protein drug delivery. *Therapeutic delivery*, **4(11)**, 1443–1467.

<https://doi.org/10.4155/tde.13.104.Basics>

Brunton, L. L. (2012). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica* (12a ed.). México: McGraw Hill México.

Bu, P., Narayanan, S., Dalrymple, D., Cheng, X., y Serajuddin, A. T. M. (2016). Cytotoxicity assessment of lipid-based self-emulsifying drug delivery system with Caco-2 cell model: Cremophor EL as the surfactant. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **91**, 162–171.

<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.06.011>

Butt, M. S., Shahzadi, N., Sharif, M. K., y Nasir, M. (2007). Guar gum: A miracle therapy for hypercholesterolemia, hyperglycemia and obesity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47(4)**, 389–396.

<https://doi.org/10.1080/10408390600846267>

Cavazos-Garduño, A., Ochoa Flores, A. A., Serrano-Niño, J. C., Martínez-Sánchez, C. E., Beristain, C. I., y García, H. S. (2015). Preparation of betulinic acid nanoemulsions stabilized by omega-3 enriched phosphatidylcholine.

Ultrasonics Sonochemistry, **24**, 204–213.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.12.007>

Chen, M. C., Sonaje, K., Chen, K. J., y Sung, H. W. (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*, **32(36)**, 9826–9838.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.087>

Choonara, B. F., Choonara, Y. E., Kumar, P., Bijukumar, D., du Toit, L. C., y Pillay, V. (2014). A review of advanced oral drug delivery technologies facilitating the protection and absorption of protein and peptide molecules. *Biotechnology*

- Advances*, **32(7)**, 1269–1282. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.07.006>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.05.013>
- De Luis, D. A. y Romero, E. (2013). Análogos de insulina: Modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. *SEMERGEN-Medicina de Familia*, **39(1)**, 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2012.04.010>
- Demirbilek, H. y Hussain, K. (2017). Congenital Hyperinsulinism: Diagnosis and Treatment Update. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, **9(Suppl 2)**, 69–87. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.2017.S007>
- Di Lorenzi Bruzzzone, R. M., Bruno, L., Pandolfi, M., Javiel, G., y Goñi, M. (2018). Hipoglucemia en pacientes diabéticos. *Revista Uruguaya de Medicina Interna*. <https://doi.org/10.26445/rmu.2.3.3>
- DIABETES PREVENTION PROGRAM RESEARCH GROUP, L. (2002). Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With Lifestyle Intervention or Metformin. *The NEnglish JournalEnglish Journal*, **346(6)**, 393–403. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa012512>
- Efiana, N. A., Mahmood, A., Lam, H. T., Zupančič, O., Leonaviciute, G., y Bernkop-Schnürch, A. (2017). Improved mucoadhesive properties of self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) by introducing acyl chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, **519(1–2)**, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.012>
- Esperón, A., Baeza, R., García, H., y Cano, C. (2017). Structured Mono- and Diacylglycerols with a High Content of Medium Chain Fatty Acids. *Journal of Oleo Science*, **66(9)**, 991–996.
- García-Varela, R., Raúl, O., Ramírez, F., Serna-saldivar, S. O., Altamirano, J., y

- Cardineau, G. A. (2016). Cancer cell specific cytotoxic effect of *Rhoeo discolor* extracts and solvent fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, **190**, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.051>
- Garcia, H. S., Kim, I., López-Hernández, 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. <https://doi.org/10.3989/gya.2008.v59.i4.531>
- Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., y Sparreboom, A. (2001). Cremophor EL. *European Journal of Cancer*, **37(13)**, 1590–1598. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00171-X](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00171-X)
- Gonçalves, L. M. D., Maestrelli, F., Mannelli, L. C., Ghelardini, C., Almeida, A. J., y Mura, P. (2016). Development of solid lipid nanoparticles as carriers for improving oral bioavailability of glibenclamide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **102**, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.02.012>
- Griesser, J., Hetényi, G., Moser, M., Demarne, F., Jannin, V., y Bernkop-Schnürch, A. (2017). Hydrophobic ion pairing: Key to highly payloaded self-emulsifying peptide drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, **520(1–2)**, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.019>
- Groop, P.-H., Aro, A., Stenman, S., y Groop, L. (1993). Dependent Effects of Guar Gum Diabetes in Subjects With. *American Society for Clinical Nutrition*, **58(July)**, 513–518.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., y Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, **12(11)**, 2826–2841. <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>
- Hama, S., Ogino, C., y Kondo, A. (2015). Enzymatic synthesis and modification of structured phospholipids: recent advances in enzyme preparation and biocatalytic processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99(19)**, 7879–7891. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6845-1>

- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P., y Reynoso-Noverón, N. (2013). Diabetes. *Salud Pública de México*, **55(1)**, 129–136.
- Jovanovic, L., Ilic, S., Pettitt, D. J., Hugo, K., Gutierrez, M., Bowsher, R., y Bastyr, E. (1999). Insulin Lispro in Gestational Diabetes. *Diabetes care*, **22(9)**.
- Kanzarkar, M., Pathak, P. P., y Vaidya, M. (2015). Oral insulin-delivery system for diabetes mellitus. *Pharmaceutical Patent Analyst*, **4(1)**, 29–36. <https://doi.org/10.4155/ppa.14.53>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.04.013>
- Kashani, L. M. T., Majdzadeh, M., Khanavi, M., Taghizadeh, M., Kahkeshani, N., Vatankhah, M., y Ostad, S. N. (2014). Cytotoxic Activity of Selected Iranian Traditional Medicinal Plants on Colon , Colorectal and Breast Cancer Cell Lines Cytotoxic Activity of Selected Iranian Traditional Medicinal. *Archives of breast cancer*, **1(3)**, 19–22. <https://doi.org/10.19187/ABC.20141395-98>
- Kassem, A. A., Mohsen, A. M., Ahmed, R. S., y Essam, T. M. (2016). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Molecular Liquids*, **218**, 219–232. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.02.081>
- Kerner, W. y Brückel, J. (2014). Classification And Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, **Jul(122(7))**, 384–6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-18907-1.00038-X>
- Kuche, K., Bhargavi, N., Dora, C. P., y Jain, S. (2019). Drug-Phospholipid Complex—a Go Through Strategy for Enhanced Oral Bioavailability. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, **20(2)**, 1–13. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1252-4>

- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., y Deng, Y. (2014). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **10(2)**, 81–98. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
- Li, P., Nielsen, H., Fano, M., y Mullertz, A. (2011). Preparation and Characterization of Insulin–Surfactant Complexes for Loading into Lipid-Based Drug Delivery Systems. *International Journal of Drug Development and Research*, **3(2)**, 26–33. <https://doi.org/10.1002/jps>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.039>
- Li, Y., Hu, M., Du, Y., y McClements, D. J. (2011). Controlling lipid nanoemulsion digestion using nanolaminated biopolymer coatings, **28(May 2010)**, 166–175. <https://doi.org/10.3109/02652048.2010.544417>
- Lindmark, T., Kumira, 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)**, 362–9. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9435199>
- Liu, X., Li, X., Zhang, N., y Wen, X. (2015). Engineering β -cell islets or islet-like structures for type 1 diabetes treatment. *Medical Hypotheses*, **85(1)**, 82–84. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.04.005>
- Makhlof, A., Werle, M., Tozuka, Y., y Takeuchi, H. (2011). A mucoadhesive nanoparticulate system for the simultaneous delivery of macromolecules and permeation enhancers to the intestinal mucosa. *Journal of Controlled Release*, **149(1)**, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.02.001>
- Mayer, J., Zhang, F., y DiMarchi, R. (2007). Insulin structure and function. *Peptide*

- Science*, **88(5)**, 687–713. <https://doi.org/10.1002/bip>
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *The Royal Society of Chemistry*, **7(6)**, 2297–2316. <https://doi.org/10.1039/C0SM00549E>
- McClements, D. J. y Li, Y. (2010). Review of in vitro digestion models for rapid screening of emulsion-based systems. *Food & Function*, **1(1)**, 32. <https://doi.org/10.1039/c0fo00111b>
- 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. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
- Melmed, S., President, S. V., Angeles, L., Polonsky, K. S., Crane, R. T., Service, D., ... Kronenberg, H. M. (2016). *Williams Textbook of Endocrinology* (13 th). Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Mendoza, K., Márquez, R., Donado, A., Echenique, O., Mendoza, D. L., Pérez, M., y Macias, V. (2005). Fundamentos biomoleculares de la diabetes mellitus. *Revista de la Facultad de Ciencias de Salud*, **2**, 135–142.
- Mengual Ballester, M., Flores Pastor, B., Pascual, H., Tudela Pallares, J., y Aguayo Albasini, J. L. (2010). Nesidioblastosis como causa de hiperinsulinismo en el adulto. *Cirugía Española*, **88(6)**, 423–425. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2010.02.007>
- Muheem, A., Shakeel, F., Jahangir, M. A., Anwar, M., Mallick, N., Jain, G. K., ... Ahmad, F. J. (2016). A review on the strategies for oral delivery of proteins and peptides and their clinical perspectives. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **24(4)**, 413–428. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2014.06.004>
- Nagao, K. y Yanagita, T. (2010). Medium-chain fatty acids: Functional lipids for the prevention and treatment of the metabolic syndrome. *Pharmacological Research*, **61(3)**, 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.11.007>

- Nur, M. y Vasiljevic, T. (2017). Can natural polymers assist in delivering insulin orally? *International Journal of Biological Macromolecules*, **103**, 889–901. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.138>
- Ochoa, A., Hernández-Becerra, J. A., Cavazos-Garduño, A., Vernon-Carter, E. J., y García, H. S. (2016). Preparation and characterization of curcumin nanoemulsions obtained by thin-film hydration emulsification and ultrasonication methods [Preparación y caracterización de nanoemulsiones de curcumina obtenidas por los métodos de emulsificación por hidratación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **15(1)**, 79–90.
- Ochoa, Angélica, Hernández-Becerra, J., Cavazos-Garduño, A., García, H. S., y Vernon-Carter, E. (2013). Phosphatidylcholine enrichment with medium chain fatty acids by immobilized phospholipase A1-catalyzed acidolysis. *Biotechnology Progress*, **29(1)**, 230–236. <https://doi.org/10.1002/btpr.1648>
- Olaiz-Fernández, G., Rojas, R., Aguilar-Salinas, C., Rauda, J., y Villalpando, S. (2007). Diabetes mellitus en adultos mexicanos . Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Pública de México*, **49(3)**, s331–s337. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342007000900004>
- Prabaharan, M. (2011). Prospective of guar gum and its derivatives as controlled drug delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, **49(2)**, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2011.04.022>
- Prasad, Y. V, Krishnaiah, Y. S., y Satyanarayana, S. (1998). In vitro evaluation of guar gum as a carrier for colon-specific drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **51(2–3)**, 281–287. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(97\)00181-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(97)00181-8)
- Richardson, T. y Kerr, D. (2003). Skin-Related Complications of Insulin Therapy: Epidemiology and Emerging Management Strategies. *American Journal of Clinical Dermatology*, **4(10)**, 661–667. <https://doi.org/10.2165/00128071-200304100-00001>
- Rovira, A. (2013). Fisiopatología de la hipoglucemia en la diabetes mellitus.

Endocrinología y Nutrición, **49(5)**, 140–144. [https://doi.org/10.1016/s1575-0922\(02\)74447-1](https://doi.org/10.1016/s1575-0922(02)74447-1)

Saeed, S., Mosa-Al-Reza, H., Fatemeh, A., y Saeideh, D. (2012). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of guar gum on streptozotocin-induced diabetes in male rats. *Pharmacognosy Magazine*, **8(29)**, 65. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.93328>

Sakloetsakun, D., Dünnhaupt, 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.08.002>

Sarkar, A., Goh, K. K. T., y Singh, H. (2009). Colloidal stability and interactions of milk-protein-stabilized emulsions in an artificial saliva. *Food Hydrocolloids*, **23(5)**, 1270–1278. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.008>

Sarker, D. K. (2005). Engineering of Nanoemulsions for Drug Delivery. *Current Drug Delivery*, **2**, 297–310. <https://doi.org/10.2174/156720105774370267>

Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., y Ferreira, D. (2006). Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomedical Chromatography*, **20(9)**, 898–903. <https://doi.org/10.1002/bmc.616>

Seino, Y., Nanjo, K., Tajima, N., Kadowaki, T., Kashiwagi, A., Araki, E., ... Ueki, K. (2010). Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Investigation*, **1(5)**, 212–228. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00074.x>

Setji, T., Brown, A., y Feinglos, M. (2005). Gestational Diabetes Mellitus. *Clinical Diabetes*, **23(3)**, 17–24. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203331>

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. <https://doi.org/10.20959/wjpps20165-6624>
- Sinha, V. R. y Kumria, R. (2001). Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, **224(1–2)**, 19–38. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00720-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00720-7)
- Sun, S., Liang, N., Kawashima, Y., Xia, D., y Cui, F. (2011). Hydrophobic ion pairing of an insulin-sodium deoxycholate complex for oral delivery of insulin. *International journal of nanomedicine*, **6**, 3049–3056. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26450>
- Thombare, N., Jha, U., Mishra, S., y Siddiqui, M. Z. (2016). Guar gum as a promising starting material for diverse applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **88**, 361–372. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.001>
- Tokle, T., Lesmes, U., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2012). Impact of dietary fiber coatings on behavior of protein-stabilized lipid droplets under simulated gastrointestinal conditions. *Food and Function*, **3(1)**, 58–66. <https://doi.org/10.1039/c1fo10129c>
- Tønnesen, H. H. y Karlsen, J. (2002). Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, **28(6)**, 621–630. <https://doi.org/10.1081/DDC-120003853>
- Tran, T., Xi, X., Rades, T., y Müllertz, A. (2016). Formulation and characterization of self-nanoemulsifying drug delivery systems containing monoacyl phosphatidylcholine. *International Journal of Pharmaceutics*, **502(1–2)**, 151–160. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.02.026>
- Ujhelyi, Z., Fenyvesi, F., Váradi, J., Fehér, P., Kiss, T., Veszélka, S., ... Bácskay, I. (2012). Evaluation of cytotoxicity of surfactants used in self-micro emulsifying drug delivery systems and their effects on paracellular transport in Caco-2 cell monolayer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **47(3)**, 564–573. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.07.005>

- van Breemen, R. B. y Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **1(2)**, 175–185. <https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>
- van Hoogevest, P. (2017). Review – An update on the use of oral phospholipid excipients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **108**, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.07.008>
- Vikbjerg, A. F., Rusig, J. Y., Jonsson, G., Mu, H., y Xu, X. (2006). Strategies for lipase-catalyzed production and the purification of structured phospholipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **108(10)**, 802–811. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600138>
- Wan, W., Skandari, M. R., Minc, A., Nathan, A. G., Winn, A., Zarei, P., ... Huang, E. S. (2018). Cost-effectiveness of continuous glucose monitoring for adults with type 1 diabetes compared with self-monitoring of blood glucose: The DIAMOND randomized trial. *Diabetes Care*, **41(6)**, 1227–1234. <https://doi.org/10.2337/dc17-1821>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.10.077>
- Winocour, P. H., Brading, M., Ishola, M., Durrington, P. N., Bhatnagar, D., Lalor, B. C., y Arrol, S. (2009). Placebo-controlled Trial of the Effects of Guar Gum and Metformin on Fasting Blood Glucose and Serum Lipids in Obese, Type 2 Diabetic Patients. *Diabetic Medicine*, **7(3)**, 242–245. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1990.tb01378.x>
- Zambanini, A., Newson, R. B., Maisey, M., y Feher, M. D. (1999). Injection related anxiety in insulin-treated diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **46(3)**, 239–246. [https://doi.org/10.1016/S0168-8227\(99\)00099-6](https://doi.org/10.1016/S0168-8227(99)00099-6)
- Zhang, Q., He, N., Zhang, L., Zhu, F., Chen, Q., Qin, 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. <https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1371>

Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, H., Decker, E. A., y McClements, D. J. (2015). Influence of emulsifier type on gastrointestinal fate of oil-in-water emulsions containing anionic dietary fiber (pectin). *Food Hydrocolloids*, **45**, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.11.020>

Zhao, Y., Wang, C., Chow, A. H. L., Ren, K., Gong, T., Zhang, Z., y Zheng, Y. (2010). Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral delivery of Zedoary essential oil: Formulation and bioavailability studies. *International Journal of Pharmaceutics*, **383(1–2)**, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.035>

Zhou, C., Xia, X., Liu, Y., y Li, L. (2012). The preparation of a complex of insulin-phospholipids and their interaction mechanism. *Journal of Peptide Science*, **18(9)**, 541–548. <https://doi.org/10.1002/psc.2423>