



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**MICROENCAPSULACIÓN DE INSULINA POR LA
TÉCNICA COMBINADA EMULSIÓN
DOBLE/COACERVACIÓN COMPLEJA PARA SU
ADMINISTRACIÓN ORAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en C. Fernando Cárdenas Bailón

DIRECTORES:

Dr. Guillermo I. Osorio Revilla

Dra. María del Consuelo Gómez García



México D.F. Diciembre 2014



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de diciembre del 2014 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Microencapsulación de insulina por la técnica combinada emulsión doble/coacervación compleja para su administración oral

Presentada por el alumno:

Cárdenas	Bailón	Fernando
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
Con registro:		
A	1	1
0	1	3
		9

aspirante de:

Doctorado en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Guillermo Ismael Osorio Revilla

Dra. María del Consuelo Gómez García

Dra. Tzayhri Guadalupe Gallardo Velázquez

Dra. Yadira Rivera Espinoza

Dra. Norma Paniagua Castro

Dra. María Eugenia Jaramillo Flores

PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dra. Griselda Ma. Chávez Camarillo





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 10 del mes diciembre del año 2014, el que suscribe **Fernando Cárdenas Bailón** alumno del Programa de **Doctorado en Biotecnología** con número de registro **A110139**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Guillermo Ismael Osorio Revilla** y de la **Dra. María del Consuelo Gómez García** y cede los derechos del trabajo "**Microencapsulación de insulina por la técnica combinada emulsión doble/coacervación compleja para su administración oral**", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **fermaster2005@yahoo.com.mx**, **osorgi@gmail.com** y **consuelogg22@yahoo.com.mx** Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Fernando Cárdenas Bailón
Nombre y firma

Dr. Guillermo Ismael Osorio Revilla
Director de Tesis

Dra. María del Consuelo Gómez García
Director de Tesis

Microencapsulation techniques to develop formulations of insulin for oral delivery: a review

Fernando Cárdenas-Bailón¹, Guillermo Osorio-Revilla¹ and Tzayhrí Gallardo-Velázquez²

¹Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN México, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Delegación Miguel Hidalgo, CP 11340, México, DF, México and ²Departamento de Biofísica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN México, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Delegación Miguel Hidalgo, CP 11340, México, DF, México

Abstract

Oral insulin delivery represents one of the most challenging goals for pharmaceutical industry. In general, it is accepted that oral administration of insulin would be more accepted by patients and insulin would be delivered in a more physiological way than the parenteral route. From all strategies to deliverer insulin orally, microencapsulation or nanoencapsulation of insulin are the most promising approaches because these techniques protect insulin from enzymatic degradation in stomach, show a good release profile at intestine pH values, maintain biological activity during formulation and enhance intestinal permeation at certain extent. From different microencapsulation techniques, it seems that complex coacervation, multiple emulsion and internal gelation are the most appropriate techniques to encapsulate insulin due to their relative ease of preparation. Besides that, the use of organic solvents is not required and can be scaled up at low cost; however, relative oral bioavailability still needs to be improved.

Keywords: insulin, oral delivery, insulin microencapsulation, peptides delivery

Introduction

In recent years, a great number of attempts have been made in order to develop a formulation of insulin intended for oral administration. In past 10 years, great advances on this field have been observed although still several hurdles remain unsolved.

Insulin was isolated from bovine pancreas in 1922 by Banting and Best. By that time, oral administration of insulin was found to be ineffective for the treatment of insulin-dependent diabetes mellitus (Banting et al., 1991), since then the subcutaneous route has been the main route of insulin delivery until today (Agarwal and Kahn, 2001).

Insulin is a polipeptidic hormone which was first sequenced by Sanger (1959). It contains two polipeptidic chains (A and B); one A chain containing 21 aminoacids and one B chain containing 30 aminoacids (Harfenist and Craig, 1952). Both chains are held together by disulphide

bridges due to the cysteine groups present in both chains (Sanger, 1949) and also there is an internal disulfide bridge in chain A (Figure 1; Ryle et al., 1955). All three disulphide bridges contribute to insulin activity by maintaining a biologically active conformation (Dai and Tang, 1996; Chang et al., 2003) and it is known that the helical structure of A12–18 is essential for biological activity of insulin, and although segment A8–10 is not much concerned with such activity, it is much more important antigenically in binding to its antibodies (Yang et al., 2000).

Insulin is the mainstay of treatment for patients with type 1 diabetes. Insulin is also important in type 2 diabetes when blood glucose levels cannot be controlled by diet, weight loss, exercise and oral medications (Sheeja et al., 2010). Proper glycaemic control is crucial for this kind of patients. The need for life-long daily insulin injections decreases patients' compliance since these are painful and some patients consider them unnatural. Besides that,

Address for correspondence: G. Osorio-Revilla, Departamento de Ingeniería Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN México, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Delegación Miguel Hidalgo, CP 11340, México, DF, México. Tel: (55) 57296000, ext. 62305 and 62454. Fax: 52 (55) 57296000, ext. 46210. E-mail: osorgi@gmail.com

(Received 8 Jun 2012; accepted 10 Oct 2012)
<http://www.informahealthcare.com/mnc>

Copyright Informa UK Ltd. 2013
Not for Sale
Unauthorized reproduction, distribution, display, view, or use in any form without the express written permission of Informa UK Ltd.

El presente proyecto de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio Pesado del Departamento de Ingeniería Bioquímica, así como en el Laboratorio de Investigación I del departamento de Biofísica ambos localizados en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección del Dr. Guillermo I. Osorio Revilla y la Dra. María del Consuelo Gómez García dentro de los proyectos de investigación SIP 20121369, 20131299 y 20141349 además de contar con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

DEDICATORIAS

A la memoria de mi **padre** a quien no le alcanzó el tiempo para ver culminado este proyecto.

A mi **madre** quien me impulsa a seguir y me apoya en todo sin esperar nada a cambio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Osorio por su excelente dirección y por haberme brindado todo su apoyo para la culminación de este proyecto.

A la Dra. María del Consuelo Gómez por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial la Dra. Norma Paniagua, la Dra. Ma. Eugenia Jaramillo, la Dra. Tzayhrí Gallardo y la Dra. Yadira Rivera por sus aportaciones y por la revisión crítica al presente trabajo.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%RC	Rendimiento de coacervación
a	Alícuota (mL)
A	Fracción de biopolímeros de acuerdo a la relación material de pared/emulsión W/O 0.666 para la relación 2:1 y 0.5 para la relación 1:1.
aa's	Aminoácidos
Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ANOVA	Análisis de Varianza
B	Fracción emulsión W/O de acuerdo a la relación material de pared/emulsión W/O 0.333 para la relación 2:1 y 0.5 para la relación 1:1.
BA_r	Actividad biológica residual de la insulina (%)
B^{tn}Ab_M	Anticuerpo monoclonal de insulina biotilnado
CHIT	Quitano
CMC	Carboximetilcelulosa de sodio
D	Concentración de insulina leída directamente en la curva tipo (ng/mL)
D_{3,2}	Diametro Sauter Medio
D_{4,3}	Diámetro de esfera equivalente
DNA	Acido desoxirribonucleico
EE	Eficiencia de Encapsulación
E_{Final}	UI insulina activa por g _{ss} después del secado por aspersion (UI/g _{ss})
ELISA	Enzyme linked inmunosorbent assay
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
E^{enz}Ab_M	Anticuerpo monoclonal de insulina conjugado a una enzima.
E_{Producción}	UI insulina activa por g _{ss} utilizadas para producir las microcápsulas (UI/g _{ss})
F	g _{ss} en la muestra húmeda
F_{Final}	µg insulina activa por g _{ss} después del tiempo de incubación (UI/g _{ss})
Fi	Fase acuosa interna
FO	Fase Oleosa

F_{Producción}	µg insulina activa por g _{ss} utilizadas para producir las microcápsulas (UI/g _{ss})
g_{ss}	gramos de sólido seco
HLB	Balance Lipofilico-Hidrofilico
LDL	Lípidos de baja densidad
m₁	Masa de la solución de insulina 100UI/mL (g)
m₂	Masa de glicerol (g)
m_{BP}	Masa total de polímeros utilizados en la preparación de la mezcla binaria (g)
m_C	Masa del coacervado deshidratado (g)
m_h	masa de la muestra húmeda utilizada para el análisis de solubilidad (g _{Tot})
m_s	masa de la muestra seca obtenida después del análisis de solubilidad (g _{ss})
m_T	Masa final de la mezcla (g)
O/W	Aceite en agua
PAA	Ácido Poliacrílico
PGPR	Polirricinoleato de Poliglicerilo
PI	Punto Isoeléctrico
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Alginato de Sodio
SEM	Scanning Eletronic Microscopy
T_e	Temperatura de entrada del aire de secado (°C)
T_s	Temperatura de salida del aire de secado (°C)
UI	Unidades internacionales de insulina.
W/O/W	Agua en aceite en agua
W/O	Agua en aceite
WPI	Aislado de proteína de suero de leche
x₁	Fracción en peso de glicerol en m ₁
x_h	Fracción de humedad de la muestra húmeda (g _{H2O} /g _{Tot}), el término (1 - x _h) tiene las unidades de g _{ss} /g _{Tot}
x_T	Fracción en peso de glicerol en m _T

ÍNDICE

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	5
2.1 DIABETES	6
2.1.1 DIABETES TIPO 1	6
2.1.2 DIABETES TIPO 2	7
2.1.3 DIABETES GESTACIONAL	7
2.2 DIAGNÓSTICO DE LA DIABETES	8
2.3 INSULINA	9
2.3.1 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA INSULINA	9
2.3.2 INSULINAS PRESENTES EN EL MERCADO	11
2.3.2.1 INSULINA DE ACCIÓN RÁPIDA	12
2.3.2.2 INSULINA DE ACCIÓN INTERMEDIA NPH	13
2.3.2.3 INSULINA DE ACCIÓN INTERMEDIA SEMILENTA	13
2.3.2.4 INSULINA DE ACCIÓN PROLONGADA	14
2.3.2.5 ANÁLOGOS DE INSULINA	14
2.3.3 UNIDADES DE INSULINA	15

2.4	RETOS Y OBSTÁCULOS ASOCIADOS CON LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE INSULINA	17
2.5	TRANSPORTE INTESTINAL DE LA INSULINA	18
2.6	ESTABILIDAD DE LA INSULINA EN EL SISTEMA DE ENTREGA	19
2.7	ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA ABSORCIÓN GASTROINTESTINAL DE LA INSULINA	19
2.8	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE SISTEMAS ACARREADORES PARA ADMINISTRACIÓN ORAL DE INSULINA	19
2.8.1	MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN UTILIZANDO LÍPIDOS COMO MATERIAL ENCAPSULANTE	20
2.8.2	MÉTODOS DE ENCAPSULACIÓN UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS COMO MATERIAL ENCAPSULANTE	23
2.9	EMULSIONES DOBLES DEL TIPO AGUA EN ACEITE EN AGUA	28
2.10	COACERVACIÓN COMPLEJA	30
2.10.1	POTENCIAL Z	31
2.10.2	APLICACIONES DE LA COACERVACIÓN COMPLEJA	35
2.11	SECADO POR ASPERSIÓN	37
4.	<u>OBJETIVOS</u>	42
4.1	OBJETIVO GENERAL	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
5.1	MATERIALES	45
5.2	EQUIPO	45
5.3	DESARROLLO EXPERIMENTAL	46
5.3.1	EMULSIÓN SIMPLE AGUA EN ACEITE	46
5.3.1.1	Fase acuosa interna para optimizar la emulsión doble agua aceite en agua	46
5.3.1.2	Fase oleosa	48
5.3.1.3	Preparación de la emulsión simple agua en aceite	48
5.3.2	EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA	49
5.3.2.1	Preparación	49

5.3.3	CONDICIONES DE COACERVACIÓN	50
5.3.3.1	Determinación de potencial Z de los biopolímeros seleccionados a distintos valores de pH	50
5.3.3.2	Determinación de potencial Z de mezclas binarias proteína-polisacárido distintos valores de pH	51
5.3.3.3	Rendimiento de coacervación	51
5.3.3.4	Coacervación de la emulsión doble agua aceite en agua	52
5.3.3.5	Elaboración de las microcápsulas conteniendo insulina	53
5.3.3.5.1	Fase acuosa interna para evaluar la bioactividad residual	53
5.3.3.5.2	Fase acuosa interna para evaluar la estabilidad a pH gastrointestinal	54
5.3.3.6	Secado por aspersion de la emulsión doble coacervada	54
5.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	55
5.4.1	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE	55
5.4.2	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS GLÓBULOS EN LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE	56
5.4.3	DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LOS GLÓBULOS EN LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA	57
5.4.4	DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN EN LA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA	57
5.4.5	DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN LAS MICROCÁPSULAS SECAS	59
5.4.6	INTEGRIDAD DE LA EMULSIÓN DOBLE DESPUÉS DEL SECADO	60
5.4.7	MORFOLOGÍA DE LAS MICROCÁPSULAS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	61
5.4.8	DETERMINACIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN LAS MICROCÁPSULAS SECAS	61
5.4.9	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA RESIDUAL DE LA INSULINA DESPUÉS DEL PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN	61
5.4.9.1	Extracción de la insulina del interior de las microcápsulas	61
5.4.9.2	Cuantificación de la insulina bioactiva por la técnica de ELISA	63
5.4.9.3	Actividad biológica residual de la insulina microencapsulada	65
5.4.10	PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	66

5.4.11 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR DE LA MICROCÁPSULA <i>IN VITRO</i> A VALORES DE PH GASTROINTESTINAL	67
5.4.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
6.1 PREPARACIÓN DE LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE	71
6.2 PREPARACIÓN DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA Y EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN	73
6.3 EVALUACIÓN DE POTENCIAL Z Y RENDIMIENTO DE COACERVACIÓN	79
6.4 COACERVACIÓN DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA	86
6.5 SECADO POR ASPERSIÓN DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA COACERVADA	89
6.5.1 INTEGRIDAD DE LAS MICROCÁPSULAS COACERVADAS DESPUÉS DEL SECADO	90
6.5.2 MORFOLOGÍA DE LOS COACERVADOS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	91
6.5.3 TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA COACERVADA DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN	93
6.5.4 EXTRACCIÓN DE LA FASE ACUOSA INTERNA CON ACETONITRILLO	94
6.5.5 BIOACTIVIDAD RESIDUAL DE LA INSULINA DESPUÉS DEL SECADO	96
6.5.6 CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DE LAS MICROCÁPSULAS	99
6.6 EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR <i>IN VITRO</i> DE LA MICROCÁPSULAS SOBRE LA INSULINA A VALORES DE PH GASTROINTESTINAL	101
6.7 CONSIDERACIONES ALERGÉNICAS	105
6.8 PERSPECTIVAS A FUTURO	105
7. CONCLUSIONES	107
8. BIBLIOGRAFÍA	110

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 PREVALENCIA DE DIABETES EN ADULTOS POR INTERVALO DE EDADES EN ENCUESTAS NACIONALES DE SALUD EN MÉXICO (GUTIÉRREZ ET AL., 2012) 5

FIGURA 2 ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA INSULINA (SANGER, 1959) 10

FIGURA 3 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA INSULINA (RYLE ET AL., 1955)..... 10

FIGURA 4 HEXÁMERO DE INSULINA (HANSEN, 1991) 11

FIGURA 5 ESQUEMA DE UNA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA (MCCLEMENTS, 2005) 28

FIGURA 6 ESTRUCTURA QUÍMICA DEL POLIRRICINOLEATO DE POLIGLICERILO (BASTIDA-RODRÍGUEZ, 2013) 29

FIGURA 7 MICROENCAPSULACIÓN POR COACERVACIÓN COMPLEJA (MENDANHA ET AL., 2009) 31

FIGURA 8 MODELO DE LA DOBLE CAPA DE GOUY-CHAPMAN-STERN ALREDEDOR DE UNA PARTÍCULA COLOIDAL CARGADA NEGATIVAMENTE (MYERS, 1999)..... 32

FIGURA 9 MEDICIÓN DE POTENCIAL Z EN UNA PARTÍCULA COLOIDAL CARGADA (MYERS, 1999)34

FIGURA 10 ZONAS DE ESTABILIDAD E INESTABILIDAD DE UNA SUSPENSIÓN COLOIDAL A DIFERENTES VALORES DE PH (MYERS, 1999) 35

FIGURA 11 ESQUEMA DE UN SECADOR POR ASPERSIÓN CONVENCIONAL (MAHMOUD Y YUH FUN, 2006)..... 37

FIGURA 12 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCEDIMIENTO DE EXPERIMENTAL 47

FIGURA 13 SECADOR POR ASPERSIÓN NIRO ATOMIZER MODELO MOBILE MINOR (A: CUERPO DEL SECADOR B: ASPERSOR DE DISCO CENTRÍFUGO) 54

FIGURA 14 CALIBRACIÓN DEL PROGRAMA DIGIMIZER© 4.3.0 56

FIGURA 15 EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE GLÓBULO UTILIZANDO EL PROGRAMA DIGIMIZER©
4.3.0 57

FIGURA 16 LIBERACIÓN DE LA FASE ACUOSA INTERNA A LA FASE ACUOSA EXTERNA CAUSADA POR UN EXCESO DE AGITACIÓN DURANTE LA HOMOGENIZACIÓN DE LA EMULSIÓN SECUNDARIA 58

FIGURA 17 PRINCIPIO DE LA PRUEBA DE ELISA PARA INSULINA HUMANA DIAGNOSTIC AUTOMATION /CORTEZ DIAGNOSTICS, INC. NO. CAT: 1606Z 64

FIGURA 18 MICROESTRUCTURA DE LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE PROPORCIÓN FASE ACUOSA INTERNA:FASE OLEOSA 1:4, POLIRRICINOLEATO DE POLIGLICERILO 8%P/P 73

FIGURA 19 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE A DISTINTAS PROPORCIONES FASE ACUOSA INTERNA:FASE OLEOSA CON 8%P/P DE POLIRRICINOLEATO DE POLIGLICERILO 73

FIGURA 20 CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN EN UNA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA A PARTIR DE UNA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE CON PROPORCIONES FASE ACUOSA INTERNA:FASE OLEOSA 1:2, 1:3 Y 1:4 75

FIGURA 21 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA CON RELACIÓN AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1, FASE ACUOSA INTERNA:FASE OLEOSA 1:3 CON 8%P/P DE POLIRRICINOLEATO DE POLIGLICERILO EN FUNCIÓN DEL TIEMPO A DISTINTAS VELOCIDADES DE HOMOGENIZACIÓN 76

FIGURA 22 DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO DE GLÓBULO DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA CON RELACIÓN AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1, FASE ACUOSA INTERNA/FASE OLEOSA 1:3 CON 8%P/P DE POLIRRICINOLEATO DE POLIGLICERILO A DIFERENTES TIEMPOS Y VELOCIDADES DE HOMOGENIZACIÓN 77

FIGURA 23 MICROFOTOGRAFÍAS OBTENIDAS POR MICROSCOPIA ÓPTICA DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA CON POLIRRICINOLEATO DE POLIGLICERILO 8%P/P EN LA FASE OLEOSA PROPORCIÓN FASE ACUOSA INTERNA:FASE OLEOSA 1:3 CON UNA PROPORCIÓN AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE: EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1	78
FIGURA 24 POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH PARA EL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CARBOXIMETILCELULOSA.....	80
FIGURA 25 POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH PARA EL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO	81
FIGURA 26 POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH PARA EL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ÁCIDO POLIACRÍLICO	81
FIGURA 27 POTENCIAL Z EN FUNCIÓN DEL PH PARA EL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/QUITOSANO	82
FIGURA 28 RENDIMIENTO DE COACERVACIÓN DEL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CARBOXIMETILCELULOSA. LOS VALORES MEDIOS CON LETRAS DISTINTAS DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE (P <0.05)	84
FIGURA 29 RENDIMIENTO DE COACERVACIÓN DEL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO. LOS VALORES MEDIOS CON LETRAS DISTINTAS DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE.....	85
FIGURA 30 RENDIMIENTO DE COACERVACIÓN DEL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CARBOXIMETILCELULOSA Y AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO AL 1 Y 2% DE SÓLIDOS TOTALES PH 2.5 LOS VALORES MEDIOS CON LETRAS DISTINTAS DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE	86

<p>FIGURA 31 SEPARACIÓN DE FASES DESPUÉS DE LA COACERVACIÓN DEL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CARBOXIMETILCELULOSA Y AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO</p>	88
<p>FIGURA 32 EMULSIÓN DOBLE COACERVADA DEL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CARBOXIMETILCELULOSA MATERIAL DE PARED:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1 (A:400X, B:100X)</p>	88
<p>FIGURA 33 EMULSIÓN DOBLE COACERVADA DEL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO MATERIAL DE PARED:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1 (A:400X, B:100X)</p>	89
<p>FIGURA 34 MORFOLOGÍA DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA COACERVADA DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN (180/70°C) Y REHIDRATADA EN BUFFER DE FOSFATOS PH 7.0. SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO. MATERIAL PARED:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1</p>	90
<p>FIGURA 35 MICROFOTOGRAFÍA OBTENIDA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA COACERVADA DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN (180/70°C) A DIFERENTES AUMENTOS (A:650X, B:800X, C:1,300X Y D:2000X) SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CARBOXIMETILCELULOSA. MATERIAL PARED:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1</p>	91
<p>FIGURA 36 MICROFOTOGRAFÍA OBTENIDA POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA COACERVADA DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN (180/70°C) A DIFERENTES AUMENTOS (A:1000X, B:3000X, C:1000X Y D:1500X) SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO. MATERIAL PARED:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1</p>	92

FIGURA 37 DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA COACERVADA, DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN (180/70°C) SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ARBOIMETILCELULOSA Y AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO. MATERIAL PARED:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 1:1 94

FIGURA 38 CURVA DE CALIBRACIÓN INSULINA EN ACETONITRILLO A 280NM 95

FIGURA 39 CURVA DE CALIBRACIÓN INSULINA HUMANA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE ELISA 96

FIGURA 40 BIOACTIVIDAD RESIDUAL DE INSULINA DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS COACERVADAS CON EL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/CARBOXIMETILCELULOSA A DISTINTAS T_E Y T_S . LOS VALORES MEDIOS CON LETRAS DISTINTAS DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0.05$) 97

FIGURA 41 BIOACTIVIDAD RESIDUAL DE INSULINA DESPUÉS DEL SECADO POR ASPERSIÓN DE LAS MICROCÁPSULAS COACERVADAS CON EL SISTEMA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE/ALGINATO DE SODIO A DISTINTAS T_E Y T_S . LOS VALORES MEDIOS CON LETRAS DISTINTAS DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE 98

FIGURA 42 ESTRUCTURA MOLECULAR DE LA CARBOXIMETILCELULOSA Y DEL ALGINATO DE SODIO 101

FIGURA 43 EFECTO PROTECTOR DEL SISTEMA DESARROLLADO HACIA LA INSULINA A VALORES DE PH GASTROINTESTINAL. LOS VALORES MEDIOS CON LETRAS DISTINTAS DIFIEREN SIGNIFICATIVAMENTE ($P < 0.05$)..... 102

FIGURA 44 TESTIGO DE INSULINA SIN MICROENCAPSULAR SOMETIDO A VALORES DE PH INTESTINAL..... 103

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 RESUMEN DE TÉCNICAS DE MICROENCAPSULACIÓN UTILIZANDO LÍPIDOS COMO MATERIAL ENCAPSULANTE 21

CUADRO 2 RESUMEN DE TÉCNICAS DE MICRO ENCAPSULACIÓN DE INSULINA UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS COMO MATERIAL ENCAPSULANTE 24

CUADRO 3 FACTORIAL PARA LA PREPARACIÓN DE LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 48

CUADRO 4 PREPARACIÓN DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA..... 49

CUADRO 5 FACTORIAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EN ENCAPSULACIÓN EN LA EMULSIÓN DOBLE AGUA EN ACEITE EN AGUA..... 50

CUADRO 6 FACTORIAL PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA RESIDUAL DESPUÉS DEL PROCESO DE SECADO 55

CUADRO 7 FORMULACIÓN TÍPICA DE LA EMULSIÓN DOBLE AGUA ACEITE EN AGUA 59

CUADRO 8 PREPARACIÓN DE CURVAS TIPO PARA EVALUAR EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN EN LAS EMULSIONES DOBLES AGUA ACEITE EN AGUA..... 60

CUADRO 9 PREPARACIÓN DE LA CURVA TIPO PARA VERIFICAR RUPTURA DE LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 62

CUADRO 10 ESTABILIDAD DE LA EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 72

CUADRO 11 VALORES DE CONDUCTIVIDAD DE LA FASE ACUOSA EXTERNA AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE 10%P/V Y DEL AGUA DESTILADA 74

CUADRO 12 EFICIENCIAS DE ENCAPSULACIÓN A DISTINTAS PROPORCIONES FASE ACUOSA INTERNA:FASE OLEOSA Y A DISTINTAS PROPORCIONES AISLADO DE PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE:EMULSIÓN AGUA EN ACEITE 78

CUADRO 13 VALORES DE PH DONDE EXISTE LA MÁXIMA ATRACCIÓN ELECTROSTÁTICA ENTRE BIOPOLÍMEROS DE LOS SISTEMAS SELECCIONADOS 83

CUADRO 14 PARÁMETROS PARA LA COACERVACIÓN DE EMULSIONES DOBLES AGUA EN ACEITE EN AGUA 87

CUADRO 15 FORMULACIÓN TÍPICA PARA LA COACERVACIÓN DE LAS EMULSIONES DOBLES AGUA EN ACEITE EN AGUA 87

CUADRO 16 CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN INSULINA EN ACETONITRILLO 95

CUADRO 17 CONTENIDO DE HUMEDAD Y SOLUBILIDAD A PH 7.0, 2.0 Y 2.5 DEL PRODUCTO SECADO POR ASPERSIÓN..... 100

RESUMEN

En el presente trabajo se abordó el problema de la administración oral de la insulina. Se encapsuló insulina utilizando la técnica combinada emulsión doble agua en aceite en agua W/O/W por sus siglas en inglés “*water in oil in water*” y coacervación compleja. Las eficiencias de encapsulación resultaron de entre 87.6 a 89.5% para la proporción fase interna:fase oleosa Fi:FO 1:2. La formación de la emulsión doble W/O/W fue confirmada por microscopia óptica y la distribución del tamaño del glóbulo resultó ser bimodal con picos en 10 y 20 μ m. Se establecieron las mejores condiciones de coacervación con los sistemas aislado de proteína de suero de leche WPI por sus siglas en inglés “*whey protein isolate*”-carboximetilcelulosa CMC por sus siglas en inglés “*carboxymethyl cellulose*” y WPI-alginato de sodio SA por sus siglas en inglés “*sodium alginate*” y el máximo rendimiento de coacervación (alrededor del 80%) se logró con la proporción WPI-CMC o SA 2:1. La emulsión doble W/O/W fue coacervada exitosamente con los sistemas WPI-CMC y WPI-SA confirmándose macroscópicamente y microscópicamente. Estos sistemas coacervaron en condiciones ácidas (pH=2.5) muy similares al pH del estómago. Posteriormente estas microcápsulas fueron secadas por aspersión para obtener un sólido seco. Se corroboró la integridad de la emulsión doble W/O/W por microscopia óptica después del secado por aspersión. Se evaluó la bioactividad residual BA_r de la insulina a diferentes T_e (170 y 180°C) y T_s (80 y 70°C) obteniéndose una $BA_r=96\%$ con respecto al material encapsulado con el sistema WPI-CMC con una $T_e=180$ y $T_s=70^\circ\text{C}$ y una $BA_r=83.3\%$ con respecto al material encapsulado con el sistema WPI-SA con una $T_e=180$ y $T_s=70^\circ\text{C}$. Las microcápsulas elaboradas con ambos sistemas mostraron muy baja solubilidad a valores de pH=2.0 y alta solubilidad a pH=7.0 (condiciones del intestino) por lo que pueden proteger a la insulina en las condiciones ácidas del estómago. La humedad del sólido obtenido está dentro de los valores reportados en la bibliografía para polvos secados por aspersión. Finalmente se evaluó el efecto protector de las microcápsulas hacia la insulina a valores de pH gástrico comparándola con un testigo (insulina sin encapsular) obteniéndose un 77.04% de insulina bioactiva presente en el sistema de coacervación WPI-CMC, 96.4%

de insulina bioactiva presente en el sistema de coacervación WPI-SA y apenas el 1% para la insulina sin microencapsular. Como trabajo futuro se sugiere realizar una valoración biológica del efecto farmacológico para poder evaluar su funcionalidad.

ABSTRACT

In this paper the problem of oral administration of insulin was researched. Insulin encapsulation was achieved using the combined technique double emulsion water in oil in water W/O/W and complex coacervation. The encapsulation efficiencies were between 87.6 to 89.5% for the inner phase:outer phase Fi:FO ratio 1:2. The formation of double emulsion W/O/W was confirmed by optical microscopy and the globule size distribution was found to be bimodal with peaks at 10 and 20 μ m. The best coacervation conditions were established with whey protein isolate- carboxymethylcellulose WPI-CMC and WPI-sodium alginate SA systems and highest coacervation yield (about 80%) was achieved with WPI-SA or CMC ratio 2:1. The double emulsion W/O/W was successfully coacervated with WPI-CMC and WPI-SA systems and it was macroscopically and microscopically confirmed. These systems coacervated at very similar stomach acid conditions (pH=2.5). Subsequently these microcapsules were spray dried to obtain a dry solid. The integrity of the W/O/W double emulsion after spray drying was confirmed by optical microscopy. The residual bioactivity BAR of insulin at different T_e (170 and 180 $^{\circ}$ C) and T_s (80 and 70 $^{\circ}$ C) was evaluated obtaining a BAR = 96% with reference to the actual encapsulated material using the CMC-WPI system for $T_e=180$ and $T_s=70^{\circ}$ C and a BAR = 83.3% with reference to the actual encapsulated material with WPI-SA system for $T_e=180$ and $T_s=70^{\circ}$ C. Microcapsules made with both systems showed very low solubility at pH = 2.0 and high solubility at pH 7.0 (intestine conditions) therefore it can protect the insulin in the acidic conditions of the stomach. The humidity of the solid obtained is within the values reported in the literature for spray dried powders. Finally, the protective effect of the microcapsules for insulin at gastrointestinal pH values comparing it with a control (non-encapsulated insulin) was assessed obtaining 77.04% of bioactive insulin present in the coacervation system CMC-WPI and 96.4% of bioactive insulin present in the coacervation system WPI-SA. Non encapsulated insulin showed 1% of bioactive insulin. As future work it is suggested to perform a biological assessment to evaluate the pharmacological effect to assess their functionality.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Los avances en la biotecnología, manipulación genética e ingeniería proteica permiten la producción a gran escala de fármacos de un gran tamaño molecular como insulina, hormona paratiroidea, calcitonina, hormona de crecimiento humana y eritropoyetina para diversos usos terapéuticos.

Aunque la seguridad y efectividad ya está establecida para las formas de dosificación parenterales (intramuscular, subcutánea o intravenosa), aún no se subsanan necesidades como otras rutas de administración más fáciles y accesibles así como intervalos más prolongados de dosificación para este tipo de macromoléculas, que pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades crónicas. Para resolver estas necesidades, numerosas tecnologías de administración nasal, bucal o pulmonar se han desarrollado para mejorar la farmacocinética de estos fármacos, sin embargo la vía oral es la más conveniente.

Entre los principales obstáculos para la administración oral de estas macromoléculas está: la degradación enzimática en el tracto gastrointestinal, su alto peso molecular, su baja lipofiliidad y su poca absorción en el intestino.

Se han desarrollado varias estrategias para superar estos obstáculos entre las que se encuentran el desarrollo de formulaciones con inhibidores de proteasas, la mejora de la lipofiliidad del fármaco en cuestión, uso de sistemas bioadhesivos y sistemas acarreadores así como potenciadores de absorción.

Hasta el momento los sistemas acarreadores como microcápsulas o nanocápsulas parecen ser los sistemas más promisorios para la administración de estas macromoléculas por vía oral ya que pueden proteger a las macromoléculas de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal.

El presente trabajo abordó el problema de la administración oral de una macromolécula como la insulina utilizando la técnica de microencapsulación por coacervación compleja en un sistema de aislado de proteína de suero de leche WPI por sus siglas en inglés "*whey milk protein*"/carboximetil celulosa CMC por sus siglas en inglés "*carboxymethyl*

cellulose” o WPI/Alginato de sodio SA por sus siglas en ingles “sodium alginate”. Se conjugaron varias estrategias para mejorar la absorción gastrointestinal oral de la insulina como lo son el uso de un potenciador de absorción, la WPI que podría actuar como inhibidor enzimático por competencia y las propiedades mucoadhesivas de los polisacáridos seleccionados.

Antecedentes

2. ANTECEDENTES

De acuerdo a datos de la Federación Internacional de Diabetes, en 2013 existían alrededor de 382 millones de personas con diabetes en el mundo y se estima que en el 2035 habrá más de 592 millones de personas con esta enfermedad (IDF, 2013) México ocupa ya el sexto lugar de diabetes en el mundo con 8.7 millones de personas diabéticas (IDF, 2013).

De acuerdo con los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el año 2012 ENSANUT 2012, la proporción de adultos con diagnóstico médico previo de diabetes fue de 9.2% (Figura 1), lo que muestra un incremento importante en comparación con la proporción reportada en la Encuesta Nacional de Salud ENSA 2000 4.6% y en la ENSANUT 2006 7.3% (Gutiérrez et al., 2012), por lo que el aumento de estas cifras es ya alarmante en México.

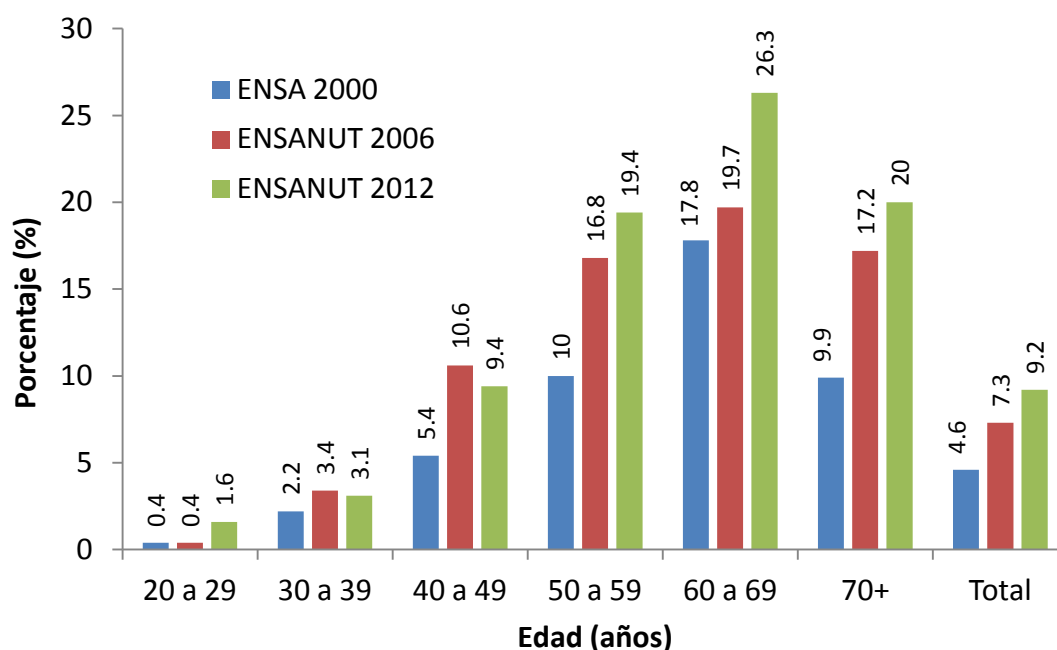


Figura 1 Prevalencia de diabetes en adultos por intervalo de edades en Encuestas Nacionales de Salud en México (Gutiérrez et al., 2012)

2.1 Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica que se produce cuando el cuerpo no puede producir suficiente insulina o no puede utilizarla efectivamente. La insulina es una hormona producida en el páncreas que permite que la glucosa de los alimentos entre en las células del cuerpo donde se convierte en energía que necesitan los músculos y tejidos para su funcionamiento. Una persona con diabetes no absorbe la glucosa adecuadamente, y la glucosa permanece circulando en la sangre (una condición conocida como hiperglucemia) dañando los tejidos del cuerpo con el tiempo. Este daño puede causar discapacidad y complicaciones de salud que amenazan la vida del paciente (IDF, 2013). Existen tres tipos principales de diabetes:

- Diabetes tipo 1
- Diabetes tipo 2
- Diabetes gestacional

2.1.1 Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 es causada por una reacción autoinmune, donde el sistema de defensa del cuerpo ataca las células beta productoras de insulina en el páncreas. Como resultado, el cuerpo ya no puede producir la insulina que necesita. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero generalmente ocurre en niños o adultos jóvenes. Las personas con esta forma de diabetes necesitan insulina todos los días con el fin de controlar los niveles de glucosa en sangre. Sin insulina, una persona con diabetes tipo 1 moriría. La diabetes tipo 1 suele desarrollarse repentinamente y puede producir síntomas tales como: polidipsia y sequedad en la boca, poliuria, falta de energía, cansancio extremo, polifagia, pérdida repentina de peso, infecciones recurrentes y visión borrosa entre otras. Las personas con diabetes tipo 1 pueden llevar una vida normal y saludable a través de una combinación de terapia diaria con insulina, una estrecha vigilancia, una dieta saludable y ejercicio físico regular. El número de personas que desarrollan diabetes tipo 1 es cada vez mayor (IDF, 2013).

2.1.2 Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 es el tipo más común de diabetes. Por lo general ocurre en adultos, pero cada vez más frecuentemente se observa más en niños y adolescentes. En la diabetes tipo 2, el cuerpo es capaz de producir insulina, pero ésta o no es suficiente o el cuerpo es incapaz de responder a sus efectos (resistencia a la insulina), lo que conduce a una acumulación de glucosa en la sangre. Muchas personas con diabetes tipo 2 desconocen que tienen la enfermedad durante mucho tiempo, ya que los síntomas pueden tardar años en aparecer, tiempo en el cual el cuerpo está siendo dañado por la hiperglucemia. Los síntomas suelen manifestarse sólo cuando las complicaciones de la diabetes ya se han desarrollado. Aunque las razones para el desarrollo de la diabetes tipo 2 todavía no se conocen, hay varios factores de riesgo importantes. Estos incluyen la obesidad, mala alimentación, inactividad física, edad avanzada, antecedentes familiares de diabetes, etnia, altos niveles de glucemia durante el embarazo, entre otros (IDF, 2013).

En contraste con las personas con diabetes tipo 1, la mayoría de las personas con diabetes tipo 2 por lo general no requiere dosis diarias de insulina para sobrevivir. Muchas de las personas son capaces de manejar su condición a través de una dieta sana y una mayor actividad física o fármacos hipoglucemiantes orales. Sin embargo, si no son capaces de regular sus niveles de glucosa en la sangre con la dieta y el ejercicio, se les puede prescribir insulina. El número de personas con diabetes tipo 2 está creciendo rápidamente en todo el mundo. Este aumento se asocia con el desarrollo económico, el envejecimiento de las poblaciones, la creciente urbanización, cambios en la dieta, la reducción de la actividad física y los cambios en el estilo de vida (IDF, 2013).

2.1.3 Diabetes gestacional

Se dice que las mujeres que desarrollan una resistencia a la insulina e hiperglucemia durante el embarazo, tienen diabetes gestacional. Esta, suele ocurrir alrededor de la semana 24 del embarazo. Esta condición surge debido a que la acción de la insulina

está bloqueada, probablemente por las hormonas producidas por la placenta. Como la diabetes gestacional normalmente se desarrolla en una etapa tardía en el embarazo, el feto ya está bien formado. El riesgo inmediato para el bebé por lo tanto, no es tan grave como para aquellos cuya madre tenía diabetes tipo 1 o diabetes tipo 2 antes del embarazo. Sin embargo, una diabetes gestacional no controlada puede tener consecuencias graves tanto para la madre como para el bebé. Una hiperglucemia mal manejada durante el embarazo puede ocasionar un bebé significativamente más grande que el promedio (condición conocida como macrosomía fetal), lo que hace difícil y arriesgado un parto normal. El recién nacido estará en riesgo de lesión en el hombro y problemas respiratorios. En muchos casos, es necesario realizar una cesárea poniendo en riesgo la salud de la madre y el recién nacido. La diabetes gestacional en las madres desaparece normalmente después del parto. Sin embargo, las mujeres que tuvieron diabetes gestacional tienen un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional en los siguientes embarazos y posteriormente de desarrollar diabetes tipo 2. Los bebés nacidos de madres con diabetes gestacional también tienen un mayor riesgo de desarrollar obesidad y diabetes tipo 2. Las mujeres con diabetes gestacional necesitan supervisar y controlar sus niveles de glucosa en sangre para reducir al mínimo los riesgos para el bebé. Normalmente, esto puede hacerse mediante la adopción de una dieta saludable y ejercicio moderado, pero en algunos casos puede ser necesario el uso de fármacos hipoglucemiantes orales (IDF, 2013).

2.2 Diagnóstico de la diabetes

De acuerdo a la organización mundial de salud los niveles de glucosa en sangre entre 70 y 110mg/dL son considerados normales. Una persona se considera como intolerante a la glucosa con niveles de entre 110-126mg/dL de glucosa en sangre en ayunas y/o con 140-200 mg/dL de glucosa en sangre después de 2 horas de ingesta de alimentos. Una persona se considera diabética con niveles superiores a 126mg/dL de glucosa en sangre en ayunas y/o con niveles superiores a 200mg/dL 2 hrs después de consumir alimentos (WHO, 2006).

2.3 Insulina

Como se comentó en la sección 2.1, el principal tratamiento en la diabetes tipo 1 y una alternativa en el tratamiento en la diabetes gestacional y tipo 2 es la insulina. La insulina fue aislada por primera vez del páncreas bovino en 1922 por Banting y Best, en esa época se encontró que la administración oral de la insulina era inefectiva para el tratamiento de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (Banting et al., 1991), desde entonces la ruta subcutánea ha ido la ruta principal de administración de insulina hasta nuestros días (Agarwal & Kahn, 2001).

La insulina es una hormona polipeptídica la cual fue secuenciada por primera vez por Fred Sanger (Sanger, 1959). La insulina viaja a través del torrente sanguíneo. Tiene un peso molecular que dependiendo de su origen es: 5777.66Daltons la insulina porcina, 5733.61Daltons la insulina bovina y 5807.69 Daltons la insulina humana semisintética o biosintética (Singh et al., 2010). Contiene dos cadenas polipeptídicas (**A** y **B**), una cadena **A** que contiene 21 aminoácidos y una cadena **B** que contiene 30 aminoácidos (figura 2) (Harfenist y Craig, 1952). Ambas cadenas se mantienen unidas por puentes disulfuro debido a los grupos de cisteína presentes en ambas cadenas (Sanger, 1949) y también existe un puente disulfuro interno en la cadena **A** (Figura 2) (Ryle et al., 1955). Los tres puentes disulfuro contribuyen a la actividad de la insulina manteniendo una conformación biológicamente activa (Chang et al., 2003; Dai y Tang, 1996) y se conoce que la estructura helicoidal del segmento A12-18 (Figura 3) es esencial para la actividad biológica de la insulina, y aunque segmento A8-10 no está relacionado con tal actividad, es mucho más importante en la unión antigénica con sus anticuerpos (Yang et al., 2000).

2.3.1 Estructura tridimensional de la insulina

La cadena **A** tiene una hélice amino-terminal (**A1-A8**) vinculada a una hélice carboxi-terminal antiparalela (**A12-A20**). La cadena **B** tiene una hélice central (**B8-B19**), flanqueada por hebras amino- y carboxi-terminales (Figura 3).

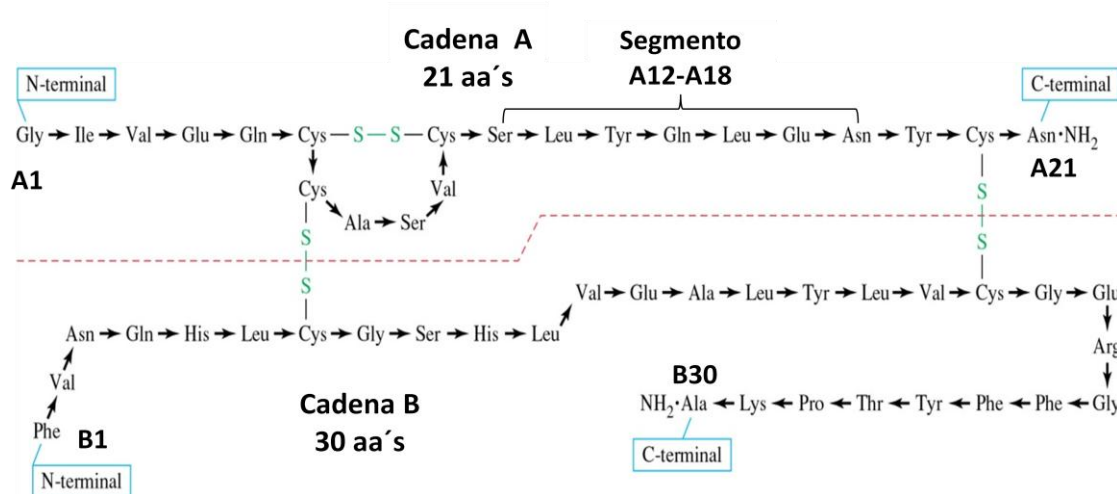


Figura 2 Estructura primaria de la insulina (Sanger, 1959)

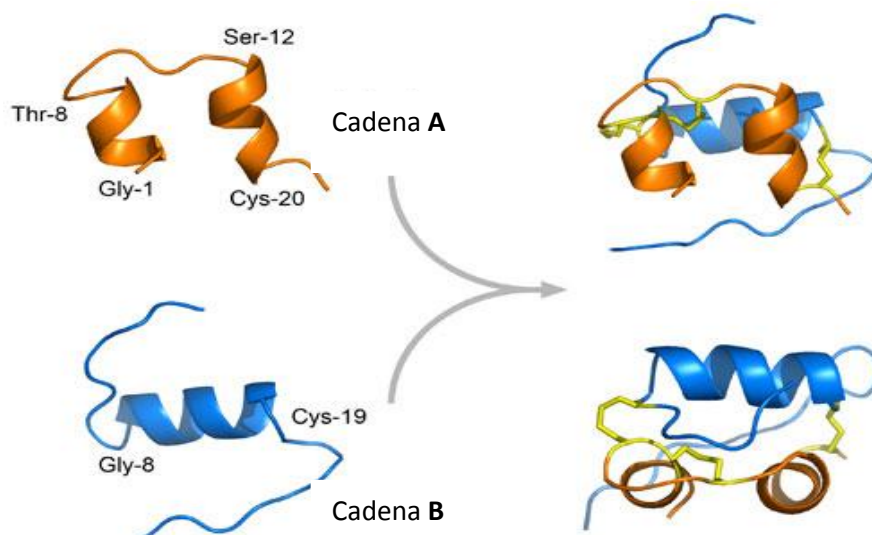


Figura 3 Estructura tridimensional de la insulina (Ryle et al., 1955)

La hormona tiene una estructura tridimensional compacta, que consta de tres hélices y tres puentes disulfuro conservados. Este pliegue básico está presente en todos los miembros de la familia de péptidos de insulina, a pesar de tener secuencias divergentes (Brang and Langkjar, 1993). Un grupo de residuos hidrófobos que forman el núcleo de la proteína pequeña contribuye a la estabilidad de la misma. La estabilidad es aún mayor por la rigidez del esqueleto polipeptídico debido a los tres puentes disulfuro. La insulina existe como un monómero sólo a concentraciones $<0.1\mu\text{M}$. A mayores M. en C. Fernando Cárdenas Bailón

concentraciones la insulina se dimeriza y en presencia de iones zinc tres dímeros se agrupan a concentraciones $>0.01\text{mM}$ formando un hexámero (Figura 4) (Hansen, 1991).

Alrededor de su núcleo, el monómero tiene dos superficies no polares extensas. La primera es plana y en su mayoría aromática, y se esconde durante la formación de dímeros contribuyendo a una estructura de lámina beta antiparalela. La otra superficie es más amplia y se esconde en la formación del hexámero. Curiosamente, la insulina utiliza las mismas superficies para la unión a su receptor que lo hace para auto-ensamblaje (Adams et al., 1969).

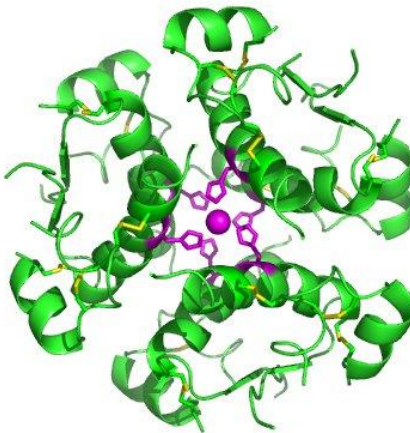


Figura 4 Hexámero de insulina (Hansen, 1991)

2.3.2 Insulinas presentes en el mercado

Antes de los años ochenta, la insulina se extraía de páncreas bovino o porcino. La insulina semisintética se obtenía por un método enzimático, en el que la tripsina cataliza la sustitución de alanina en la posición **B30** de la insulina porcina, con treonina. La insulina así producida tenía la misma secuencia de aminoácidos que la humana y estaba completamente libre de otras hormonas pancreáticas, sin embargo el

rendimiento era muy bajo y el costo de alimentación de animales muy alto (Moriyama et al., 1979).

La producción comercial de insulina humana comenzó en 1982. La ingeniería genética ha permitido la síntesis industrial de insulina humana por la técnica de ADN recombinante. Fragmentos de ADN que codifican para las cadenas **A** y **B** se insertan por separado en plásmidos y luego en una cepa especial de *Escherichia coli* que actúa como un microlaboratorio para la síntesis *in vitro*. Las cadenas de insulina liberadas en el medio se cosechan, purifican y posteriormente se mezclan en condiciones apropiadas para unir las dos cadenas con los enlaces disulfuro (Miller y Baxter, 1980).

Las insulinas humanas presentes actualmente en el mercado incluyen la formulación de acción rápida (regular), la de acción intermedia (NPH y semilenta), la de acción prolongada (ultralenta) y algunos análogos de insulina.

2.3.2.1 Insulina de acción rápida

Es una solución acuosa, clara e incolora con un pH neutro (7-7.8). Se le adiciona metacresol como conservador, glicerol para controlar la osmolaridad así como cloruro de zinc para estabilizar los hexámeros. Los hexámeros son la estructura cuaternaria predominante aunque también existen dímeros y tetrámeros. La molécula tiende a agregarse en el frasco y en el tejido donde se inyecta. Los hexámeros tienen que ser divididos para la absorción de la insulina desde el sitio de la inyección subcutánea. Por esta razón, la insulina regular entra en la circulación general después de una fase de latencia de aproximadamente 30min después de la inyección subcutánea. El pico de la concentración plasmática se alcanza de 2 a 4h y tiene una duración de 6h (Gualandi-Signori y Giorgi, 2001).

2.3.2.2 Insulina de acción intermedia NPH

La absorción de la insulina NPH (por sus siglas en inglés “*Neutral Protamin Hagerdorn*”) se retrasa por la adición de protamina, una proteína extraída del núcleo de esperma de peces, donde su papel es estabilizar el ADN. La forma comercial es insulina isófona NPH una suspensión blanca de cristales ortorrómbicos que contienen 0.9 moléculas de protamina y 2 átomos de Zn por cada hexámero. En el cristal, la protamina regula las interacciones entre dímeros y hexámeros. El vehículo es agua inyectable pH 6.9-7.5. Se le adiciona fenol o metacresol como conservadores. Los cristales de insulina son insolubles en agua y tienden a precipitar al fondo del frasco por lo que la suspensión debe ser agitada varias veces para resuspenderla antes de su uso. La acción de la insulina NPH es más larga que la regular, su absorción empieza a las 1.5h después de la administración subcutánea y su pico en la concentración plasmática lo alcanza entre las 4 y 12h y desaparece en 24h (Jehle et al.1999).

2.3.2.3 Insulina de acción intermedia semilenta

El retraso en la absorción de la insulina sin la adición de protamina se logra por la precipitación de la hormona en presencia de sales de Zn. Cuando la relación molar con respecto a la insulina es mayor a 1, los iones Zn reducen la solubilidad de la insulina en un disolvente neutro. Cuando una solución ácida de insulina se ajusta a un pH 7.4 con un exceso de iones Zn el precipitado resultante es amorfo y tiene un retraso en la absorción moderado después de la inyección subcutánea. Si la insulina se deja cristalizar a pH 5.5 antes de la adición de Zn y el ajuste de pH el precipitado es cristalino. Una mezcla de insulina amorfa con insulina cristalina en proporción 3:7 se le conoce como insulina semilenta. La formulación comercial contiene metilparahidroxibenzoato como conservador y la suspensión tiene un pH 7-7.8. Su inicio de acción es a las 2.5h y el pico en la concentración plasmática es de 7 a 15h. Su efecto desaparece a las 20h (Gualandi-Signori y Giorgi, 2001).

2.3.2.4 Insulina de acción prolongada

La insulina de acción prolongada (ultralenta) es una suspensión acuosa de cristales de zinc-insulina a pH neutro, de aspecto lechoso. Tiene un inicio de acción después de 4h, logra una ligera pero indeseable concentración plasmática máxima a las 7h y sostiene los niveles de insulina en sangre aproximadamente de 8 a 20h (Gualandi-Signori y Giorgi, 2001).

2.3.2.5 Análogos de insulina

En 1996 se comercializó un análogo de insulina en que los aminoácidos en las posiciones **B28** y **B29** fueron invertidos. La inversión le confiere la propiedad de absorción rápida y por lo tanto un inicio de acción rápido. El análogo se le conoce como LysPro, ya que fueron la lisina y la prolina, los aminoácidos transpuestos. La estructura de la molécula impide su tendencia natural a la agregación en hexámeros, ya que la posición **B28** es crucial para su configuración espacial (Howey et al. 1994). Debido a la interacción entre los aminoácidos **B28** y **B23**, dos moléculas de insulina se alinean de forma antiparalela formando un dímero no polar el cual se agrega en hexámeros uniéndose al Zn en preparaciones farmacológicas. Puesto que la modificación del residuo **B28** contrarresta la polimerización de la insulina, el análogo puede inyectarse inmediatamente antes de la comida, ya que actúa en pocos minutos. LysPro mantiene su acción máxima durante 1 a 2h y desaparece después de 3-4h.

En 2001 apareció en el mercado un análogo de insulina de acción prolongada llamado insulina glargina. La insulina glargina se produce a partir de insulina ADN recombinante adicionándole dos residuos arginina al grupo C-terminal (**B30a** y **B30b**) de la molécula. Esta modificación mueve el punto isoeléctrico de 5.4 a 6.7 haciendo la molécula más soluble al pH ácido del vehículo y menos soluble al pH neutro del sitio de inyección subcutánea. También se le hizo la sustitución de asparagina en la posición **A21** por glicina lo cual impide la desaminación y le confiere mayor estabilidad. La insulina glargina es un líquido incoloro pH 4, parecida a la insulina de acción rápida. Forma un

microprecipitado en el tejido asegurando una absorción lenta y estable (Gualandi-Signori y Giorgi, 2001).

2.3.3 Unidades de insulina

En la monografía individual de la farmacopea de los Estados Unidos (USP 30, 2007) se define a la insulina como una proteína capaz de afectar el metabolismo de la glucosa, obtenida de especímenes bovinos o porcinos sanos u ambos. Su potencia, calculada en base seca no es menor de 26.5 unidades de insulina por mg. La insulina etiquetada como purificada contiene no menos de 27 unidades de insulina por mg, calculado en base seca. El contenido de proinsulina, determinado por un método validado (USP 30, 2007) no es mayor a 10ppm. Una unidad de insulina USP es equivalente a 0.0342mg de insulina pura derivada de bovinos y 0.0345mg de insulina pura derivada de porcinos (USP 30, 2007).

Con respecto a la insulina humana, la farmacopea de los Estados Unidos (USP 30, 2007) la define como el principio activo elaborado en el páncreas humano el cual afecta el metabolismo de los carbohidratos (en particular la glucosa), grasas y proteínas. La insulina humana puede ser preparada por modificación enzimática de la insulina porcina para modificar su secuencia de aminoácidos apropiadamente o producida por síntesis microbiana por vía del proceso del ADN recombinante. Su potencia, calculada en base seca no es menor a 27.5 unidades de insulina en cada mg. El contenido de proinsulina, determinado por un método validado al igual que la de origen porcino o bovino (USP 30, 2007) no es mayor a 10ppm. El contenido de proteínas derivadas de la células huésped de la insulina obtenida por ADN recombinante no es mayor a 10ppm. El contenido de DNA derivado de las células huésped o vectores y el contenido de insulina humana obtenida por ADN recombinante que utiliza células eucariotas como huésped se determinan por un método validado (USP 30, 2007). Una unidad de insulina humana es equivalente a 0.0347mg de insulina humana pura (USP 30, 2007).

La insulina es la base del tratamiento para los pacientes con diabetes tipo 1. La insulina es también importante en la diabetes tipo 2 cuando los niveles de glucosa en la sangre

no pueden ser controlados por la dieta, control de peso, ejercicio e hipoglucemiantes orales (Sheeja et al., 2010).

Un control glucémico adecuado es crucial para este tipo de pacientes. La necesidad de inyecciones diarias de insulina de por vida disminuye la aceptación de los pacientes ya que estas son dolorosas y algunos pacientes las consideran incómodas. Además, las inyecciones de insulina se asocian con algunas complicaciones, tales como hipoglucemia periférica.

Dado que la dieta, el ejercicio y la reducción de peso son recomendados como factores para mejorar el control glucémico, el inicio de la terapia con insulina es percibido como un signo de mal cumplimiento por parte de los pacientes y como un signo de empeoramiento de la enfermedad (Marrero, 2007).

Debido a estas razones se han explorado nuevas rutas para la administración de insulina, incluyendo la transdérmica, nasal, pulmonar, bucal y rectal (Kinesh et al., 2010). Todas estas rutas presentan ciertas ventajas en comparación con la ruta subcutánea, sin embargo en todos los casos, hay un gran número de barreras que todavía se tienen que superar y ninguna de estas rutas ha demostrado ser una alternativa potencial a la inyección subcutánea (Mukherjee et al., 2008).

Diferentes autores concuerdan en que la administración oral de insulina sería una forma más cómoda para su administración y también mejoraría la aceptación de los pacientes en comparación con las inyecciones subcutáneas (Dekel et al., 2010; Jelvehgari et al., 2010; Lowman et al., 1999; Silva et al., 2006).

Bajo condiciones fisiológicas normales el hígado recibe hasta el 75% de su suministro de sangre del tracto digestivo (venas portales) la cual contiene el 100% de la insulina producida por el páncreas. La insulina es entonces enviada primeramente al hígado en respuesta a los altos niveles de glucosa en sangre. El hígado metaboliza alrededor del 50-60% de la insulina secretada con un tiempo de vida media de 3-5min (Lopes et al., 2014). Sin embargo, en pacientes diabéticos tratados con insulina subcutánea la proporción se invierte, el hígado metaboliza solo el 30-40% de la insulina exógena y el resto se metaboliza en el riñón. La principal desventaja de la insulina subcutánea es que la insulina no sigue la ruta metabólica natural en el cuerpo humano por lo que es

difícil mantener el control adecuado de los niveles glucémicos del paciente (Lopes et al., 2014). Además es bien sabido que todas las formulaciones de insulina presentes en el mercado presentan una gran variabilidad intra e inter individuos (10-52%) en la absorción de la insulina y son responsables de los episodios hipoglucémicos nocturnos en pacientes diabéticos (Gualandi-Signori y Giorgi, 2001). Por lo tanto, la vía oral es la alternativa más conveniente y fisiológicamente relevante, ya que después de la absorción gastrointestinal, la insulina se canalizaría directamente desde el intestino hasta el hígado haciéndola pasar por el metabolismo de primer paso en el hígado con lo que se lograría una mejor homeostasis de la glucosa y por lo tanto evitaría los efectos hipoglucemiantes periféricos, con la desventaja de tener que administrar una mayor cantidad de insulina para compensar la pérdida por el metabolismo de primer paso en el hígado (Agarwal & Kahn, 2001; Hoffman & Ziv, 1997; Kennedy, 1991; Marschütz et al., 2000; Sajeesh & Sharma, 2006).

Por este motivo, en la última década se han hecho numerosos esfuerzos para desarrollar un sistema adecuado para la administración oral de insulina con un grado variable de éxito. La mayoría de estos esfuerzos, han sido realizados utilizando técnicas de microencapsulación y nanoencapsulación por lo que en el presente trabajo se abordó la problemática de la administración oral de insulina combinando dos técnicas de microencapsulación.

2.4 Retos y obstáculos asociados con la administración oral de insulina

La administración de péptidos terapéuticos tales como insulina a través de la vía oral (tracto gastrointestinal) representa uno de los mayores retos en la tecnología farmacéutica moderna (Singh et al., 2010). En el caso de la insulina, los tres problemas principales reportados en la literatura para su administración por vía oral son: 1) la degradación de la insulina por el bajo valor de pH en el jugo gástrico, así como la degradación enzimática por la pepsina en el estómago y la tripsina y α -quimotripsina en el intestino, 2) la baja permeabilidad a través del epitelio intestinal debido a su alto peso molecular y la falta de carácter lipofílico, 3) su inestabilidad física (precipitación isoeléctrica o inducida por iones, fibrilación, adsorción) y 4) su inestabilidad química

(hidrólisis por desaminación, rompimiento de la cadena peptídica por exceso de iones Zn, formación de productos de transformación de alto peso molecular por exposición a altas temperaturas) (Argawal y Kahn, 2001; Kinesh et al., 2010; Krauland et al., 2004; Lin et al., 2007; Mukherjee et al., 2008; Singh et al., 2010).

2.5 Transporte intestinal de la insulina

En cuanto a la permeabilidad de la insulina a través del epitelio intestinal, durante muchos años se desconocía si la insulina era capaz de cruzar la barrera epitelial del intestino sin alterar su configuración tridimensional y por lo tanto su actividad biológica. Shilling y Mitra (1990), no encontraron evidencia de transporte activo de insulina a través del intestino, sin embargo, encontraron una difusión pasiva no facilitada como mecanismo de transporte estimando coeficientes aparentes de permeabilidad de la insulina a través de varios segmentos del tracto gastrointestinal, con valores de $0.078 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ para el duodeno, $0.497 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ para el yeyuno y $0.682 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ para íleo los cuales son bajos comparados con los calculados para otros fármacos de menor peso molecular como propanolol ($41.9 \times 10^{-6} \text{cm/s}$), hidrocortisona ($21.5 \times 10^{-6} \text{cm/s}$), ácido acetilsalicílico ($2.4 \times 10^{-6} \text{cm/s}$) y vasopresina ($0.13 \times 10^{-6} \text{cm/s}$) (Artusson y Karlsson, 1991).

Entonces, la administración selectiva de la insulina a los dos últimos tercios del intestino delgado, que debería también disminuir la exposición a las enzimas pancreáticas, puede asegurar una mejor absorción gastrointestinal de la insulina (Shilling y Mitra 1990). En otro estudio, Bendayan et al. (1990) revelaron el mecanismo mediante el cual la insulina se transfiere del epitelio del íleo a la circulación de la sangre. Demostraron que las moléculas de insulina fueron interiorizadas por endocitosis y alcanzaron por medio de pequeñas vesículas endosómicas, la membrana plasmática baso-lateral donde fueron secretadas en el espacio intersticial conservando su bioactividad. En un estudio similar, Bendayan et al. (1994) repitieron el experimento pero ahora en el duodeno y el colon, demostrando el mismo mecanismo. Sin embargo ambos experimentos se realizaron en presencia de colato de sodio 10mg/mL (un potenciador

de absorción), y no se realizó un experimento blanco sin la presencia de colato de sodio, por lo tanto el papel de este potenciador sigue siendo poco claro. Finalmente, Kavimandan y Peppas (2008) elucidaron la vía paracelular como una ruta principal de transporte de la insulina en células Caco-2 por un análisis microscópico confocal, utilizando hidrogeles de complejación como acarreadores.

2.6 Estabilidad de la insulina en el sistema de entrega

En cuanto a la estabilidad, la actividad de la insulina depende de su estructura tridimensional. El desarrollo del sistema de entrega de la insulina puede exponerla a condiciones extremas que pueden alterar su estructura. Durante el desarrollo del sistema de entrega, la insulina puede ser sujeta a degradación física y química que implica la modificación de la estructura nativa. Si la insulina necesita sobrevivir al tránsito a través del estómago y el intestino, es muy importante el conocimiento y la evaluación de los parámetros de estabilidad durante el procesamiento de la formulación (Agarwal & Kahn, 2001; Singh et al., 2010).

2.7 Estrategias para mejorar la absorción gastrointestinal de la insulina

Las estrategias para mejorar la absorción gastrointestinal oral de la insulina han sido ampliamente descritas en la literatura y se pueden resumir en estos 4 puntos: 1) proteger la insulina de la degradación enzimática en el estómago e intestino, 2) promover la absorción gastrointestinal, 3) sistemas de entrega mucoadhesivos para mejorar el contacto de la insulina con la membrana mucosa que recubre el tracto gastrointestinal y 4) vehículos tales como microesferas y nanopartículas, que pueden mejorar la absorción gastrointestinal de la insulina (Agarwal y Khan, 2001; Kinesh et al., 2010; Sarmiento et al., 2007a; Singh, 2010).

2.8 Revisión bibliográfica de sistemas acarreadores para administración oral de insulina

Cárdenas-Bailón et al. (2013) realizaron una revisión extensa sobre los distintos métodos y estrategias de encapsulación de insulina para su administración oral. En esta revisión se encontró que en general existen tres enfoques para la preparación de insulina en microcápsulas o nanopartículas. En el primer enfoque se han utilizado lípidos para la preparación de las microcápsulas como material encapsulante, en el segundo enfoque se han utilizado polisacáridos para la preparación de los acarreadores y en último enfoque se han utilizado estrategias combinadas. Una de las conclusiones fue que utilizando estrategias combinadas se han obtenido mejores resultados que en aquellos casos donde se ha utilizado una técnica de microencapsulación simple.

2.8.1 Métodos de encapsulación utilizando lípidos como material encapsulante

Se ha demostrado que los sistemas de microencapsulación utilizando sustancias de naturaleza lipídica como material encapsulante son adecuados para mejorar la administración oral de proteínas y péptidos (Constantinides et al., 1994; Ritschel, 1991; Trenkrog et al., 1991). Con base en esto, varios investigadores han intentado formular insulina en microcápsulas o nanocápsulas utilizando lípidos como material encapsulante. Las técnicas de microencapsulación de insulina en sistemas lipídicos pueden clasificarse como: emulsión doble agua en aceite en agua W/O/W por sus siglas en inglés "*Water in oil in water*", polimerización interfacial de microemulsiones, sistemas de entrega auto emulsionantes, microemulsiones simples W/O por sus siglas en inglés "*Water in oil*" y nanopartículas de lípidos sólidos (Cárdenas-Bailón et al., 2013).

En el Cuadro 1 se puede observar un breve resumen de las técnicas de microencapsulación de insulina en sistemas lipídicos. En general, parece que ciertos lípidos actúan como potenciadores de absorción de la insulina a través de la capa epitelial en el intestino, aunque el mecanismo no ha sido elucidado totalmente. Algunos autores afirman que este hecho se debe a cambios en la permeabilidad de la membrana epitelial y los resultados muestran que las microcápsulas o nanopartículas a base de lípidos son acarreadores potenciales para la administración oral de insulina.

Cuadro 1 Resumen de técnicas de microencapsulación utilizando lípidos como material encapsulante

Técnica de Microencapsulación	Agente Encapsulante	Surfactante Utilizado	Diámetro Promedio	Eficiencia de Encapsulación	Efecto Biológico	Referencia
Emulsión doble W/O/W	Triglicéridos de cadena media MCT/Aceite de Soya	Abil EM 90, Tween 80	7.3-12µm	>95%	Reducción de hasta 40% de los niveles glucémico después de 120 min de la administración oral (5.4mg/kg).	Cunha et al. (1997a), (1997b), (1998)
	Aceite de Soya/ Trioleina/Trilinoleina	Fosfatidilcolina de Yema, Span 80, Tween 80	No Reportado	No Reportado	Eficacia relativa de 12% comparada con la inyección s.c de insulina administrada en el colon de ratas (3UJ/kg s.c. vs 50UJ/kg oral).	Morishita et al. (1998)
Emulsión doble W/O/W	Migliol 810	copolíol	9 -18µm	>90%	No Reportado.	Courmarie et al. (2004a), (2004b).
	Aceite de Pescado	Copolimero de óxido de etileno & óxido de				
Polimerización Interfacial de Microemulsiones	Aceite de soya	Decaglicerol MonoLaurato	700nm	>95%	Reducción de hasta 40% de los niveles glucémicos después de 4 horas de administración oral (50UJ/kg).	Shima et al. (2006)
	Parafina/Ácido metacrílico copolímero/ Gelatina	NA	180 to 500µm	78%	Eficacia relativa de 2.1% en ratas diabéticas (1UJ/kg s.c. vs 20UJ oral)	Morishita et al (1992a)(1992b)
Polimerización Interfacial de Microemulsiones	Triglicéridos de cadena media MCT mono & diglicéridos. Cianoacrilato	Polisorbato 80, sorbitan monooleato	200-210nm	>84.3%	Reducción de 30% de los niveles glucémicos después de 6 hrs de administración oral (50UJ/kg)	Wathasirichaikul et al. (2002)
	Isopropil miristato/Etil cianoacrilato/Butil cianoacrilato	Caprilcaproil macroglicéridos/ Poly glicerol oleato	190-442nm	50%	Reducción de hasta 40% en los niveles glucémicos después de 36 horas de administración oral (100UJ/kg).	Graf et al. (2009)

Cuadro 1..Cont

Técnica de Microencapsulación	Agente Encapsulante	Surfactante Utilizado	Diámetro Promedio	Eficiencia de Encapsulación	Efecto Biológico	Referencia
Sistemas de Entrega Auto-emulsificantes	Poliitilenglicol-8-glycol octanoateo/decanoato	Polyglicerol-3-oleato	257-264nm	99.2%	Biodisponibilidad oral 15.2% en perros diabéticos (0.5UI/kg s.c. vs 2.5UI/kg oral)	Ma et al. (2006a)
	Gliceril mono linoleateo α -tocoferol	Yema de huevo, Cremofor, Transcutol, Propilen glicol	1 μ m	No Reportado	Biodisponibilidad oral de 6.87% en beagles diabéticos (2UI/kg s.c. vs 20UI/kg oral)	Singnurkar & Gidwani (2008)
Emulsión Simple W/O	CHIT/Ácido Oleico	Poligliceril 6 dioleato Gliceridos Caprilico/caprico	108nm	77%	Biodisponibilidad oral 7.0% en ratas diabéticas (1UI/kg s.c. vs 50UI/kg oral)	El-Sayed et al. (2009)
	Triacetina	Bromuro de Didoceidimetilammon io/ Propilen glicol	161nm	85%	Reducción de 37% de los niveles glicemicos después de 6 horas de la administración oral (20UI/kg).	Sharma et al. (2010)
Nanopartículas de Lípidos Sólidos	Cetil palmitato	Polaxamero 407	361nm	43%	Biodisponibilidad oral de 5.1% en ratas diabéticas. (2.5UI/kg s.c. vs 50UI/kg oral)	Sarmento et al. (2007a)
	Ácido Esteárico, Fosfolípidos de soya	Polaxamero 188	162nm	76.4%	Biodisponibilidad oral del 13.86% en ratas diabéticas (2 UI/kg s.c. vs 25UI/kg oral)	Zhang et al. (2012b)

Además, estos acarreadores han demostrado proteger la insulina contra la degradación enzimática en el intestino y muestran buenas propiedades de liberación a valores de pH intestinal; sin embargo, los valores de biodisponibilidad oral han sido bajos.

Del Cuadro 1 se observa claramente que los sistemas más adecuados para la administración oral de insulina dentro de microcápsulas a base de lípidos son el sistema de emulsión doble del tipo W/O/W reportado por Morishita et al. (1998), así como el sistema de administración auto-emulsionante desarrollado por Ma et al. (2006a) y el de nanopartículas de lípidos sólidos reportado por Zhang et al. (2012b), puesto que los valores de biodisponibilidad oral reportados para estos sistemas son de 12%, 15% y 13.8% respectivamente.

2.8.2 Métodos de encapsulación utilizando biopolímeros como material encapsulante

Se han utilizado diferentes biopolímeros para preparar microcápsulas o nanocápsulas de insulina debido a su capacidad para proteger a la insulina a valores de pH del jugo gástrico y por su capacidad para liberar los fármacos en valores de pH intestinal. También, se ha demostrado que ciertos biopolímeros tienen propiedades mucoadhesivas en diferentes partes del epitelio intestinal.

En la década de los 90's, se hicieron los primeros intentos de microencapsulación de insulina utilizando distintos biopolímeros. Las principales técnicas de microencapsulación o nanoencapsulación de insulina para administración oral con biopolímeros reportadas en la literatura pueden clasificarse como: geles por complejación con respuesta al pH, gelificación ionotrópica interna, coacervación compleja, métodos de evaporación del disolvente y algunos enfoques combinados (Cárdenas-Bailón et al., 2013).

Cuadro 2 Resumen de técnicas de micro encapsulación de insulina utilizando biopolímeros como material encapsulante

Técnica de Microencapsulación	Agente Encapsulante	Surfactante Utilizado	Diámetro Promedio	Eficiencia de Encapsulación	Efecto Biológico	Referencia
	Ácido Metacrilico/polietilenglicol metacrilato.	NA	<1µm	94%	Biodisponibilidad oral de 2.44% en ratas diabéticas (1UI/kg s.c. vs 50 UI/kg oral)	Lowman et al. (1999)
	Pectina Amidada	NA	No Reportado	74-85%	No Reportado	Musabayane et al. (2000)
	Ácido Acrílico o ácido metacrilico/ polietilenglicol metacrilato.	NA	260nm	18%	Reducción del 25% de los niveles glucémicos después de 6 horas de administración oral (50 UI/kg)	Foss et al. (2004)
Geles por complejación con respuesta al pH	Ácido metacrilico/ etilenglicol	NA	<53µm	88%	Biodisponibilidad oral del 7.4% en ratas diabéticas (1UI/kg vs 25 UI/kg)	Morishita et al. (2006)
	CHIT/Sulfato de dextrano	NA	489nm	85.4%	Biodisponibilidad oral de 5.6% en ratas diabéticas (2.5 UI/kg s.c. vs 50 UI/kg oral)	Sarmento et al. (2006, 2007b)
Coacervación Compleja	Trimetil CHIT cisteína tiolado	NA	120-160nm	93%	Reducción del 30% de los niveles glucémicos después de 3 horas de administración oral (50 UI/kg)	Yin et al. (2009)
	CHIT/Ácido metacrilico	NA	200nm	30%	No Reportado	Jelvehgari et al. (2010)
	CHIT/Ftalato de Hidroximetil celulosa	NA	255nm	60.88%	Biodisponibilidad oral 8.4% en ratas diabéticas (1UI/kg s.c. vs 2.5UI/kg oral)	Makhlof et al. (2011)
	Eudragit L100 Tiolado	NA	324nm	92.2%	Biodisponibilidad oral 7.3% en ratas diabéticas (5UI/kg s.c. vs 50UI/kg oral)	Zhang et al. (2012a)

Cuadro 2 Cont...

Técnica de Microencapsulación	Agente Encapsulante	Surfactante Utilizado	Diámetro Promedio	Eficiencia de Encapsulación	Efecto Biológico	Referencia
Gelificación Ionotrópica Interna	Ácido metacrílico/ Etilenglicol metacrilato	NA	500-800nm	86%	No Reportado	Sajeesh & Sharma (2006)
	Alginato/Sulfato de dextrano	NA	68-108 µm	>94%	No Reportado	Silva et al. (2006)
Técnicas de evaporación de disolvente	Ácido Acrílico	Polisorbato 20, alcohol polivinílico	32µm	80%	Reducción del 25% de los niveles glucémicos después de 2 horas de administración oral en conejos diabéticos (6.6 UI/kg)	Jain et al. (2005)
	Ácido poli láctico co glicolido	Arlacel 83/alcohol polivinílico	9µm	81%	No Reportado	Liu et al. (2006)
	Ácido poli láctico co glicolido	Alcohol polivinílico SPC	261nm	88.5%	Biodisponibilidad oral 7.7% en ratas diabéticas (1UI/kg s.c. vs 20UI/kg oral)	Cui et al. (2006)
Técnicas de evaporación de disolvente	Poli(ácido fumárico-co-ácido sebáico) anhídrido	Trioleato de Sorbitan (Span 85)	1-5µm	100%	Biodisponibilidad oral entre 5.5% y 23% en ratas diabéticas (2UI/kg s.c. vs 250UI/kg oral) y 5.5% en perros diabéticos (2UI/kg s.c. vs 50UI/kg oral)	Mathiowitz et al. (2008)
	Ácido polilactico co glicolido/CHIT	Pluronic 188	134nm	52.76%	Biodisponibilidad oral 10.5% en ratas diabéticas (1UI/kg s.c. vs 15UI/kg oral)	Zhang et al. (2012a)

Cuadro 2 Cont..

Técnica de Microencapsulación	Agente Encapsulante	Surfactante Utilizado	Diámetro Promedio	Eficiencia de Encapsulación	Efecto Biológico	Referencia
	Dextrano acoplado a derivados de vitamina B ₁₂	NA	251nm	70-80%	Biodisponibilidad oral 29.4% en ratas diabéticas (0.4UI/kg s.c. vs 20UI/kg oral)	Chalasanani et al. (2007a, 2007b)
	Sulfato de dextrano, CHIT seroalbumina bovina	Polaxamero 188	396nm	No reportado	Biodisponibilidad oral 13.12% en ratas diabéticas (5UI/kg s.c. vs 50UI/kg oral)	Woitiski et al. (2010)
Enfoques Combinados	Alginato/CHIT	NA	7.5µm	56%	Reducción del 56% de los niveles glucémicos después de 12 horas de administración oral (100 UI/kg)	Zhang et al. (2011)
	Eurdragit RS	Alcohol Polivinílico	285nm	73.9%	Biodisponibilidad oral 9.2% en ratas diabéticas (5UI/kg s.c. vs 50UI/kg oral)	Wu et al. (2012)
	Ácido poliláctico go glicolido acoplado a ácido fólico	NA	258nm	87.7%	Biodisponibilidad oral 20.4% en ratas diabéticas (5UI/kg s.c. vs 50UI/kg oral)	Jain et al. (2012)

NA = No Aplica

En el Cuadro 2 se presenta un breve resumen de las técnicas de microencapsulación reportadas en la literatura para la microencapsulación de insulina utilizando biopolímeros. Es evidente que durante 15 años fue difícil superar valores de biodisponibilidad oral del 10% de insulina administrada por vía oral comparada con la vía parenteral utilizando biopolímeros como material encapsulante. Sin embargo, desde 2007 hasta la fecha, se han observado algunos avances.

La microencapsulación de insulina utilizando biopolímeros como material encapsulante es bastante prometedora para el desarrollo de una formulación destinada a la administración oral de insulina. Los resultados más recientes son muy optimistas sobre todo aquellos reportes con biodisponibilidades orales superiores al 10%. De los datos mostrados en el Cuadro 2, se puede observar que las técnicas reportadas por Chalasani et al. (2007a), Mathiowitz et al. (2008), Woitiski et al. (2010), Zhang et al. (2012a) y Jain et al. (2012) han mostrado los valores más altos de biodisponibilidad oral reportados hasta el momento (29.4%, 23%, 13.12%, 10.5% y 20.4%, respectivamente.

La mayoría de estos valores son superiores a los reportados para las técnicas de microencapsulación de insulina en lípidos.

Se puede concluir que algunos lípidos pueden actuar como potenciadores de absorción de la insulina en el intestino. De entre las técnicas reportadas de encapsulación a base de lípidos, la técnica de emulsión doble del tipo W/O/W es una de las más promisorias para la encapsulación de insulina para administración oral

De acuerdo a lo mencionado por Prusty y Sahu, (2009) de entre todos los métodos de encapsulación de insulina en biopolímeros, la coacervación compleja junto con la gelificación iótopica son los métodos más eficientes para la encapsulación de fármacos de naturaleza proteica. Además Cárdenas-Bailón et al. (2013) mencionaron que los enfoques combinados han tenido mejores resultados en la administración oral de la insulina. Es por eso que en el presente trabajo se abordó el problema de la administración oral de insulina utilizando un método combinado de microencapsulación utilizando una emulsión doble del tipo W/O/W y la coacervación compleja por lo que en seguida se aborda brevemente estos métodos de manera teórica.

2.9 Emulsiones dobles del tipo agua en aceite en agua

Las emulsiones dobles del tipo agua en aceite en agua W/O/W por sus siglas en inglés “*water in oil in water*” consisten de gotas de agua dispersas en grandes glóbulos de aceite los cuales están dispersos a su vez en una fase acuosa continua (McClements, 2005). Aprovechando su estructura de doble compartimento (Figura 5), ha surgido un interés creciente hacia las emulsiones dobles, desde su primera descripción en 1925 (Seifriz, 1925), al ser consideradas como reservorios de sustancias encapsuladas para ser liberadas bajo condiciones variables. Las emulsiones dobles tienen un gran número de aplicaciones potenciales en el campo farmacéutico, cosmético y alimenticio (Aserin, 2008). Las emulsiones dobles W/O/W permiten la encapsulación de moléculas activas en la fase acuosa interna (Fi), y esto hace posible enmascarar sabores u olores; proteger contra la oxidación, luz o degradación enzimática; o para asegurar la liberación controlada de los ingredientes activos encapsulados (Aserin, 2008).

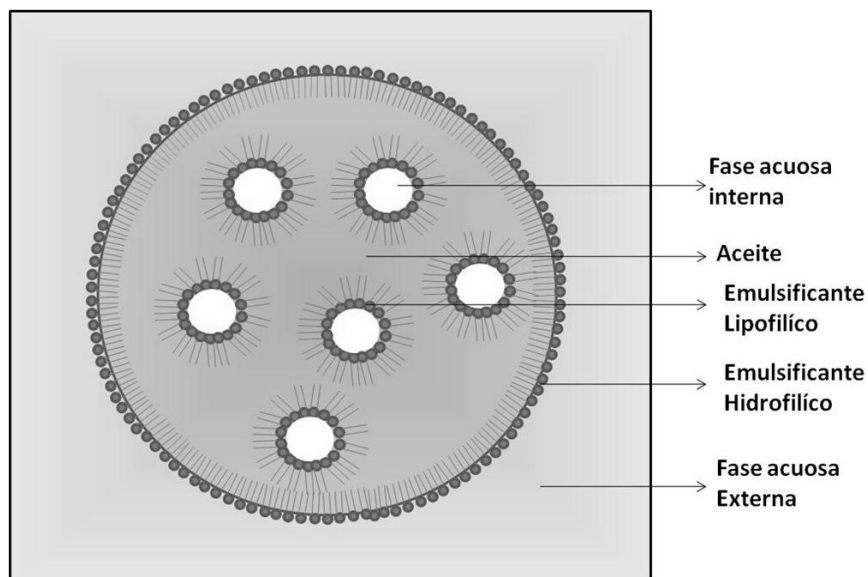


Figura 5 Esquema de una emulsión doble agua en aceite en agua (McClements, 2005)

Las emulsiones dobles se preparan tradicionalmente mediante el método de dos etapas con dos tensoactivos de solubilidad opuesta. Para producir una emulsión doble W/O/W, primero un tensoactivo con un valor de balance hidrófilo-lipófilo bajo ($HLB < 5$) es disuelto en aceite. Después, se añade la fase acuosa interna, se homogeniza y se

forma una emulsión W/O. El sistema es emulsionado nuevamente en una solución acuosa de tensoactivo con un HLB alto (>10) para producir una emulsión doble W/O/W. Ambos tensoactivos se mezclan en las interfaces agua/aceite y el tiempo de vida de las películas formadas en las interfaces es gobernada por la composición de la mezcla binaria de surfactantes (Pays et al., 2001).

Uno de los tensoactivos mas utilizados en la preparación de emulsiones del tipo W/O es el polirricinoleato de poliglicerilo (PGPR). El PGPR (HLB=4.3) se fabrica por la esterificación de poliglicerol con los ácidos grasos del aceite de ricino condensado. La estructura típica del PGPR se muestra en la Figura 6. Los ácidos grasos del aceite de ricino están compuestos en un 80-90% de ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenóico) un ácido graso omega 9 insaturado que se encuentra naturalmente en el aceite de ricino (*Ricinus communis* L. Euphorbiaceae, también llamado castor o tártago).

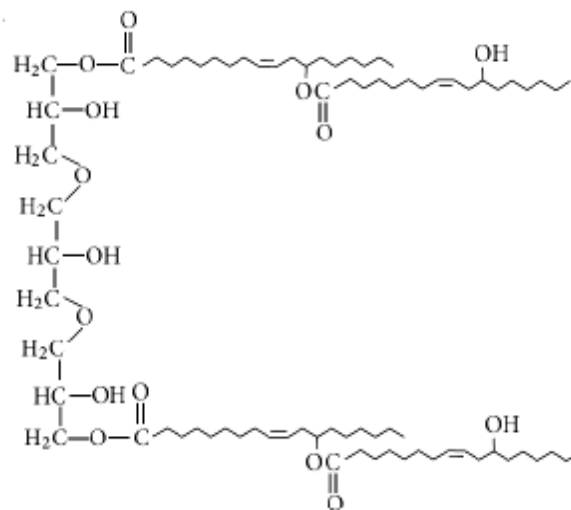


Figura 6 Estructura química del polirricinoleato de poliglicerilo (Bastida-Rodríguez, 2013)

El PGPR es soluble en éter, hidrocarburos e hidrocarburos halogenados pero insoluble en agua o etanol. El PGPR es ampliamente conocido por sus excelentes propiedades emulsificantes para la preparación de emulsiones del tipo W/O en la industria

alimentaria ya que forma emulsiones W/O bastante estables con un contenido de hasta el 80% de fase acuosa (Bastida-Rodríguez, 2013). Por tal motivo se trabajó con PGPR como emulsificante lipofílico en esta investigación para la formulación de las emulsiones W/O. Como fase continua en la emulsión W/O se utilizó aceite de soya. Varios autores ya han reportado el uso de aceite de soya como fase continua en emulsiones W/O (Morishita et al., 1998; Shima et al., 2006; Iqbal et al., 2013) para la posterior formación de una emulsión doble W/O/W. Una de las ventajas de utilizar aceite de soya en la preparación de las emulsiones dobles W/O/W es que el aceite de soya está clasificado como un aceite poliinsaturado el cual contiene 15% de ácidos grasos saturados, 24% de ácidos grasos monoinsaturados y 61% de ácidos grasos poliinsaturados de las cuales 53.2% es el ácido linoleico y 7.8% de ácido linolénico. Varios estudios han demostrado que el aceite de soya es efectivo en reducir el colesterol sérico y los niveles de lípidos de baja densidad (LDL), problemas comúnmente asociados con pacientes diabéticos (Karasulu et al., 2011).

2.10 Coacervación compleja

La coacervación es la separación en dos fases líquidas de sistemas coloidales. La fase más concentrada en el componente coloidal es el coacervado y la otra fase es la solución en equilibrio. La separación de fases asociativa de dos polímeros en agua ocurre si existe una atracción electrostática. La coacervación compleja es la coacervación originada por la interacción de dos coloides con cargas opuestas (generalmente una proteína con un polisacárido). Con el fin de distinguirla de la coacervación simple (un solo polímero) se le nombró coacervación compleja. En la mayoría de los casos, los coacervados son de naturaleza sólida (precipitados) (Kruif et al., 2004).

La microencapsulación por coacervación compleja se logra modificando el pH de una solución binaria de proteína y polisacárido hasta llegar al pH de coacervación (máxima atracción electrostática entre los coloides) y la subsecuente deposición del coacervado formado alrededor del material a encapsular (Figura 7), suspendido o emulsificado en el

mismo medio de reacción. Las microcápsulas producidas por coacervación compleja son insolubles al pH de coacervación por lo que existe separación de fases y tienen excelentes propiedades de liberación controlada así como de resistencia al calor (Mendanha et al., 2009)

2.10.1 Potencial Z

Una propiedad física para caracterizar el proceso de coacervación compleja es la medición del potencial Z tanto de los polímeros individuales como de sus mezclas binarias.

Por su tamaño microscópico, las fuerzas de unión en la superficie del coloide y el líquido son las que determinan su comportamiento. Uno de los mayores efectos de la superficie son los fenómenos electrocinéticos. Cada coloide contiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa, aunque también puede ser positiva. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre las partículas del coloide. Si la carga es suficientemente elevada los coloides permanecen dispersos en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se aglomeran y sedimentan fuera de la suspensión (Myers, 1999).

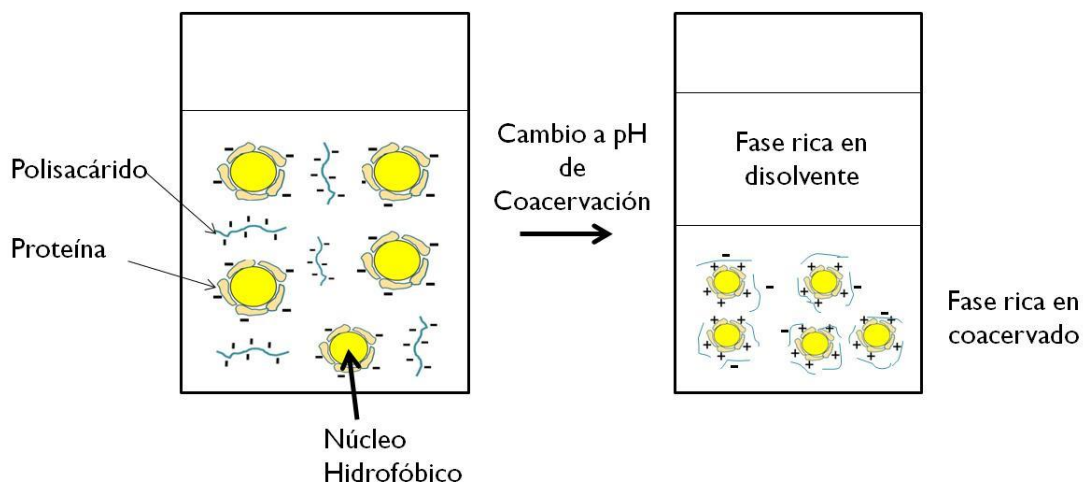


Figura 7 Microencapsulación por coacervación compleja (Mendanha et al., 2009)

Se utiliza el modelo de la doble capa de Gouy-Chapman-Stern (Figura 8) para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión.

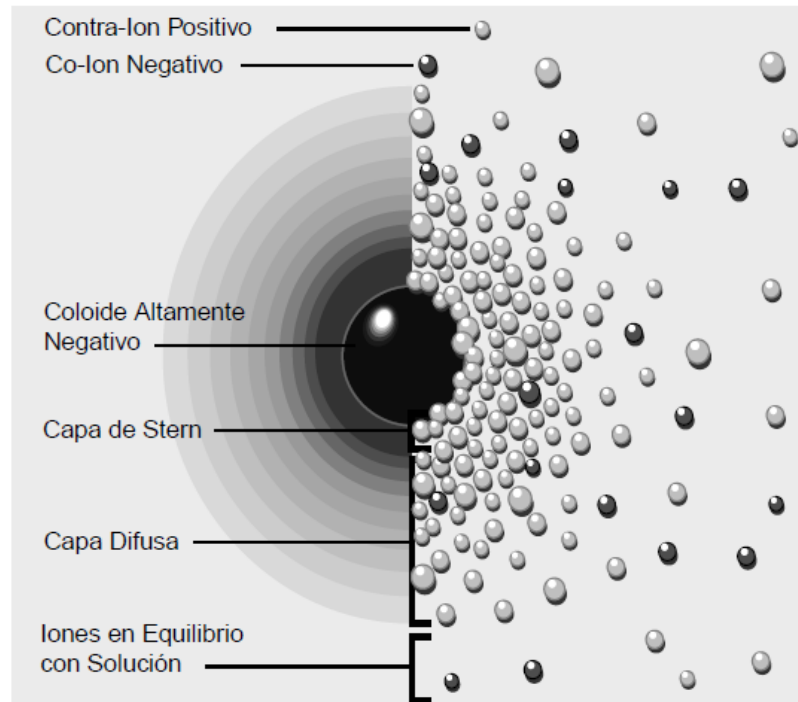


Figura 8 Modelo de la doble capa de Gouy-Chapman-Stern alrededor de una partícula coloidal cargada negativamente (Myers, 1999)

Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de una sola partícula negativa del coloide, si los iones que neutralizan sus cargas son repentinamente eliminados. Primeramente se analizará el efecto de la partícula coloidal sobre el ión positivo (llamado contra-ión) en la solución. Inicialmente, la atracción de la partícula negativa hace que algunos iones positivos formen una rígida capa adyacente alrededor de la superficie de la partícula coloidal; esta capa de contra-iones es conocida como la capa de Stern. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por la partícula coloidal negativa, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse a la partícula coloidal. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una capa difusa de contra-iones. Los contra-iones tienen una alta concentración cerca de la superficie de la partícula, la cual

disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución (Myers, 1999).

En forma similar, aunque opuesta, en la capa difusa hay un déficit de iones negativos, llamados co-iones pues tienen la misma carga que la partícula coloidal. Su concentración se incrementa gradualmente al alejarse de la partícula coloidal, mientras que las fuerzas repulsivas de la partícula coloidal son compensadas por los iones positivos, hasta alcanzar nuevamente el equilibrio. La capa difusa puede ser visualizada como una atmósfera cargada rodeando a la partícula coloidal. A cualquier distancia de la superficie, la densidad de carga es igual a la diferencia de concentración entre iones positivos y negativos. La densidad de carga es mucho mayor cerca del coloide y gradualmente disminuye a cero cuando las concentraciones de iones positivos y negativos se asemejan. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa son los que juntos se les conoce como la doble capa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución (Myers, 1999).

La partícula coloidal negativa y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa (Figura 9). La caída del potencial y la distancia desde la partícula coloidal es un indicador de la fuerza repulsiva entre las partículas del coloide en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego.

Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta (Figura 9), el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre las partículas coloidales (Myers, 1999).

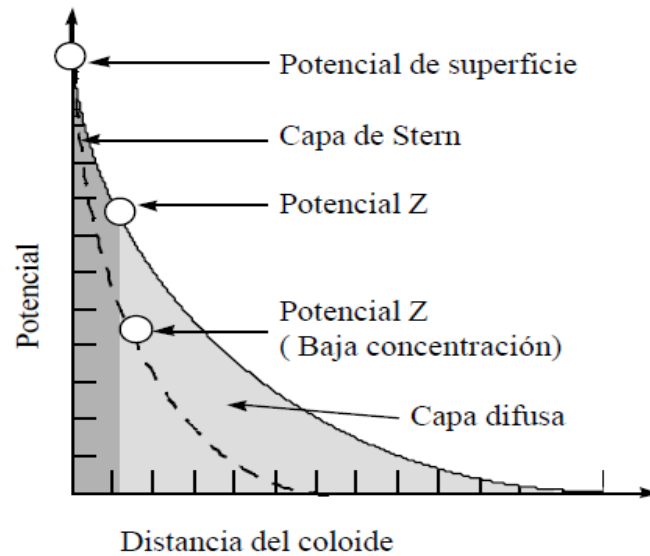


Figura 9 Medición de potencial Z en una partícula coloidal cargada (Myers, 1999)

La magnitud del potencial Z proporciona una idea de la estabilidad del sistema coloidal. Si todas las partículas coloidales en suspensión tienen un potencial Z negativo o positivo elevado entonces tienden a repelerse entre sí sin haber floculación del sistema. Sin embargo, si todas las partículas coloidales en suspensión tienen un potencial Z bajo, entonces las fuerzas de repulsión de las partículas disminuyen y tienden a flocular. La línea divisoria entre las suspensiones estables y no estables generalmente se toma en $+30\text{mV}$ y -30mV (Figura 10). Las suspensiones con partículas coloidales con potencial Z mayor a $+30\text{mV}$ y menor a -30mV se consideran estables. El factor más importante que afecta el potencial Z es el pH. Un valor de potencial Z sin su valor de pH correspondiente es prácticamente inútil (Myers, 1999). El punto donde la gráfica de potencial Z a diferentes valores de pH pasa por 0, se le conoce como el punto isoeléctrico y es de gran importancia práctica ya que en ese punto el sistema es menos estable ocasionando la floculación de las partículas coloidales (Figura 10).

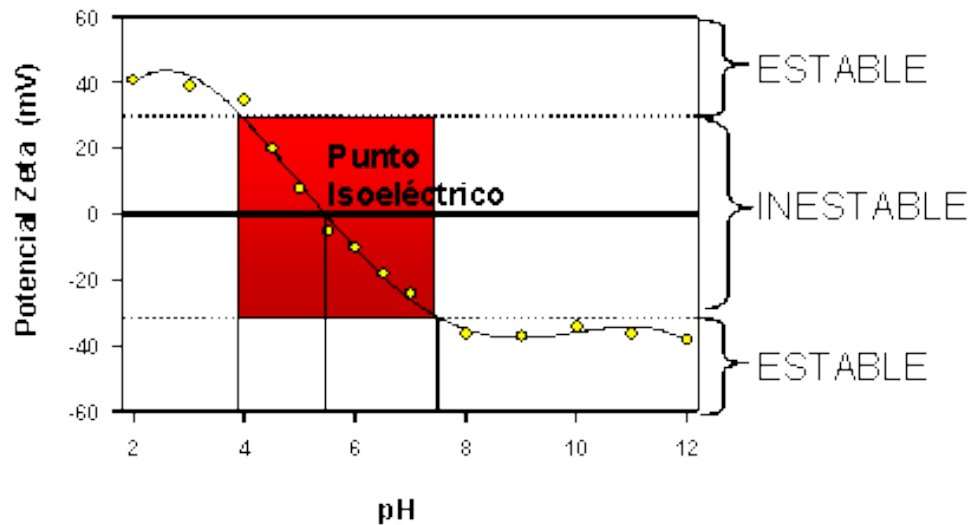


Figura 10 Zonas de estabilidad e inestabilidad de una suspensión coloidal a diferentes valores de pH (Myers, 1999)

2.10.2 Aplicaciones de la coacervación compleja

En la literatura se han encontrado varias aplicaciones de la coacervación compleja tanto en tecnología de alimentos (Jun-xia et al., 2011; Dong et al., 2011; Mendanha et al., 2009; Vahabzadeh et al., 2004; Thimma y Tammishetti, 2003; Xing et al., 2003; Weinbreck et al., 2004; Pozippe et al., 2011), en aplicaciones textiles (Onder et al., 2008; Deveci y Basal, 2009) y en aplicaciones farmacéuticas (Saravanan y Panduranga, 2010; Tiyafoonchai y Ritthidej, 2003; Lamprecht et al., 2007; Baracat et al., 2004).

El sistema más utilizado en la coacervación compleja es el de gelatina/goma arábica. Sin embargo la gelatina requiere de un calentamiento para su disolución, reduciendo su uso para la microencapsulación de sustancias termolábiles. Por tal motivo, se han explorado otros sistemas de coacervación como: aislado de proteína de soya/goma arábica (Jun-xia et al., 2011), aislado de proteína de soya/pectina (Mendanha et al., 2009), quitosano/carboximetilcelulosa (Sarmiento et al., 2007b), fibroína de seda/quitosano (Deveci y Basal, 2009), los cuales presentan la ventaja de no requerir calentamiento para su disolución. Por otro lado, Gunasekaran et al. (2007) sugirieron

que las proteínas de suero de leche (un subproducto de la industria láctea) pueden utilizarse ampliamente como aditivos en una gran variedad de alimentos por sus propiedades gelificantes y emulsificantes. La β -lactoglobulina es el principal componente del suero de leche. Las propiedades fisicoquímicas de las proteínas del suero de leche sugieren que pueden ser utilizadas para otras aplicaciones novedosas en campos distintos a la industria de los alimentos. Por ejemplo, las proteínas de suero de leche pueden ser utilizadas como agente encapsulante para la liberación controlada de sustancias biológicamente activas ya que éstas no requieren de calentamiento para su disolución, razón por la cual se utilizó el aislado de proteína de suero de leche en el presente trabajo.

En cuanto a los polisacáridos del sistema de coacervación, se eligieron la carboximetilcelulosa, el alginato de sodio, el ácido poliacrílico y el quitosano ya que presentan valores de mucoadhesividad promedio comparados con otros polisacáridos (Roy and Prabhakar, 2010).

Una etapa importante en la formulación de las microcápsulas es el secado de las mismas. En la revisión bibliográfica se han encontrado diversos métodos de secado: secado al aire (Sajeesh & Sharma, 2006), liofilización (Jain et al., 2005; Silva et al., 2006; Liu et al., 2006; Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2012a), secado al vacío (Morishita et al., 2006), secado por aspersion (Bowey et al., 2013; Patel et al., 2001) y secado en lecho por fuente (spouted bed) (Baracat et al., 2004). Por lo general el método de secado de microcápsulas más utilizado es la liofilización. Sin embargo, los costos de operación en este proceso de secado son altos, se requiere equipo costoso y los tiempos de secado son largos. En el presente trabajo se utilizó el secado por aspersion para la etapa de secado de las microcápsulas, por ser una alternativa a la liofilización con costos de operación menores y con tiempos de secado más cortos, por lo que a continuación se presenta una breve revisión del principio involucrado.

2.11 Secado por aspersión

El secado por aspersión es una operación de tres pasos: atomización, deshidratación y recolección del polvo. Como se muestra en la Figura 11, la alimentación se asperja por un atomizador en la cámara de secado. Ayudado por un área superficial muy extensa de las gotas y el aire caliente, la deshidratación se lleva a cabo en segundos. Finalmente las partículas secas son transportadas a un ciclón separador y depositadas en un colector. Los parámetros de proceso más importantes incluyen: la temperatura de entrada del aire de secado (T_e), la temperatura del aire de secado de salida (T_s), velocidad del flujo de aire, velocidad de rotación del atomizador y el tiempo de residencia. De todos estos parámetros la T_s es el factor dominante al controlar las características de la partícula como la forma de la partícula y el contenido de humedad (Mahmoud y Yuh Fun, 2006).

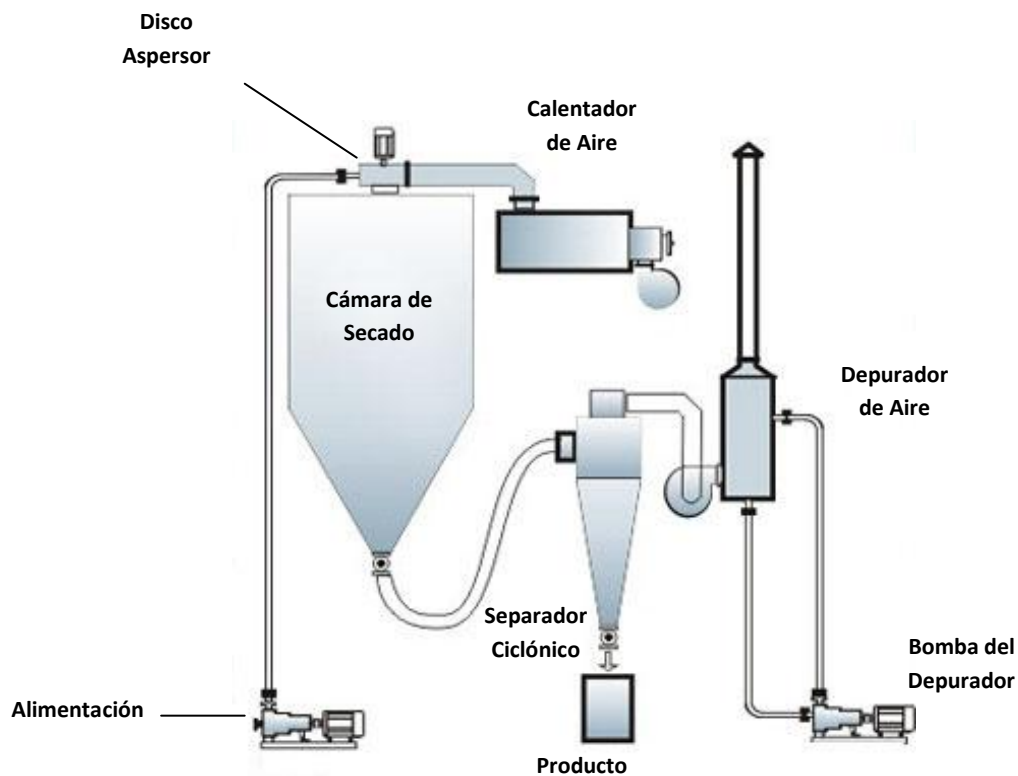


Figura 11 Esquema de un secador por aspersión convencional (Mahmoud y Yuh Fun, 2006)

Uno de los principales cuestionamientos para utilizar el secado por aspersión en la producción de formulaciones proteicas o con péptidos, es si las proteínas termolábiles pueden resistir la desnaturalización por el aire caliente (Ameri y Maa, 2006). En las primeras etapas de secado, donde la superficie de la gota permanece saturada, la temperatura de la superficie de la gota se mantiene a la temperatura de bulbo humedo del aire de secado, la cual es significativamente menor que la T_e .

Conforme progresa el secado, la temperatura de la superficie de la gota empieza a incrementarse acercándose a la T_s puesto que la difusión de agua a la superficie no puede mantener saturada de humedad la superficie de la gota. En el caso de secado de emulsiones dobles W/O/W, la emulsión W/O que contiene la insulina nunca alcanza si quiera la T_s . Para algunas proteínas el secado por aspersión puede alterar su estructura secundaria (α -hélice, la hoja- β y el enrollamiento al azar) lo cual puede inactivar irreversiblemente la proteína. Este no es el caso de la insulina ya que Okamoto et al. (2002) reportaron que el secado de una solución de insulina (5mg/ml) a T_s menores a 120°C sufre una degradación menor al 1%. Bowey et al. (2013) reportan el uso del secado por aspersión en la encapsulación de insulina con alginato utilizando $T_s = 70$ -80°C y obteniendo una BA_r del 88% evaluada por el método de inmunoensayo.

Maltensen et al. (2008) reportaron que no se encontró desnaturalización protéica ni degradación física o química durante el proceso de secado por aspersión. En otro estudio, Patel et al. (2001) encontraron que la actividad biológica de la insulina no se ve afectada cuando se seca a $T_e = 110^\circ\text{C}$, 140°C y 170°C pero sí existe una reducción significativa cuando se seca a $T_e = 200^\circ\text{C}$. No reportan la T_s . Un resultado similar fue reportado por Forbes et al. (1998) quienes reportan una retención de la actividad biológica de apenas el 18% al secar soluciones de insulina al 1% en lactosa y manitol cuando se seca por aspersión a $T_e = 200^\circ\text{C}$ y $T_s = 90^\circ\text{C}$. De la revisión anterior se puede concluir que la insulina sufre una degradación despreciable cuando se seca por aspersión a $T_e < 200^\circ\text{C}$ y $T_s < 120^\circ\text{C}$, dato importante para decidir los parámetros de operación.

Justificación

3. JUSTIFICACIÓN

El principal tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 hasta ahora es la inyección subcutánea de insulina, teniendo esta vía de administración varias desventajas como el ser dolorosa e incómoda para el paciente, además de provocar hipoglucemia periférica. Aunque se han intentado otras vías alternas de administración como la nasal, la bucal, la transdérmica y la pulmonar poco ha sido el éxito obtenido debido a la baja biodisponibilidad de la insulina comparada con la vía subcutánea.

La vía de administración oral sería más natural, cómoda y accesible para el paciente. Sin embargo, aún es un reto para científicos e investigadores el lograr desarrollar una formulación oral para un uso clínico aceptable. La razón es que existen varias barreras físicas para la administración oral de la insulina entre ellas la degradación por las enzimas proteolíticas en el tracto gastrointestinal y la poca permeabilidad en el intestino. Para esto se han desarrollado varias estrategias como el uso de inhibidores de proteasas, potenciadores de absorción, uso de nanopartículas o microcápsulas de administración dirigida y modificación química de las microcápsulas para mejorar la absorción.

Se han reportado varios intentos para desarrollar una formulación oral de insulina. De todos los intentos las microcápsulas o nanopartículas parecen ser los más promisorios.

En este trabajo se abordó el problema de la administración oral de la insulina utilizando un enfoque combinado de microencapsulación por coacervación compleja de una emulsión doble agua aceite agua W/O/W por sus siglas en inglés "*water in oil in water*"; las proteasas se ocuparían de degradar la proteína del sistema de coacervación y la insulina estaría más tiempo disponible para su absorción además de que los lípidos empleados en la formulación de la emulsión agua en aceite W/O por sus siglas en inglés "*water in oil*" actuarían como potenciadores de absorción.

Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Microencapsular insulina para su administración oral mediante las técnicas emulsión doble/coacervación compleja y evaluar su estabilidad a valores de pH gastrointestinal.

4.2 Objetivos específicos

- Optimizar la formulación de la emulsión agua en aceite W/O por sus siglas en inglés “*water in oil*” de tal forma de obtener una emulsión estable con el tamaño de glóbulo nanométrico.
- Optimizar la emulsión doble agua en aceite en agua W/O/W por sus siglas en inglés “*water in oil in water*” con aislado de proteína de suero de leche WPI por sus siglas en inglés “*Whey protein isolate*” como emulsificante hidrofílico con base en parámetros como tipo de mezclado, tiempo de mezclado, tamaño de glóbulo y eficiencia de encapsulación.
- Determinar el perfil de potencial Z en función del pH de aislado de proteína de suero de leche WPI por sus siglas en inglés “*Whey protein isolate*”, carboximetilcelulosa CMC por sus siglas en inglés “*Carboxymethylcellulose*”, alginato de sodio SA por sus siglas en inglés “*Sodium alginate*”, ácido poliacrílico PAA por sus siglas en inglés “*Polyacrylic acid*” y quitosano CHIT por sus siglas en inglés “*Chitosan*”.
- Determinar el perfil de pH de las mezclas binarias WPI-CMC, WPI-SA, WPI-PAA y WPI-CHIT con el fin de conocer el pH de coacervación (máxima atracción electrostática).

- Evaluar la eficiencia de coacervación de los sistemas WPI-CMC y WPI-SA a distintas proporciones WPI-polisacárido.
- Encapsular por coacervación compleja la emulsión doble W/O/W utilizando los sistemas WPI-CMC y WPI-SA a las proporciones de material de pared con respecto a la emulsión W/O 2:1 y 1:1.
- Establecer las mejores condiciones de secado de las microcápsulas evaluando el efecto de las temperaturas de secado por aspersion sobre la morfología de las mismas y sobre la actividad biológica residual (BA_r) de la insulina.
- Evaluar la estabilidad de la insulina microencapsulada a valores de pH gastrointestinal de tal forma de observar la formulación que mejor proteja a la insulina a valores de pH gastrointestinal.

Materiales y Métodos

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

La insulina humana ADN recombinante fue adquirida de dos fuentes: Insulina Humana ADN recombinante 100UI/mL frasco de 10mL (Insulina humana regular de acción rápida obtenida de Laboratorios PISA Guadalajara, Mexico) e insulina humana ADN recombinante en polvo de Sigma Aldrich; el aislado de proteína de suero de leche WPI por sus siglas en inglés "*Whey protein isolate*" 90% de la marca Hilmar Ingredients (California, USA) se adquirió de Empresas Vihler S.A. de C.V.; el aceite de soya utilizado para la preparación de la emulsión W/O fue de la marca comercial Nutrioli (Nuevo León, México); el polirricinoleato de poliglicerilo PGPR por sus siglas en inglés "*Poyglyceril polyricinoleate*" GRINSTED 90 de la marca Danisco Food Inc. (Danisco, Dinamarca) fue adquirido de la empresa Millikan S.A. de C.V.; la carboximetilcelulosa CMC por sus siglas en inglés "*Carboximethylcellulose*" grado farmacéutico de la marca GELYCEL F1 2000 fue adquirida de Química Amtex S.A. de C.V.; el alginato de sodio SA por sus siglas en inglés "*Sodium alginate*" grado farmacéutico fue adquirido de Alquimia Mexicana S. de R. L.; el quitosano CHIT sus siglas en inglés "*Chitosan*" utilizado fue de Sigma Aldrich; el ácido poliacrílico PAA sus siglas en inglés "*Polyacrylic acid*" utilizado fue de la marca CARBOPOL 940 adquirido de Lubrizol Advanced Materials Inc. (Wickliffe, Ohio, USA); el kit de ELISA para insulina humana se adquirió de Diagnostic Automation Inc.(Calabasas, California, USA). Todos los demás reactivos utilizados fueron grado analítico.

5.2 Equipo

- Agitador nivel laboratorio Stir Pak® Mod 5554 10 Cole Parmer con una turbina con seis paletas equidistantes de 5 cm de diámetro.
- Homogenizador digital Ultraturrax® T25
- Medidor de Potencial Z Brookhaven Instruments Zeta Plus DR 25.

- Secador por Aspersión Niro Mobile Minor con un cámara de secado cilíndrica cónica con diámetro de 80.5 cm, la zona cilíndrica de 62 cm de alto y la cónica de 67 cm de alto con un ángulo de 30° con respecto a la vertical.
- Conductímetro Oakton PC700
- Termobalanza Ohaus M35.
- Evaporadora de oro Denton Vacuum Modelo Desk II
- Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL modelo JSM-5800LV
- Analizador de Tamaño de partícula Malvern IM026 con una lente de 60mm
- Espectrofotómetro Jenway 7305
- Agitador rotatorio Roto-Torque Cole Parmer 7637
- Lector de ELISA Biotek Modelo EL311

5.3 Desarrollo experimental

La Figura 12 muestra el diagrama de bloques del procedimiento experimental utilizado en la preparación de las microcápsulas para la administración oral de la insulina. Al polvo obtenido se le hicieron pruebas de calidad como humedad, morfología por microscopía óptica, solubilidad a pH 7.0 y pH 2.0 y BA_r por la técnica de ELISA.

5.3.1 Emulsión simple agua en aceite

5.3.1.1 Fase acuosa interna para optimizar la emulsión doble agua aceite en agua

Con la finalidad de optimizar la formulación de la emulsión doble agua aceite en agua W/O/W por sus siglas en inglés “*water in oil in water*”, se utilizó NaCl como indicador en la fase acuosa interna (Fi). Se utilizó una solución al 4%p/p de NaCl y Glicerol 15%p/p en agua (Benichou et al., 2007). Esta solución tiene una osmolaridad teórica de 3000mOsmoles/L. Se adicionó glicerol a la Fi ya que se ha reportado que la adición de polioles a la Fi incrementa la reducción del tamaño de glóbulo y asegura una mejor

estabilidad de la emulsión final debido a la hidrofobización de la Fi (Benichou et al., 2001).

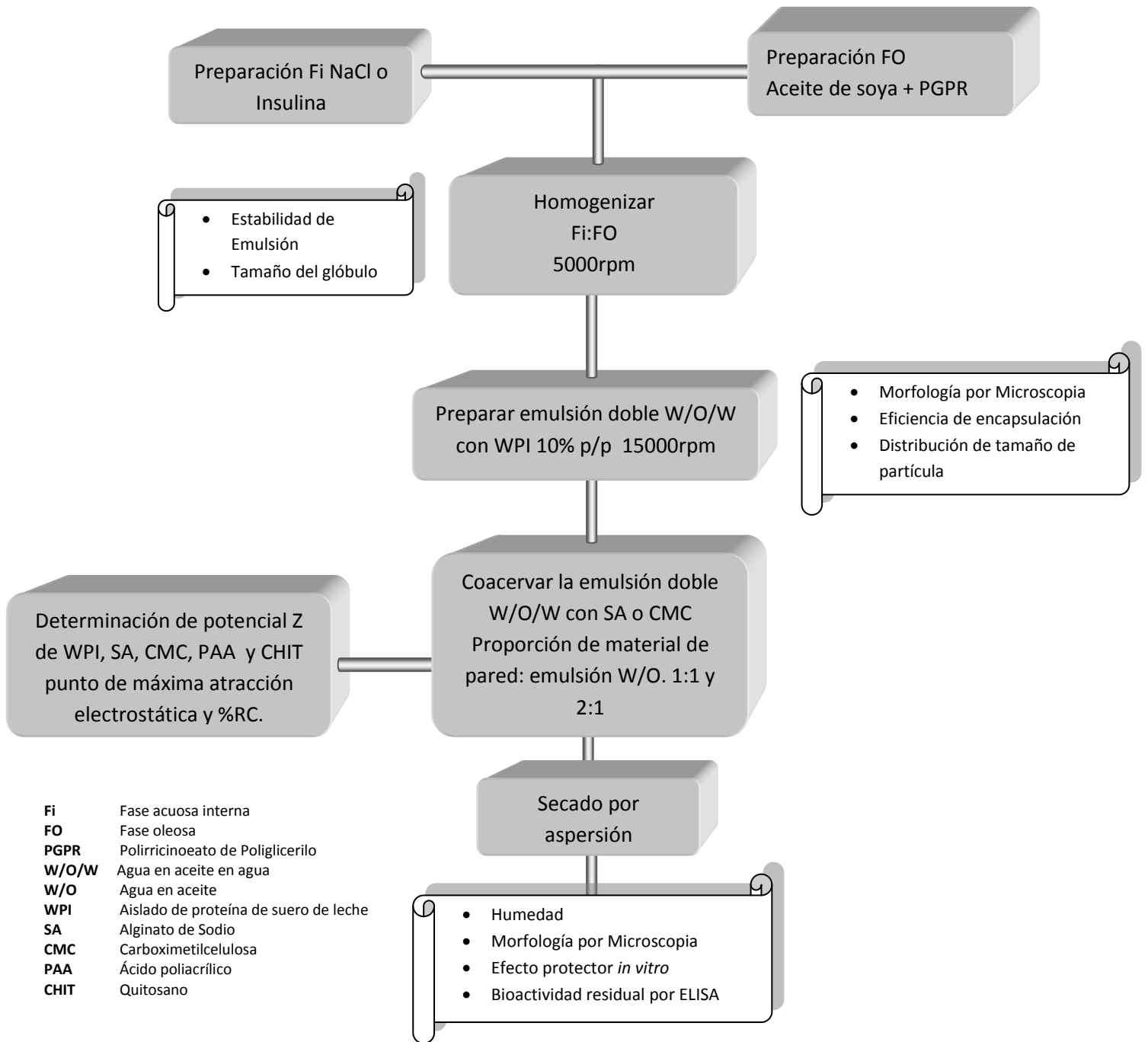


Figura 12 Diagrama de bloques del procedimiento de experimental

5.3.1.2 Fase oleosa

Para la fase oleosa (FO) se utilizó aceite de soya mezclado con el emulsificante lipofílico PGPR 90 (HLB=4.3) en distintas concentraciones (2, 4, 6, 8 y 10%p/p de PGPR).

5.3.1.3 Preparación de la emulsión simple agua en aceite

La emulsión agua en aceite W/O por sus siglas in inglés “*water in oil*” se preparó en dos etapas. En la primera etapa se incorporó la Fi por goteo a la FO utilizando un agitador nivel laboratorio Stir Pak Mod 5554 10 Cole Parmer con una turbina con seis paletas equidistantes de 5cm de diámetro a 1000rpm durante 5min. Finalmente se homogenizó esta emulsión W/O a 5000rpm durante 1min en el mismo equipo. Para la caracterización de la emulsión W/O con aceite de soya se utilizó un diseño factorial de dos variables (la proporción Fi:FO y la concentración de surfactante) a 3 y 5 niveles respectivamente tal como se muestra en el Cuadro 3, siendo las variables de respuesta el tamaño del glóbulo y la estabilidad de la emulsión W/O.

Cuadro 3 Factorial para la preparación de la emulsión agua en aceite

Niveles	Variables	
	Concentración de PGPR %p/p	Fi:FO
1	2	1:2
2	4	1:3
3	6	1:4
4	8	
5	10	

De éste factorial se evaluaron las emulsiones por estabilidad y tamaño del glóbulo de la emulsión. Se eligió la formulación con la mayor estabilidad y con el menor tamaño de glóbulo.

5.3.2 Emulsión doble agua aceite en agua

5.3.2.1 Preparación

Para la preparación de la emulsión doble W/O/W se utilizó un Utraturrax T25 a distintas velocidades de homogenización (5000, 10000 y 15000rpm). El emulsificante hidrofílico en la emulsión doble W/O/W fue el WPI al 10%p/p. Para la caracterización de la emulsión doble W/O/W se plantearon dos experimentos. En el primero se utilizó una variable (velocidad de homogenización) a 3 niveles siendo las variables de respuesta la eficiencia de encapsulación (EE) y la distribución de tamaño de partícula con el objetivo de establecer las mejores condiciones de homogenización para lograr la máxima EE y la distribución de tamaño de partícula lo más homogénea posible. Los niveles y variables estudiados se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4 Preparación de la emulsión doble agua aceite en agua

Niveles	Variable Velocidad de homogenización (rpm)
1	5000
2	10000
3	15000

Una vez establecida la velocidad de homogenización para la mejor EE, se planteó el segundo experimento, donde se utilizó un factorial de 2 variables (relación WPI:emulsión W/O y relación Fi:FO) a 3 niveles siendo la variable de respuesta la EE con el objetivo de estudiar el efecto de las relaciones WPI:emulsión W/O y Fi:FO sobre

la EE tal y como se muestra en el Cuadro 5. Con este experimento se eligió la formulación con la mayor EE y mayor capacidad de carga en la emulsión W/O.

Cuadro 5 Factorial para la evaluación de la eficiencia de en encapsulación en la emulsión doble agua en aceite en agua

Niveles	Variables	
	Relación WPI:Emulsión W/O	Relación Fi:FO
1	0.66:1	1:2
2	1:1	1:3
3	1.33:1	1:4

5.3.3 Condiciones de coacervación

5.3.3.1 *Determinación de potencial Z de los biopolímeros seleccionados a distintos valores de pH*

Se prepararon soluciones de los polímeros de la siguiente manera: WPI al 1%(p/v), CMC, SA, PAA al 0.5%(p/v) en agua destilada y CHIT en HCl 0.1N disolviendo lentamente con agitación. Se almacenaron las soluciones de los polímeros a 4°C durante 24h para permitir su completa hidratación.

El pH de las soluciones acuosas de los polímeros se ajustó mediante la adición de HCl 0.1M para valores de pH de entre 4-6.5 y HCl 1M para valores de pH de entre 2-4 y con NaOH 0.1N para valores superiores a 6.5. El potencial zeta de las soluciones acuosas de WPI, CMC, SA, PAA y CHIT se determinó a diferentes valores de pH usando un medidor de Potencial Zeta Brookhaven Instruments Zeta Plus DR 525. Se construyeron las gráficas de potencial zeta en función del pH.

5.3.3.2 *Determinación de potencial Z de mezclas binarias proteína-polisacárido distintos valores de pH*

Se prepararon las siguientes soluciones binarias: WPI-CMC, WPI-SA, WPI-PAA y WPI-CHIT a las proporciones (1:1, 2:1, 3:1) con una concentración total de polímeros del 1 y 2%. El pH de estas mezclas binarias se ajustó a diferentes valores de pH utilizando HCl 1M para valores de pH de entre 2-4, HCl 0.1N para valores de pH de entre 4-6.5; y con NaOH 0.1N para valores de pH superiores a 6.5 y se determinó el potencial Z de las muestras con un medidor de Potencial Zeta Brookhaven Instruments Zeta Plus DR 525. Aquellas mezclas que no presentaron precipitación se midió en potencial Z directamente y aquellas donde se observó precipitación, fueron centrifugadas a 4000rpm por 20min para hacer la lectura en el sobrenadante. Se construyeron las graficas de potencial Z en función de pH y a partir de éstas se determinó el valor de pH donde existe la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre proteína y polisacárido (potencial Z=0, pH de coacervación) (Jiménez-Alvarado et al., 2009).

5.3.3.3 *Rendimiento de coacervación*

El precipitado (coacervado) de las muestras centrifugadas fue separado del sobrenadante por decantación y el precipitado fue deshidratado a 100°C hasta llegar a peso constante. El rendimiento de coacervación %RC se determinó a partir de la siguiente ecuación (Jiménez-Alvarado et al., 2009):

$$\%RC = \frac{m_c}{m_{BP}} \times 100$$

donde:

%RC= Rendimiento de coacervación (%)

m_c =Masa del coacervado deshidratado (g)

m_{BP} =Masa total de polímeros utilizados en la preparación de la mezcla binaria (g)

5.3.3.4 Coacervación de la emulsión doble agua aceite en agua

La emulsión doble W/O/W que presentó la máxima EE y mayor relación Fi:FO en la emulsión W/O fue coacervada utilizando tanto CMC como SA. Se descartaron el PAA y el CHIT como se verá en la sección de resultados.

Durante la coacervación compleja los dos parámetros importantes a controlar son la proporción proteína:polisacárido y la proporción material de pared (proteína + polisacárido):núcleo. En el caso de la coacervación de emulsiones dobles W/O/W el núcleo es la emulsión W/O. La proporción proteína:polisacárido mas frecuentemente utilizada es 1:1 (Jun-Xia et al., 2011; Saravanan y Panduranga, 2010; Mendanha et al., 2009; Onder et al., 2007). Sin embargo, en el presente trabajo se utilizó un proporción proteína:polisacárido de 2:1 por presentar un mayor %RC como se discutirá en la sección de resultados. Con respecto a la proporción de material de pared (proteína+polisacárido):núcleo (emulsión W/O) se han reportado valores de entre 2:1, 1:1 y 0.66:1 (Mendanha et al., 2009). En el presente trabajo se utilizaron las proporciones de material de pared (proteína+polisacárido):emulsión W/O 2:1 y 1:1 por ser las que mayor cantidad de emulsión W/O se puede utilizar.

La coacervación compleja se llevó a cabo añadiendo la emulsión doble W/O/W preparada previamente a una solución de CMC o SA al 1% bajo agitación lenta (500 rpm) y se dejó agitar por 5min para la homogenización de la misma. Posteriormente se ajustó el pH de la mezcla lentamente con HCl 0.1N hasta llegar a un pH de 3.8 aproximadamente. Finalmente se ajustó el pH de la mezcla al punto isoeléctrico (PI) del complejo con HCl 1M (pH=2.5). Todo bajo agitación lenta (500rpm). Para verificar que se llevó a cabo la coacervación correctamente se dejó reposar una muestra de la mezcla por 24h en refrigeración para observar la separación de fases.

5.3.3.5 *Elaboración de las microcápsulas conteniendo insulina*

Una vez establecidas las mejores condiciones para la preparación de la emulsión doble W/O/W y para la coacervación, se procedió a encapsular la insulina para lo cual se preparo la Fi como se describe a continuación.

5.3.3.5.1 *Fase acuosa interna para evaluar la bioactividad residual*

Para evaluar la bioactividad residual (BA_r) después del secado por aspersión se utilizó una solución de insulina 100UI/mL, la cual se ajustó a 15%p/p de glicerol. De acuerdo a la USP 30 (2007) una unidad de insulina humana ADN recombinante equivale a 0.0347mg de insulina. Por lo que una solución de insulina de 100UI/mL equivale a 3.47mg/mL. La solución de insulina de 100UI/mL comercial contiene 16mg/mL (1.6%) de glicerol (USP 30, 2007) por lo que para llevar la solución al 15%p/v de glicerol se aplicó el siguiente balance:

$$m_1x_1 + m_2 = m_Tx_T$$

donde:

m_1 = masa de la solución de insulina 100UI/mL (g)

x_1 =Fracción en peso de glicerol en m_1

m_2 = masa de glicerol necesaria (g)

m_T = masa final de la mezcla (g)

x_T =Fracción en peso de glicerol en m_T

Con esto se logró una solución con una concentración final de insulina de 2.98mg/mL y 15%p/p de glicerol.

5.3.3.5.2 Fase acuosa interna para evaluar la estabilidad a pH gastrointestinal

Para la preparación de la Fi para la evaluación de la estabilidad de la insulina microencapsulada se preparó una solución de insulina 100UI/mL (3.47mg/mL) en buffer de fosfatos pH 7.0 y se le añadió la cantidad suficiente de glicerol para obtener 15%p/p (Woitiski et al., 2010).

5.3.3.6 Secado por aspersión de la emulsión doble coacervada

La emulsión doble W/O/W coacervada, fue deshidratada en un secador por aspersión Niro Mobile Minor Spray Dryer (Figura 13a). El secado se realizó utilizando un aspersor de disco centrífugo que opera de manera neumática (Figura 13b). Este aspersor requiere una presión de aire de alrededor de 6 kg/cm² y gira a 32000rpm. El producto seco se recolectó en el ciclón separador.

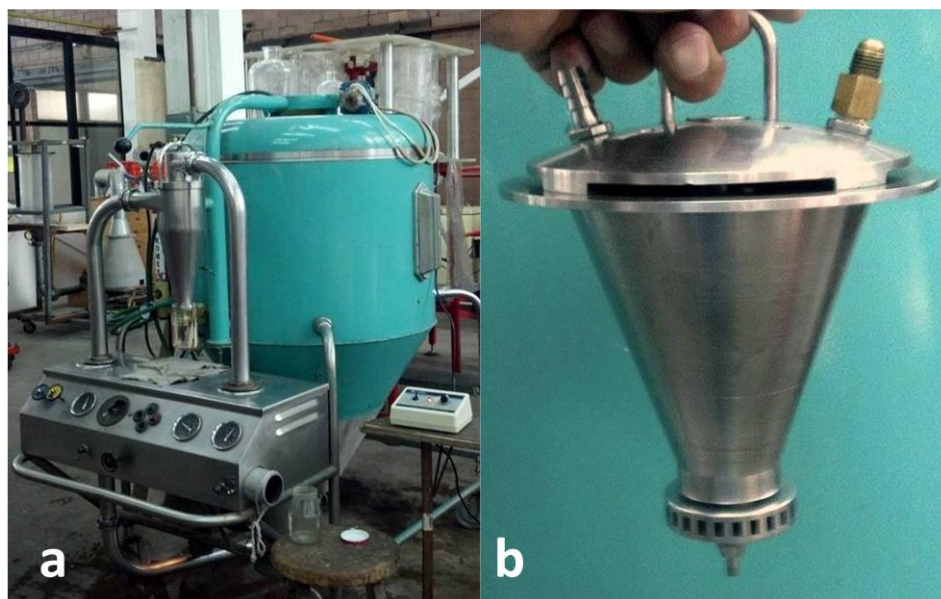


Figura 13 Secador por aspersión Niro Atomizer Modelo Mobile Minor (a: Cuerpo del secador b: Aspersor de disco centrífugo)

Durante la alimentación de la emulsión doble W/O/W coacervada, ésta fue agitada magnéticamente (100rpm) para evitar aglomeración de los coacervados y la subsecuente separación de fases.

Con el objetivo de evaluar el efecto del secado por aspersión sobre la BA_r de la insulina se planteó un experimento de 4 variables (polisacárido utilizado, relación material de pared:emulsión W/O, T_e y T_s) a dos niveles cada una tal como se muestra en el Cuadro 6, siendo la variable de respuesta la BA_r de la insulina.

5.4 Métodos analíticos

5.4.1 Determinación de la estabilidad de la emulsión agua en aceite

La estabilidad de la emulsión W/O se evaluó determinando el tamaño del glóbulo de agua en la fase continua (aceite) utilizando microscopía óptica y un software de análisis de imágenes Digimizer® 4.2.6, en función del tiempo. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (20°C) en tubos de ensaye de rosca por 150 días.

Cuadro 6 Factorial para la evaluación de la actividad biológica residual después del proceso de secado

Niveles	Polisacárido utilizado	Variables		
		Relación Material de pared:emulsión W/O	T _e (°C)	T _s (°C)
1	CMC	1:2	180	80
2	SA	1:1	170	70

5.4.2 Determinación del tamaño de los glóbulos en la emulsión agua en aceite

Se realizó una dilución 1:20 de la emulsión W/O en aceite de soya. Se colocó una gota en el portaobjetos y se cubrió la muestra con un cubreobjetos. Se observó la muestra a inmersión (1000x) con el microscopio óptico y se tomaron las imágenes con una cámara digital Nikon Coolix L17 16.1MP. De cada muestra se tomó la microfotografía de 3 campos diferentes y se midieron todos los glóbulos en cada campo utilizando el software de análisis de imágenes Digimazer© 4.3.0. Primeramente se abrió el programa y se cargó la imagen a analizar. Posteriormente se hizo la calibración del programa utilizando la escala captada con un micrómetro ocular colocado en el microscopio utilizando la herramienta “unit” de la barra de herramientas (Figura 14) e introduciendo el valor numérico en μm al segmento marcado. Una vez realizada la calibración se procedió a medir los glóbulos utilizando la herramienta “circle to center” y en la parte derecha de la pantalla, apareció cada una de las mediciones realizadas así como el promedio del tamaño del glóbulo (Figura 15). Con estos datos, se construyó un histograma de frecuencias para cada muestra para observar la dispersión del tamaño del glóbulo de cada muestra.

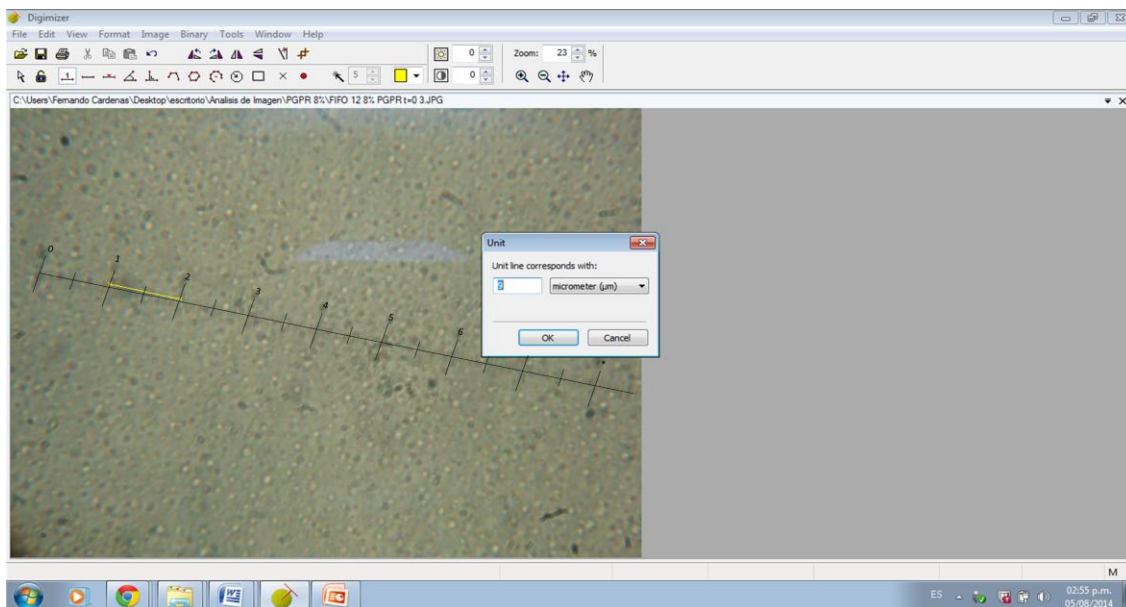


Figura 14 Calibración del programa Digimazer© 4.3.0

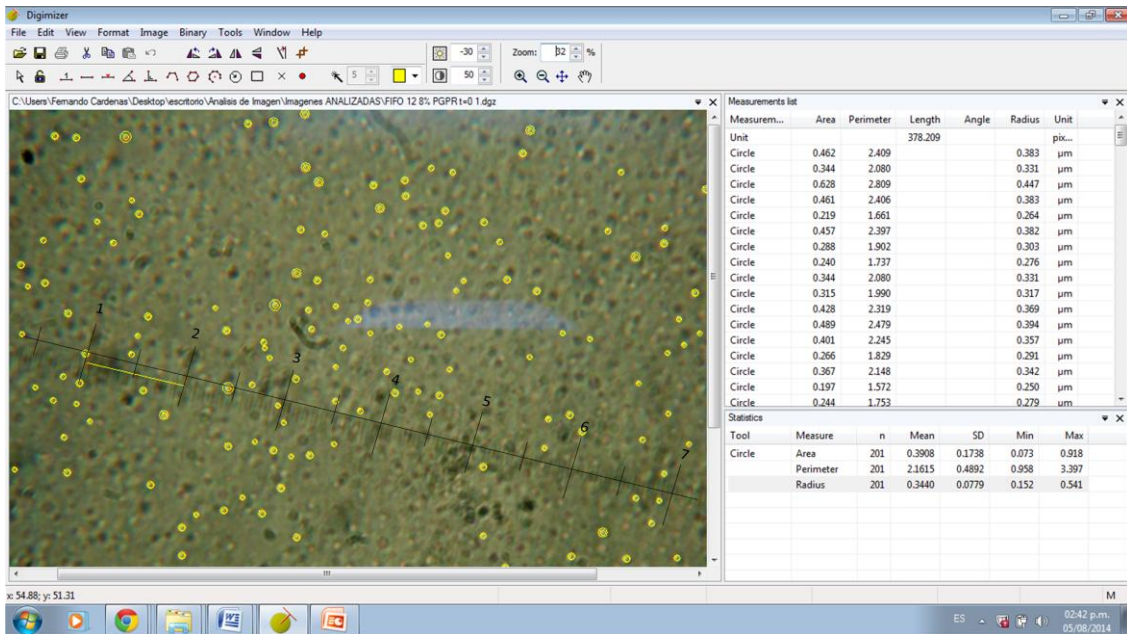


Figura 15 Evaluación del tamaño de glóbulo utilizando el programa Digim�er© 4.3.0

5.4.3 Determinación del tamaño de los glóbulos en la emulsión doble agua en aceite en agua

La distribución del tamaño de los glóbulos de la emulsión doble W/O/W se realizó utilizando un analizador de tamaño de partícula Malvern IM 026 serie 2006 con un lente de 60 mm, determinando el diámetro de esfera equivalente el cual es el tamaño de la esfera con el mismo volumen de la partícula.

5.4.4 Determinación de la eficiencia de encapsulación en la emulsión doble agua aceite en agua

Con el fin de evaluar la EE, se aprovechó la propiedad de conducir la electricidad de los electrolitos en solución. Como se indicó en la sección 5.2.1.1 la fase acuosa interna se preparó con NaCl 4%p/v en solución como un fármaco modelo muy soluble en agua. Como el aceite no contribuye a la conductividad por no ser electrolito en solución, la única razón por la que pudiese aumentar la conductividad en la fase acuosa externa es

por la liberación de la fase interna hacia la fase externa debido a una fuerza de cizalla excesiva durante la homogenización de la emulsión doble W/O/W (Figura 16).

Se construyeron curvas tipo para las proporciones $F_i:FO$ 1:2, 1:3 y 1:4 de la emulsión W/O y para las proporciones 0.66:1, 1:1 y 1.33:1 WPI/emulsión W/O en la emulsión doble W/O/W. A manera de ejemplificar la forma de preparación de una curva tipo se tomará como ejemplo la preparación de una emulsión doble W/O/W utilizando una emulsión W/O con proporción $F_i:FO$ 1:2 y con una relación WPI/emulsión W/O 1:1. En el Cuadro 7 se observa la formulación típica de esta emulsión. Esta emulsión doble contiene 10g de emulsión W/O dispersas en 100g de fase acuosa externa (WPI 10%p/v). Pero los 10g de emulsión W/O contienen 6.66g de fase oleosa y 3.33g de fase acuosa interna ($F_i:FO$ 1:2).

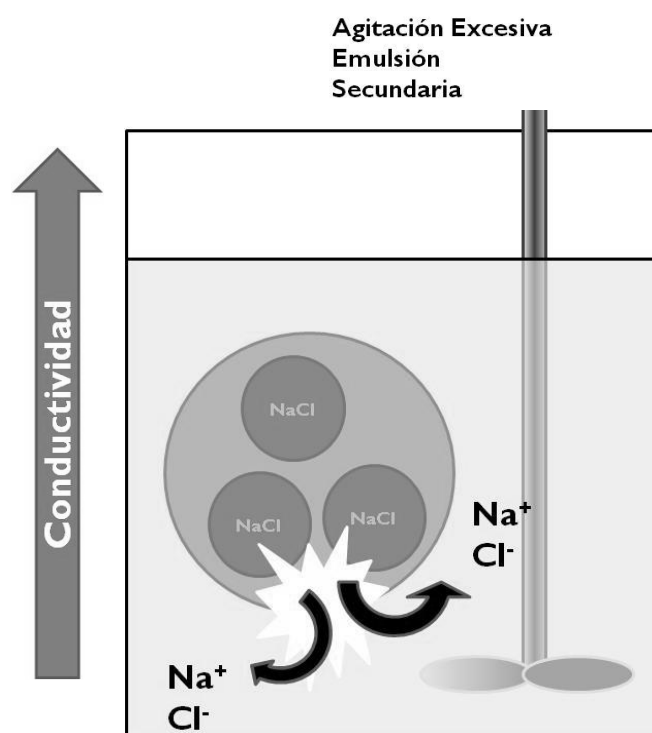


Figura 16 Liberación de la fase acuosa interna a la fase acuosa externa causada por un exceso de agitación durante la homogenización de la emulsión secundaria

Se prepararon 300g de una emulsión simple del tipo O/W añadiendo 10, 6.66 y 5g de FO por cada 100g de fase acuosa externa (WPI 10%p/v) homogenizando a 15000rpm en un Ultraturrax T25 por 2min. Se vertieron 30g de esta emulsión simple en cada uno de 10 tubos de ensaye. Se consideró una eficiencia de encapsulación variando desde el 100% hasta el 0% de diez en diez unidades. Para esto se adicionó a cada tubo la cantidad de NaCl 4% p/v que correspondería a una liberación de 10-100%.

Cuadro 7 Formulación típica de la emulsión doble agua aceite en agua

Relación WPI/Emulsión W/O	0.66:1	1:1	1.33:1
	(g)	(g)	(g)
Emulsión W/O	15	10	7.5
WPI 10%(p/v)	100	100	100

La cantidad de fase acuosa interna se agregó con micropipeta considerando una densidad relativa igual a la del agua de 1.0. Los tubos fueron finalmente agitados con vortex por 1min y se midió la conductividad por triplicado con un conductímetro OAKTON PC 700. El Cuadro 8 muestra la forma de preparación de la curva tipo para las diferentes proporciones.

5.4.5 Determinación de humedad en las microcápsulas secas

El contenido de humedad en las microcápsulas deshidratadas se determinó como lo reportaron Rocha-Selmi et al. (2013) utilizando una termobalanza Ohaus M35 (Parsippany, NJ, USA) a 100°C/0.01g/90s en el programa autody.

5.4.6 Integridad de la emulsión doble después del secado

Se rehidrataron 0.2g de las microcápsulas secas en 10mL de buffer de fosfatos pH 7.0 y fueron agitadas magnéticamente alrededor de 30min para la completa rehidratación de la muestra. Una gota de esta solución fue colocada en un portaobjeto y cubierta con un cubreobjetos. La estructura típica de una emulsión doble W/O/W fue observada utilizando un microscopio óptico para confirmar que la integridad de la emulsión doble W/O/W permaneció intacta después del proceso de secado.

Cuadro 8 Preparación de curvas tipo para evaluar eficiencia de encapsulación en las emulsiones dobles agua aceite en agua

Relación WPI/Emulsión W/O	Fi/FO	Fi añadida (g)								
		0.66:1			1:1			1.33:1		
		1:2	1:3	1:4	1:2	1:3	1:4	1:2	1:3	1:4
EE (%)	Emulsión O/W (g)									
0	30	1.406	1.055	0.844	0.937	0.703	0.563	0.703	0.527	0.422
10	30	1.266	0.949	0.759	0.844	0.633	0.506	0.633	0.475	0.380
20	30	1.125	0.844	0.675	0.750	0.563	0.450	0.563	0.422	0.338
30	30	0.984	0.738	0.591	0.656	0.492	0.394	0.492	0.369	0.295
40	30	0.844	0.633	0.506	0.562	0.422	0.338	0.422	0.316	0.253
50	30	0.703	0.527	0.422	0.469	0.352	0.281	0.352	0.264	0.211
60	30	0.563	0.422	0.338	0.375	0.281	0.225	0.281	0.211	0.169
70	30	0.422	0.316	0.253	0.281	0.211	0.169	0.211	0.158	0.127
80	30	0.281	0.211	0.169	0.187	0.141	0.113	0.141	0.105	0.084
90	30	0.141	0.105	0.084	0.094	0.070	0.056	0.070	0.053	0.042
100	30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

5.4.7 Morfología de las microcápsulas por microscopia electrónica de barrido

Las microcápsulas fueron tamizadas a través de una malla 400 con 37 μ m de apertura. Se tomó una pequeña muestra del polvo tamizado y se recubrió de oro en una evaporadora de oro Denton Vacuum modelo Desk II por 150s. Posteriormente la superficie de las microcápsulas fue analizada utilizando un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-5800LV a 15Kvolts de aceleración y las imágenes fueron tomadas con el software Honestech TVR 2.5.

5.4.8 Determinación de la distribución del tamaño de partícula en las microcápsulas secas

La determinación del tamaño de partícula en las microcápsulas secas se llevo a cabo en un analizador de tamaño de partícula Malvern IM 026 serie 2006 con un lente de 60mm, utilizando agua destilada a pH 2.5 (pH de coacervación) como agente dispersante, para evitar la disgregación de las microcápsulas coacervadas.

5.4.9 Determinación de la actividad biológica residual de la insulina después del proceso de secado por aspersión

5.4.9.1 Extracción de la insulina del interior de las microcápsulas

Para determinar la actividad biológica residual BA_r dentro de las microcápsulas después del proceso de secado por aspersión fue necesario romper la emulsión W/O. Se logró romper la emulsión W/O utilizando acetonitrilo grado reactivo. Con la intención de verificar que efectivamente el acetonitrilo era capaz de romper la emulsión W/O, se preparó una curva tipo de insulina en acetonitrilo y se leyó la absorbancia a 280nm, que corresponde a la región UV del espectro como se muestra en el cCuadro 9.

Posteriormente se preparó una emulsión W/O relación Fi:FO 1:2 utilizando como Fi una solución de insulina 2.98mg/mL y una solución de NaCl 4% p/v. Se tomaron 5g de la emulsión W/O y se mezclaron con 40mL de acetonitrilo. Se centrifugó la muestra a

4000rpm x 25min. Se tomaron 2ml del sobrenadante y se mezclaron con 2mL de acetonitrilo (concentración teórica 59.5µg/mL). Se leyó la absorbancia de la mezcla a 280nm con un espectrofotómetro Jenway 7305 tanto de la emulsión W/O con insulina y de la emulsión W/O con NaCl al 4%p/v. Con estos datos se calculó el porcentaje de recuperación.

Cuadro 9 Preparación de la curva tipo para verificar ruptura de la emulsión agua en aceite

	Acetonitrilo (mL)	Insulina 2.98mg/mL (mL)	Concentración de Insulina (µg/mL)
Blanco	4	0	0
1	3.6	0.4	29.8
2	3.2	0.8	59.6
3	2.8	1.2	89.4
4	2.4	1.6	119.2
5	2.0	2.0	149
6	1.6	2.4	178.8

Una vez corroborado que el acetonitrilo era capaz de romper la emulsión W/O y liberar la Fi contenida en los glóbulos internos de la emulsión W/O se procedió de la siguiente manera para extraer la Fi conteniendo insulina de las microcápsulas secas según lo reportado por Rocha-Selmi et al. (2013). Se pesaron alrededor de 0.3g de microcápsulas secas con una proporción material de pared/emulsión W/O 2:1 y 0.15g con una proporción material de pared/emulsión W/O 1:1 en tubos falcon. Las muestras fueron rehidratadas utilizando 20mL de buffer de fosfatos pH 7.0 durante 24hrs en un agitador rotatorio Roto-Torque Cole Parmer 7637. Se añadieron 20mL de acetonitrilo a las muestras, se mezclaron con vortex por 1min y se centrifugaron a 4000rpm por 15min. Finalmente se tomó una alícuota de 0.1mL del sobrenadante y se aforó a 50mL con buffer de fosfatos pH 7.0.

5.4.9.2 Cuantificación de la insulina bioactiva por la técnica de ELISA

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es una técnica bioquímica utilizada principalmente en inmunología para detectar la presencia de un antígeno o anticuerpo en una muestra. Es un método útil y poderoso para detectar sustancias en el orden de ng/mL y pg/mL en una muestra. El principio básico de un ELISA es utilizar una enzima para detectar la unión de un antígeno (Ag) a un anticuerpo (Ab). La enzima convierte el sustrato incoloro a un producto colorido indicando la presencia de la unión Ag-Ab. Un ELISA puede ser utilizado para detectar un Ag o un Ab en una muestra, dependiendo del diseño de la prueba (Ma et al., 2006b).

En el presente trabajo se utilizó un kit de ELISA para insulina humana en suero de Diagnostic Automation /Cortez Dignostics, Inc. No. Cat: 1606Z. Esta prueba requiere de tres reactivos esenciales para una valoración inmunoenzimométrica; un Ab con alta afinidad y especificidad en exceso, un Ab con una enzima conjugada e inmovilizada con diferente epitope de reconocimiento en exceso y un Ag nativo. En esta prueba, la inmovilización se lleva a cabo durante el procedimiento en la superficie del pozo de la microplaca a través de la interacción con estreptavidina fijada en la placa y un Ab de insulina monoclonal biotilado ($^{Btn}Ab_M$) añadido de manera exógena. Al mezclar el $^{Btn}Ab_M$, el Ab monoclonal de insulina conjugado con una enzima ($^{Enz}Ab_M$) y un suero conteniendo el Ag nativo (insulina humana) resulta una reacción entre el Ag nativo y los Ab's sin competencia o impedimento estérico para formar un complejo sándwich soluble. Esta interacción se ilustra en la Figura 17.

De manera simultánea, el complejo se deposita en el pozo a través de una reacción de alta afinidad entre la estreptavidina y el $^{Btn}Ab_M$. Después de que se alcanza el equilibrio el $^{Enz}Ab_M$ no unido con el Ag se separa por decantación o aspiración. La actividad enzimática de la fracción de $^{Enz}Ab_M$ unido con el Ag es directamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra por lo que se puede construir una curva de la actividad enzimática en función de la concentración de Ag y con esta evaluar la concentración de Ag en una muestra desconocida. Esta prueba es altamente específica ya que no presenta reacción cruzada con proinsulina, péptido C o glucagón.

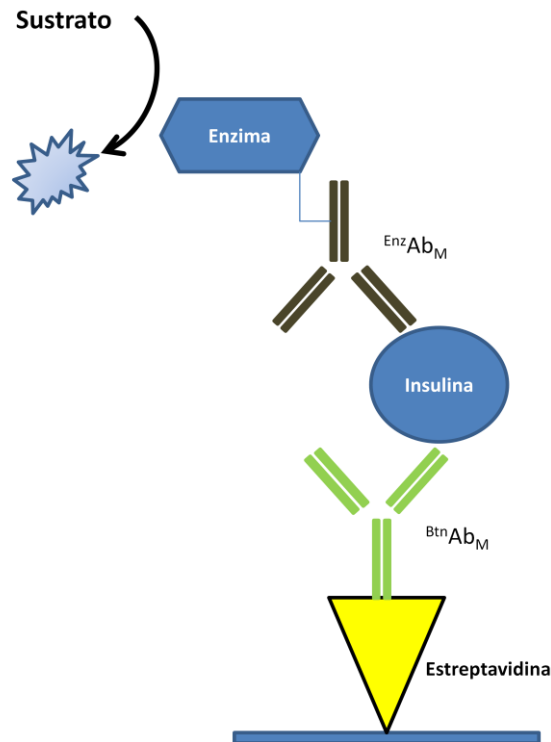


Figura 17 Principio de la prueba de ELISA para insulina humana Diagnostic Automation /Cortez Diagnostics, Inc. No. Cat: 1606Z

El procedimiento utilizado fue el siguiente:

- a) Antes de empezar el análisis se dejó alcanzar a todos los reactivos la temperatura ambiente (20-27°C).
- b) Se seleccionaron el número de placas conforme al número de muestras y se marcaron de acuerdo a los estándares y muestras a ser analizadas.
- c) Se adicionaron 50µL de cada estándar o muestra en los pozos asignados.
- d) Se adicionaron 100µL de la mezcla $EnzAb_M$ y $BtñAb_M$ a cada pozo.
- e) Se agitó ligeramente la microplaca para mezclar correctamente por 30s y se cubrió con una cubierta plástica.
- f) Se incubó la microplaca por 120min a temperatura ambiente (20-27°C).

- g) Se descartó el contenido de la microplaca por decantación golpeando la placa sobre papel absorbente para secarla completamente.
- h) Se adicionaron 350µL de buffer de lavado, se decantó el contenido y se golpeó contra papel absorbente. Esta operación se repitió tres veces.
- i) Se adicionaron 100µL del sustrato a todos los pozos a intervalos de 20 s en cada pozo.
- j) La placa se incubó a temperatura ambiente por 15min efectivos en cada pozo.
- k) Se adicionaron 50µL de HCl 1 N a cada pozo para detener la reacción a intervalos de 20 s para garantizar que la reacción se llevó a cabo durante el mismo tiempo en cada pozo.
- l) Se leyó la absorbancia en cada pozo a 450nm un lector de ELISA Biotek Modelo EL311.

5.4.9.3 Actividad biológica residual de la insulina microencapsulada

Para determinar la actividad biológica residual (BA_r) de la insulina en las microcápsulas secas primeramente se evaluó las UI de insulina activa por g_{ss} en las microcápsulas secas como se muestra en la siguiente ecuación.

$$E_{Final} \left[\frac{UI}{g_{ss}} \right] = \frac{D \times 2000}{a \times F \times 1000 \times 34.7}$$

Donde:

D=Concentración de insulina leída directamente en la curva tipo (ng/mL)

2000=Factor de dilución (mL^2)

a=Alícuota (mL)

F= g_{ss} en la muestra húmeda (g)

1000=Factor de conversión 1000ng equivalen a 1µg

34.7=Factor de conversión 34.7µg equivalen a 1UI

La BA_r se expresó como la relación de las UI de insulina activa por g_{ss} presente en la microcápsula (E_{Final}) después del secado por aspersion con respecto a las UI de insulina activa por g_{ss} utilizadas para producir las microcápsulas ($E_{Producción}$), corregida con la EE como se muestra en la siguiente ecuación:

$$BA_r = \frac{E_{Final}}{EE \times E_{Produccion}} \times 100$$

Donde:

BA_r = Actividad biológica residual de la insulina (%)

E_{Final} = UI insulina activa por g_{ss} después del secado por aspersion (UI/ g_{ss})

$E_{Producción}$ = UI insulina activa por g_{ss} utilizadas para producir las microcápsulas (UI/ g_{ss})

EE= Eficiencia de encapsulación (Fracción)

5.4.10 Pruebas de solubilidad

La solubilidad de las microcápsulas secas se determinó por un método gravimétrico, de acuerdo con Eastman y Moore (1984). Se añadieron 0.8g de muestra a un tubo Falcon y 40mL de buffer de fosfatos pH = 7.0 o buffer KCl-HCl pH 2.0. Los tubos se agitaron en un Cole Parmer Roto Torque (Vernon Hills, IL, EE.UU.) durante 24h para asegurar la completa hidratación de las microcápsulas seguido por una centrifugación a 4000rpm durante 15min. Se desechó el sobrenadante y el material precipitado se mantuvo en el horno a 105°C hasta peso constante. Con este método, la cantidad de biopolímero que no coacerva queda en el sobrenadante junto con algunas microcápsulas coacervadas que son desechados al eliminar el sobrenadante. Entonces para evaluar la solubilidad real de las microcápsulas se debe tener en cuenta lo anterior. Por lo tanto la solubilidad se estimó de la siguiente manera: La masa de material recuperado se le restó a la masa de la muestra original corregida por el %RC y la solubilidad se calculó y se expresó

como el porcentaje de microcápsulas solubilizadas con respecto a la masa original de las microcápsulas utilizadas para el análisis corregida por el %RC como se ilustra en la siguiente ecuación:

$$\%Solubilidad = \frac{\{[m_h(1 - x_h)A \%RC] + m_h(1 - x_h)B\} - m_s}{\{[m_h(1 - x_h)A \%RC] + m_h(1 - x_h)B\}}$$

Donde:

$[m_h(1 - x_h)A \%RC]$ = Masa de biopolímeros coacervados

$m_h(1 - x_h)B$ = Masa de la emulsión W/O en los coacervados

Por lo tanto el termino $[m_h(1 - x_h)A \%RC] + m_h(1 - x_h)B$ es la masa de la muestra húmeda que realmente coacervó.

m_s =masa de la muestra seca obtenida después del análisis de solubilidad (gss)

m_h = masa de la muestra húmeda utilizada para el análisis de solubilidad (gTot)

x_h =fracción de humedad de la muestra húmeda (gH₂O/gTot), el término $(1 - x_h)$ tiene las unidades de gss/gTot

A=Fracción de biopolímeros de acuerdo a la relación material de pared/emulsión W/O 0.666 para la relación 2:1 y 0.5 para la relación 1:1.

B=Fracción emulsión W/O de acuerdo a la relación material de pared/emulsión W/O 0.333 para la relación 2:1 y 0.5 para la relación 1:1.

5.4.11 Evaluación del efecto protector de la microcápsula *in vitro* a valores de pH gastrointestinal

El objetivo primordial de las microcápsulas desarrolladas es el proteger a la insulina en el estómago y asegurarse de que llegue al intestino en una forma biológicamente activa. Una vez en intestino se pretende que la emulsión W/O que contiene en su Fi insulina sea absorbida en el intestino acarreado a la insulina que lleva dentro. Para evaluar el efecto protector de las microcápsulas desarrolladas se pesaron alrededor de

0.2g del polvo obtenido en un tubo Falcon y se suspendieron en 20mL de buffer KCl-HCl pH 2.0. Se incubaron por 2h a 37°C bajo agitación en un agitador Dual Shaker. Al término de este período de agitación se ajustó el pH de la mezcla a 7.0 con 500µL de NaOH 1M. Finalmente se incubaron durante 4h a 37°C, simulando de esta forma su tránsito por el tracto digestivo. Posteriormente se le adicionó a la mezcla 20mL de acetonitrilo para romper la emulsión W/O y se centrifugó la muestra 4000rpm por 15 min. Se tomaron 50µL de la muestra y se aforaron a 50mL usando buffer de fosfatos pH = 7.0. Al mismo tiempo se corrió un testigo con insulina activa sin encapsular, para lo cual se colocaron 40µL de la solución de insulina preparada como se describe en la sección 5.3.3.6 en 20 mL de buffer KCl-HCl pH 2.0 y se siguió el mismo tratamiento hasta la adición de acetonitrilo. Se tomaron 50µL de la muestra y se aforaron a 50mL usando buffer de fosfatos pH = 7.0. La cantidad de insulina bioactiva se evaluó con la técnica de ELISA descrita anteriormente. La prueba se llevó a cabo únicamente para la formulación con la relación material de pared:emulsión W/O 1:1 ya que esta formulación resultó con mayor cantidad insulina por gramo de sólido seco con respecto a la de la formulación con material de pared:emulsión W/O 2:1.

El efecto protector se expresó como la relación de las UI de insulina activa por g_{ss} calculado después del paso por el tracto digestivo simulado con respecto a las UI de insulina activa por g_{ss} utilizadas en la preparación de las microcápsulas y corregida por la BA_r evaluada en el punto 5.3.9.3., tal y como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Efecto Protector = \frac{F_{final}}{BA_r \times F_{Produccion}} \times 100$$

Donde:

BA_r= Actividad biológica residual de la insulina (%)

F_{Final}= UI insulina activa por g_{ss} después del tiempo de incubación (UI /g_{ss})

F_{Producción}= UI insulina activa por g_{ss} utilizadas para producir las microcápsulas (UI /g_{ss})

5.4.12 Análisis Estadístico

Los experimentos fueron realizados por triplicado y se expresaron como el promedio \pm la desviación estándar además de realizar un análisis de varianza (ANOVA) utilizando la prueba de Tukey para establecer diferencias estadísticamente significativas entre las medias.

Resultados y discusión

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Preparación de la emulsión agua en aceite

La estabilidad de la emulsión agua en aceite W/O por sus siglas en inglés “*water in oil*” es muy importante para el desarrollo de emulsiones dobles agua en aceite en agua W/O/W por sus siglas en inglés “*water in oil in water*” estables (Okochi and Nakano, 1997), por tal motivo se llevó a cabo una prueba de estabilidad de la emulsión W/O a las tres proporciones propuestas en el desarrollo experimental. El Cuadro 10 muestra la variación de tamaño de glóbulo de la emulsión W/O conteniendo 2, 4, 6, 8 y 10%p/p de polirricinoleato de poliglicerilo PGPR por sus siglas en inglés “*Polyglycerol polyricinoleate*” en la fase oleosa en función del tiempo para las tres proporciones fase acuosa interna:fase oleosa (Fi:FO) utilizadas. Se observa en este cuadro que para la proporción Fi:FO 1:4 no existen cambios significativos en el tamaño del glóbulo desde 4 al 10% de PGPR con respecto al tiempo, pero si existe un aumento en el tamaño del glóbulo al 2% de PGPR sugiriendo una menor estabilidad. También se observa que conforme aumenta la Fi, esto es en las proporciones Fi:FO 1:3 y 1:2 disminuye la estabilidad de la emulsión W/O observándose separación de fases a los 120 días para una concentración de 2% de PGPR y 150 días para una concentración de 4% y 6% de PGPR. En cuanto a las concentraciones del 8 y 10% de PGPR en la fase oleosa después de 120 días no se observaron cambios significativos en el tamaño del glóbulo concordando con los resultados publicados por Bonnet et al., (2009). La estabilidad de la emulsión W/O es de gran importancia sobre todo si se requiere una vida larga de anaquel del producto desarrollado, por lo que para lograr emulsiones W/O estables se deberá trabajar con concentraciones entre 8 y 10% de PGPR en la FO. En el presente trabajo se eligió utilizar una concentración de PGPR del 8% ya que la emulsión W/O resultó ser estable hasta por 3 meses y siempre será deseable trabajar con la mínima concentración de emulsificante posible.

La microestructura de la emulsión W/O se puede observar en la Figura 18. En esta figura se puede apreciar como la Fi se encuentra dispersa en la FO conteniendo 8%p/p PGPR.

Cuadro 10 Estabilidad de la emulsión agua en aceite

Fi:FO	PGPR (%p/p)	Tamaño del glóbulo (nm) en función del tiempo (días)					
		0	30	60	90	120	150
1:4	2	671±15	682±23	685±35	690±10	710±18	723±14
	4	689±25	690±32	685±44	691±21	678±45	682±27
	6	660±16	672±23	658±34	683±41	658±10	644±24
	8	665±06	670±26	675±32	662±18	645±29	660±36
	10	675±20	665±22	664±32	654±35	668±16	670±26
1:3	2	732±27	744±25	790±10	840±12	Separación de fases	-
	4	729±32	734±23	742±36	780±12	795±15	Separación de fases
	6	744±45	732±25	752±14	743±41	742±13	Separación de fases
	8	721±25	715±35	712±32	704±36	710±15	729±16
	10	732±18	744±19	730±32	721±28	739±33	742±38
1:2	2	716±45	745±26	788±25	830±16	Separación de fases	-
	4	723±32	734±22	745±12	750±21	780±38	Separación de fases
	6	754±65	764±55	732±42	742±25	733±13	Separación de fases
	8	774±37	765±17	769±29	778±23	780±31	772±31
	10	744±42	732±22	742±53	753±12	735±22	755±29

La Figura 19 muestra la distribución de tamaño de glóbulo de las emulsiones W/O preparadas con aceite de soya y PGPR al 8% p/p para las proporciones Fi:FO 1:4, 1:3 y 1:2 al final del periodo de agitación a 5000rpm. En esta figura se aprecia que las emulsiones W/O con proporciones Fi:FO 1:2 y 1:3 tuvieron una distribución de tamaño muy similar con un diámetro medio de alrededor de 774±37nm and 721±25nm respectivamente, mientras que la emulsión con una proporción Fi:FO 1:4 presentó una distribución muy similar con un tamaño promedio menor de alrededor de 665±6nm. Éstos valores son similares a los reportados por Mun et al. (2010) para emulsiones W/O utilizando PGPR y aceite de soya en la fase continua y Matos et al. (2014) para emulsiones W/O utilizando PGPR y Miglyol 812 como fase continua.

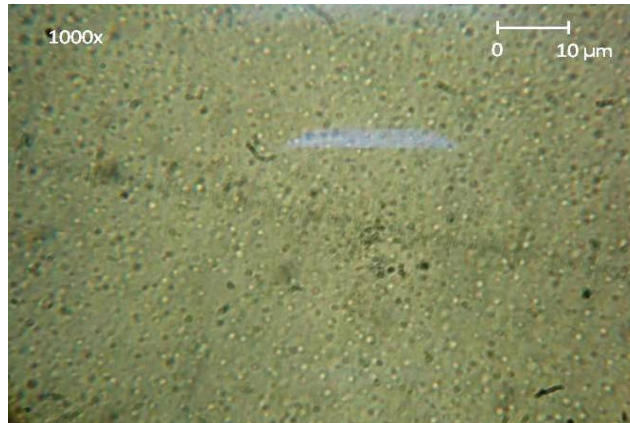


Figura 18 Microestructura de la emulsión agua en aceite proporción fase acuosa interna:fase oleosa 1:4, polirricinoleato de poliglicerilo 8%p/p

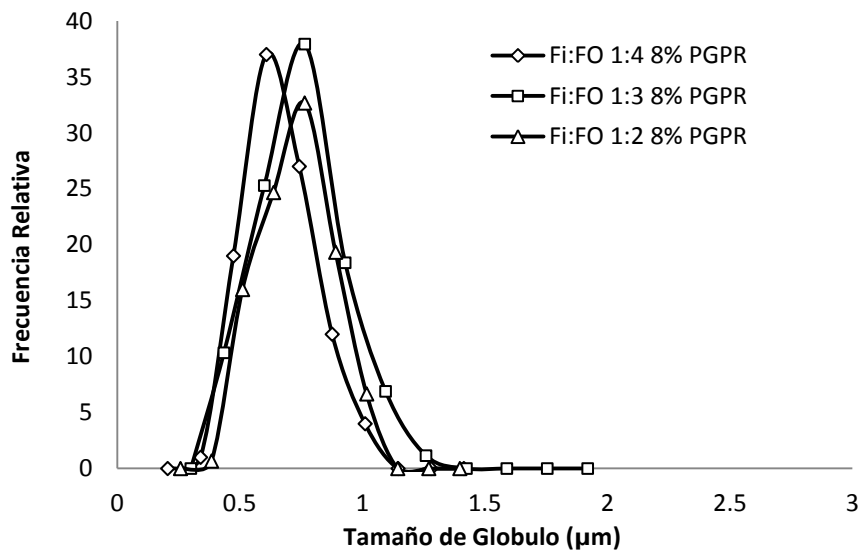


Figura 19 Distribución de tamaño de partícula de la emulsión agua en aceite a distintas proporciones fase acuosa interna:fase oleosa con 8%p/p de polirricinoleato de poliglicerilo

6.2 Preparación de la emulsión doble agua aceite en agua y eficiencia de encapsulación

Durante la preparación de las emulsiones dobles W/O/W la segunda etapa de homogenización es muy importante. Una agitación excesiva puede ocasionar la ruptura

de los glóbulos internos formando emulsiones simples del tipo aceite en agua o agua en aceite (Khan et al., 2006). Por tal motivo, se utilizó una solución de NaCl 4%p/p con glicerol 15%p/p como indicador en la Fi para optimizar las condiciones de homogenización para obtener la máxima eficiencia de encapsulación (EE).

El Cuadro 11 muestra los valores obtenidos de conductividad de la solución de proteína aislada de suero de leche WPI por sus siglas en inglés "*Whey protein isolate*" al 10%p/v y del agua destilada. Se observa que el WPI incrementó la conductividad del agua destilada, debido a las sales que contiene la materia prima.

Cuadro 11 Valores de conductividad de la fase acuosa externa asilado de proteína de suero de leche 10%p/v y del agua destilada

Sustancia	Conductividad (μS)
WPI 10% p/v	3090 \pm 21.6
Agua Destilada	5.2 \pm 0.92

La Figura 20 muestra las curvas de calibración obtenidas para la determinación de las eficiencias de encapsulación para los sistemas de emulsión doble W/O/W a partir de una emulsión W/O con proporciones 1:2, 1:3 y 1:4 de Fi:FO y con proporciones WPI/emulsión W/O 0.66:1, 1:1 y 1.33:1. En todos los casos se puede observar una relación lineal de la EE con la conductividad del sistema. Al medir la conductividad de la emulsión doble W/O/W, en realidad se está midiendo la conductividad de la fase acuosa externa.

Estas curvas fueron utilizadas para optimizar las condiciones de preparación de la emulsión doble W/O/W a distintas velocidades de homogenización. La Figura 21 muestra las eficiencias de encapsulación para una relación WPI/emulsión W/O 1:1, Fi:FO 1:3 con 8%p/p PGPR en función del tiempo de mezclado a tres velocidades de homogenización diferentes (5000, 10000 y 15000rpm).

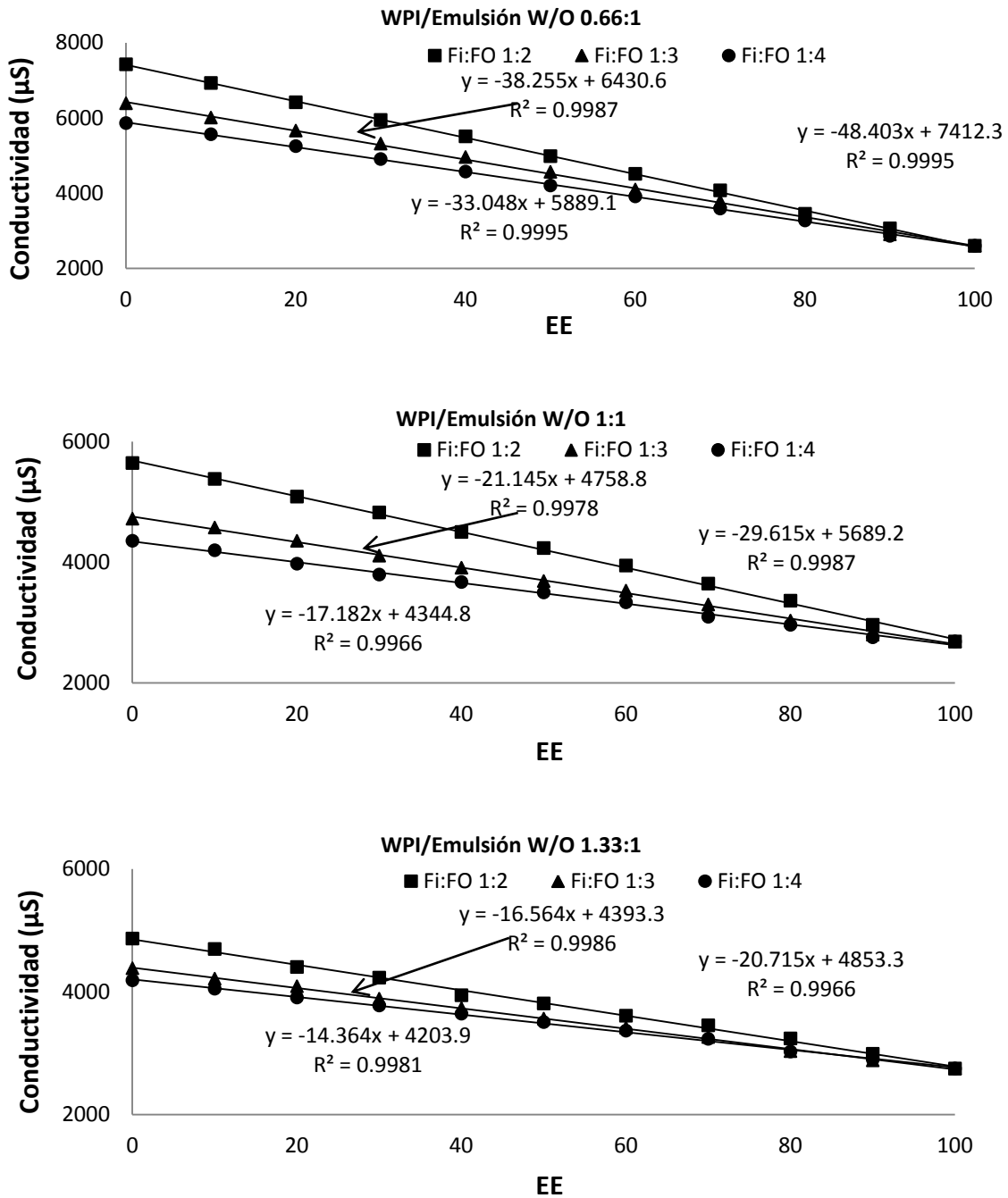


Figura 20 Curvas de calibración para determinar la eficiencia de encapsulación en una emulsión doble agua aceite en agua a partir de una emulsión agua en aceite con proporciones fase acuosa interna:fase oleosa 1:2, 1:3 y 1:4

En esta figura se observa claramente que el esfuerzo de corte afecta directamente la integridad de la emulsión doble W/O/W manteniendo su estructura durante mayor tiempo a una velocidad de homogenización de 5000rpm y rompiéndose más rápidamente a velocidades de homogenización de 15000rpm.

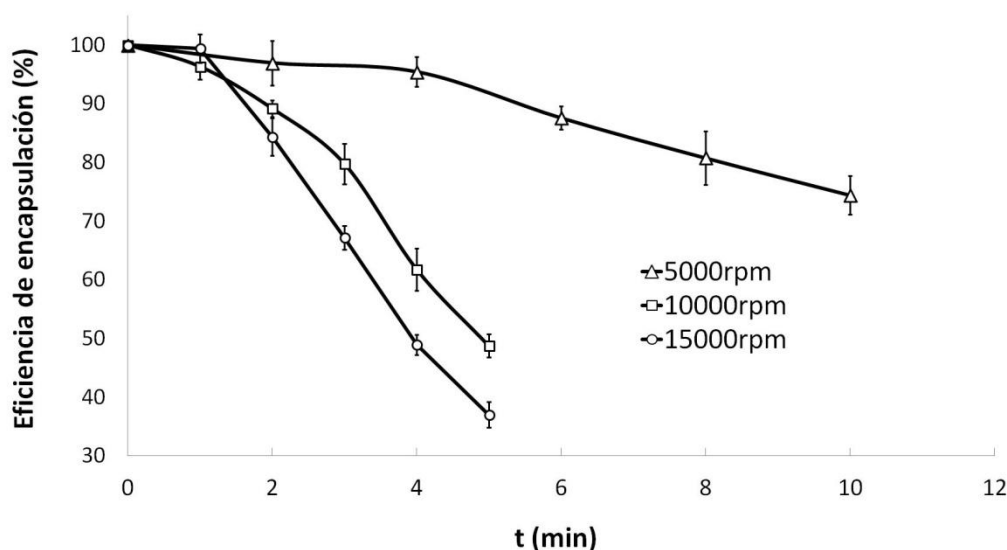


Figura 21 Eficiencia de encapsulación de la emulsión doble agua aceite en agua con relación aislado de proteína de suero de leche:emulsión agua en aceite 1:1, Fase acuosa interna:fase oleosa 1:3 con 8%p/p de polirricinoleato de poliglicerilo en función del tiempo a distintas velocidades de homogenización

La caída en la eficiencia de encapsulación se origina por la ruptura de los pequeños glóbulos de Fi y la liberación de NaCl de la Fi hacia la fase acuosa externa durante la homogenización.

La Figura 22 muestra que a una velocidad de homogenización de 5000rpm por 2min (EE de $95.4 \pm 1.4\%$, Figura 21) la distribución del tamaño del glóbulo resultó ser polidispersa con tres picos a 12, 20 y $40\mu\text{m}$, mientras que a velocidades de 10000 y 15000rpm por 1min (eficiencias de encapsulación de 96.6 ± 0.76 y $99.4 \pm 0.32\%$ respectivamente Figura 21) la distribución del tamaño del glóbulo resultó ser mas angosta con solo dos picos a 13 y $20\mu\text{m}$. Ésta distribución bimodal ya ha sido reportada previamente por Weiss and Muschiolik (2007), Mun et al. (2010) y Benichou et al. (2007), para emulsiones dobles W/O/W. Los resultados de la Figura 21 y Figura 22

sugieren que para la obtención de emulsiones dobles W/O/W con altas eficiencias de encapsulación y con el menor tamaño de partícula posible es necesario considerar tanto la velocidad de homogenización como el tiempo de mezclado. Puesto que siempre es deseable tener la distribución de tamaño lo más estrecha posible, para los siguientes experimentos se utilizó la homogenización a 15000rpm por 1min.

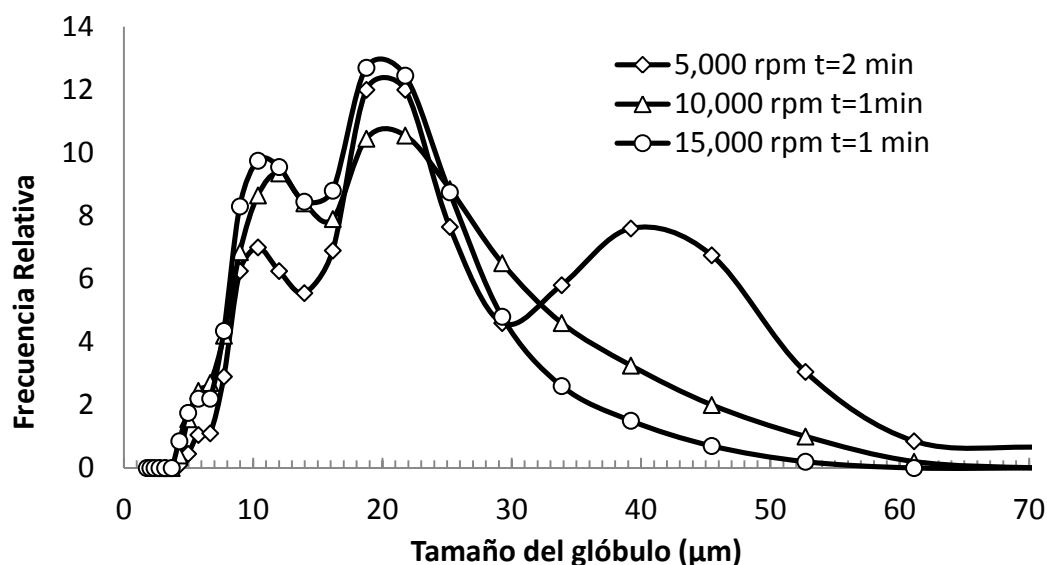


Figura 22 Distribución de tamaño de glóbulo de la emulsión doble agua aceite en agua con relación asilado de proteína de suero de leche/emulsión agua en aceite 1:1, Fase acuosa interna/fase oleosa 1:3 con 8%p/p de polirricinoleato de poliglicerilo a diferentes tiempos y velocidades de homogenización

La morfología de la emulsión doble W/O/W obtenida se muestra en la Figura 23 donde puede apreciarse claramente la estructura típica de este tipo de emulsiones (glóbulos de una FO con glóbulos más pequeños de la Fi dispersos en ella). Esta imagen también confirma la distribución bimodal ya que pueden observarse dos poblaciones principales de glóbulos de alrededor de 10 y 20μm.

El Cuadro 12 muestra las eficiencias de encapsulación de acuerdo a lo planteado en la sección 5.2.2.1. En este cuadro se aprecia que para las proporciones Fi:FO 1:3 y 1:4

no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la EE para las tres proporciones WPI/emulsión W/O utilizadas.

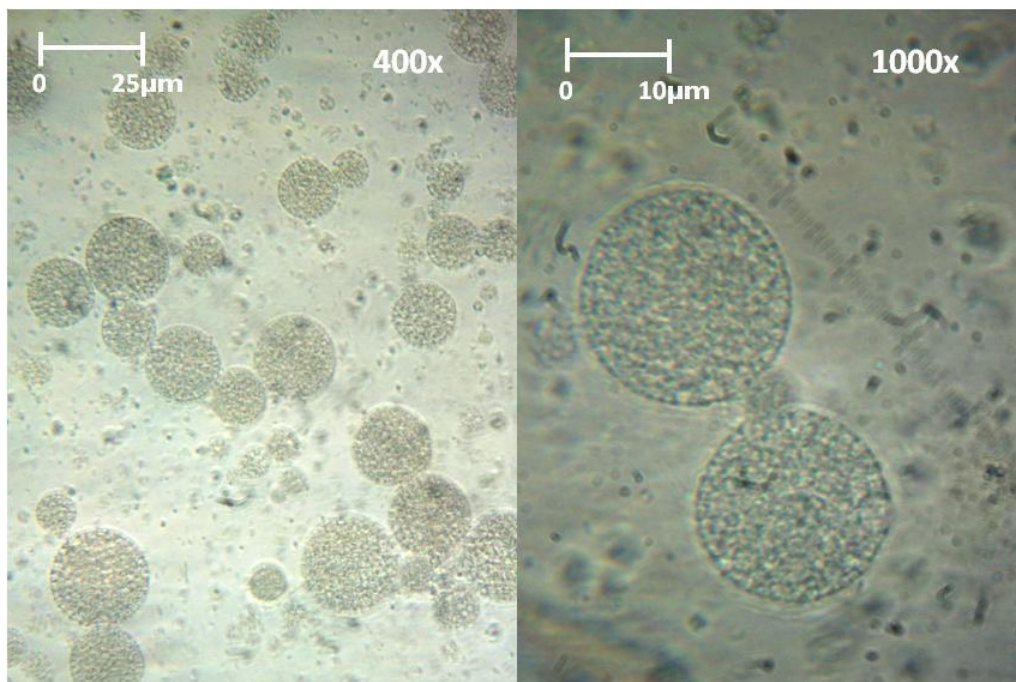


Figura 23 Microfotografías obtenidas por microscopia óptica de la emulsión doble agua aceite en agua con polirricinoleato de poliglicerilo 8%p/p en la fase oleosa proporción fase acuosa interna:fase oleosa 1:3 con una proporción aislado de proteína de suero de leche: emulsión agua en aceite 1:1

Cuadro 12 Eficiencias de encapsulación a distintas proporciones fase acuosa interna:fase oleosa y a distintas proporciones aislado de proteína de suero de leche:emulsión agua en aceite

Fi:FO	WPI:Emulsión W/O		
	0.66:1	1:1	1.33:1
1:4	98.5±0.63 ^a	98.2±2.4 ^a	98.8±0.91 ^a
1:3	99.0±0.14 ^a	95.9±0.84 ^a	99.3±0.28 ^a
1:2	88.7±0.99 ^b	87.4±1.13 ^b	89.5±1.13 ^b

Los valores medios con letras distintas difieren significativamente (p <0.05).

Sin embargo para la proporción Fi:FO 1:2 se encontró una reducción estadísticamente significativa de alrededor del 10% en la EE para las tres proporciones WPI/Emulsión W/O utilizadas.

Estos resultados sugieren que la proporción WPI/Emulsión W/O no tiene ningún efecto sobre la EE a diferencia de la proporción Fi:FO que a mayor cantidad de Fi en la FO disminuye la EE. Esta situación se debe a que al dispersar una mayor cantidad de Fi en la FO la película interfacial que se crea es más débil, por lo tanto durante la homogenización en la segunda etapa de preparación de la emulsión doble W/O/W una mayor cantidad de Fi se libera hacia la fase acuosa externa. Aunque para la proporciones Fi:FO 1:3 y 1:4 se obtuvo una mayor EE, se utilizó la proporción Fi:FO 1:2 para los siguientes experimentos ya que se puede cargar una mayor cantidad de Fi en la FO con solo un 10% de pérdida en la EE. Las eficiencias de encapsulación de las emulsiones dobles W/O/W coinciden con las reportadas por Mun et al., (2010), Cunha et al., (1997a), Cournarie et al., (2004a) y Shima et al., (2006) en emulsiones dobles W/O/W utilizando distintos surfactantes en la fase acuosa externa, quienes reportaron valores superiores al 90% de encapsulación

6.3 Evaluación de potencial Z y rendimiento de coacervación

La coacervación es una interacción basada en la atracción que ocurre en mezclas de biopolímeros con cargas opuestas, formando coacervados los cuales precipitan debido a la repulsión del disolvente formando dos fases: una rica en coacervado y otra rica en disolvente (Gouin, 2004). La relación de biopolímeros en la mezcla es una variable crítica para controlar el balance de cargas en el sistema (Ye, 2008). Por lo tanto para promover la coacervación de manera eficiente (la máxima atracción posible entre los biopolímeros) se evaluó el potencial Z en función del pH tanto para los biopolímeros individuales como para mezclas binarias con proporciones WPI:polisacárido de 1:1, 2:1 y 3:1 con el objetivo de encontrar el valor de pH donde la mezcla binaria presenta un valor de potencial $Z=0$ (máxima diferencia estequiométrica de cargas).

Como puede apreciarse en las Figura 24, Figura 25, Figura 26 y Figura 27 el punto isoeléctrico del WPI es de alrededor de 4.3 el cual es muy similar al reportado por Klein et al. (2010). También se observa que el WPI se carga positivamente por debajo de su PI y negativamente por arriba de su PI. Por otro lado la carboximetilcelulosa CMC (Figura 24), el alginato de sodio SA (Figura 25) y el ácido poliacrílico PAA (Figura 26) se cargaron negativamente en todo el intervalo de pH estudiado mientras que el quitosano CHIT (Figura 27) se cargó positivamente en todo el intervalo de pH estudiado denotando su carácter catiónico.

Con estos resultados fue posible predecir la región más apropiada para la formación de complejos electrostáticos entre el WPI y los polisacáridos estudiados las cuales fueron entre pH 6 y pH 8 para el sistema WPI/CHIT y entre pH 2 y pH 3.5 para los sistemas WPI/PAA, WPI/CMC y WPI/SA ya que en estas regiones la carga neta de los biopolímeros es opuesta.

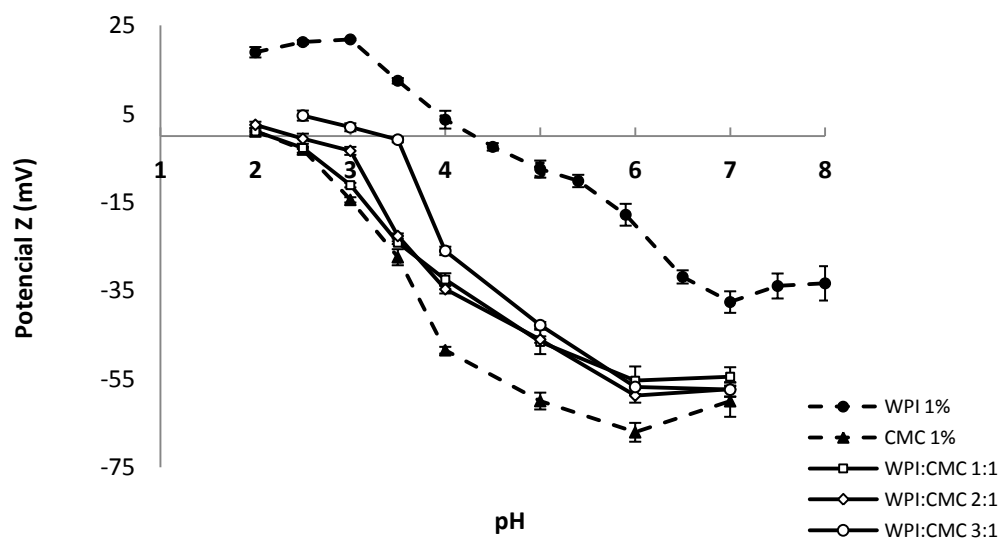


Figura 24 Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche/carboximetilcelulosa

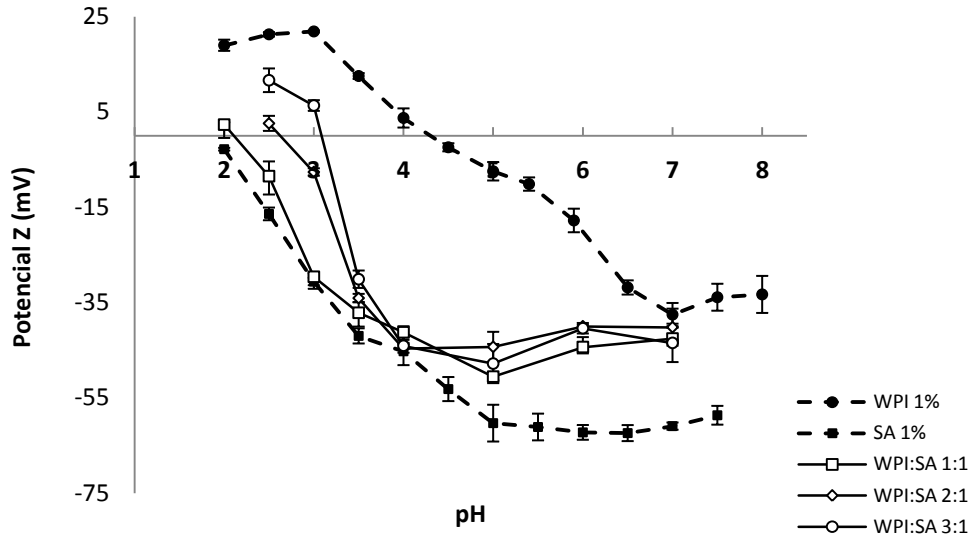


Figura 25 Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche/alginate de sodio

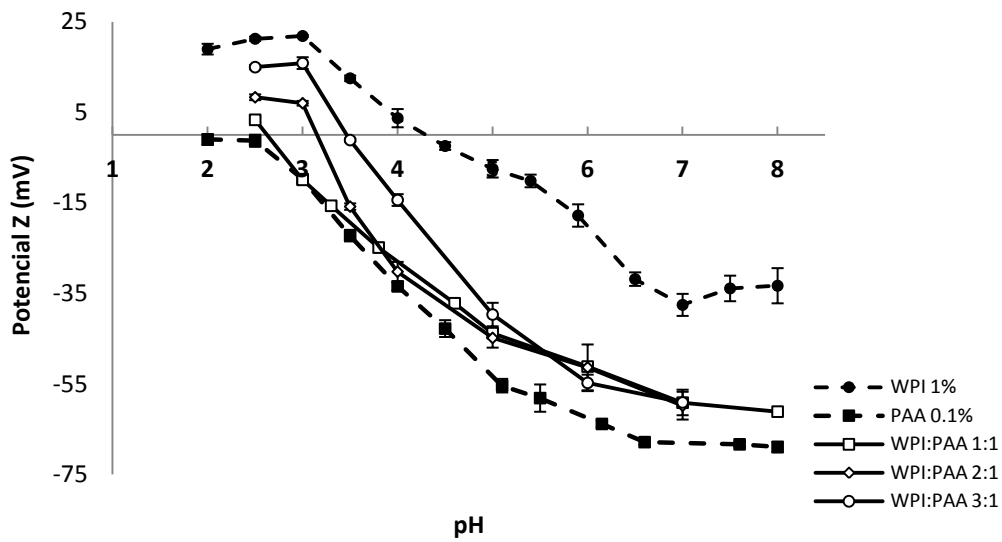


Figura 26 Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche/ácido poliacrílico

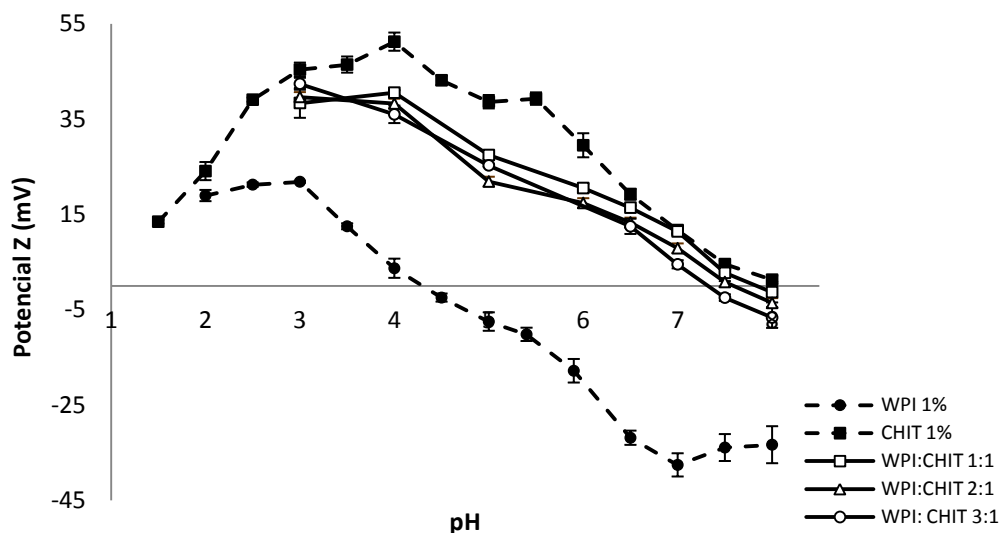


Figura 27 Potencial Z en función del pH para el sistema aislado de proteína de suero de leche/quitosano

El valor de pH donde existe la máxima diferencia estequiométrica de cargas se determinó identificando el punto de potencial $Z=0$ de las mezclas binarias a distintas proporciones WPI:polisacárido (1:1, 2:1 y 3:1) que es el valor de pH al cual el complejo insoluble precipitó. Se encontró que el valor de pH de la máxima diferencia estequiométrica de cargas depende de la proporción WPI:polisacárido. Mientras más WPI contenía la mezcla binaria el valor de pH de máxima diferencia estequiométrica de cargas resultó estar más cerca del PI del WPI; esto puede observarse en las figura 23-26. El Cuadro 13 muestra los valores de pH al cual se encontró el pH de coacervación (Potencial $Z=0$) de las muestras binarias. Como se observa en el Cuadro 13 la máxima atracción electrostática entre los dos polímeros se llevó a cabo en la región alcalina para el sistema WPI/CHIT y en la región ácida en los sistemas WPI/PAA, WPI/SA y WPI/CMC.

Cuadro 13 Valores de pH donde existe la máxima atracción electrostática entre biopolímeros de los sistemas seleccionados

Sistema	Proporción WPI/polisacárido	pH de máxima atracción electrostática
WPI/CMC	1:1	2.0
	2:1	2.5
	3:1	3.5
WPI/SA	1:1	2.0
	2:1	2.5
	3:1	3.5
WPI/PAA	1:1	3.5
	2:1	2.5
	3:1	3.2
WPI/CHIT	1:1	7.8
	2:1	7.5
	3:1	7.2

Con base en esta información se tomó la decisión de que polisacáridos utilizar para la coacervación de la emulsión doble W/O/W. El objetivo de la microcápsula desarrollada es que proteja a la insulina a valores de pH del estómago (pH=2.0) y libere a la insulina en el intestino (pH 7.0). De acuerdo a los resultados el pH de máxima atracción electrostática del sistema WPI/CHIT para la proporción WPI/CHIT 2:1 fue 7.5. Es decir a valores de pH estomacales la microcápsula desarrollada se disolvería completamente y dejaría a la emulsión W/O con la insulina expuesta al medio gástrico intestinal y a la pepsina presente en este medio. Por tal motivo se descartó este polisacárido para la preparación de las microcápsulas.

Los sistemas seleccionados fueron el WPI/CMC y el WPI/SA por presentar la máxima atracción electrostática a pH= 2.5 por lo que se espera que las microcápsulas preparadas con estos sistemas protejan a la insulina en las condiciones ácidas del estómago y se disuelvan en el intestino mejorando su biodisponibilidad relativa. El sistema WPI/PAA fue descartado por que aunque su máxima atracción electrostática

fue a un pH de 3.0, el PAA forma geles a muy bajas concentraciones (0.5%p/v) aumentando enormemente la viscosidad del sistema y haciendo difícil su manejo.

Se estudió el rendimiento de coacervación (%RC) en función del pH y de la proporción WPI:polisacárido (1:1, 2:1, 3:1) en los sistemas seleccionados. Los valores de pH estudiados fueron 2, 2.5, 3.0 y 3.5. El máximo %RC para el sistema WPI-CMC para las proporciones WPI:CMC 2:1 y 3:1 ($91.1\pm 0.67\%$ y $84.4\pm 0.14\%$) se obtuvo a valores de pH de 2.5 y 3.0 respectivamente (Figura 28). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se llevó a cabo la coacervación en estas condiciones. En cambio el %RC resultó ser muy bajo a una proporción WPI:CMC 1:1 a valores de pH de 2.5 y 3.0 ($31.7\pm 0.47\%$ y $14.7\pm 0.48\%$ respectivamente).

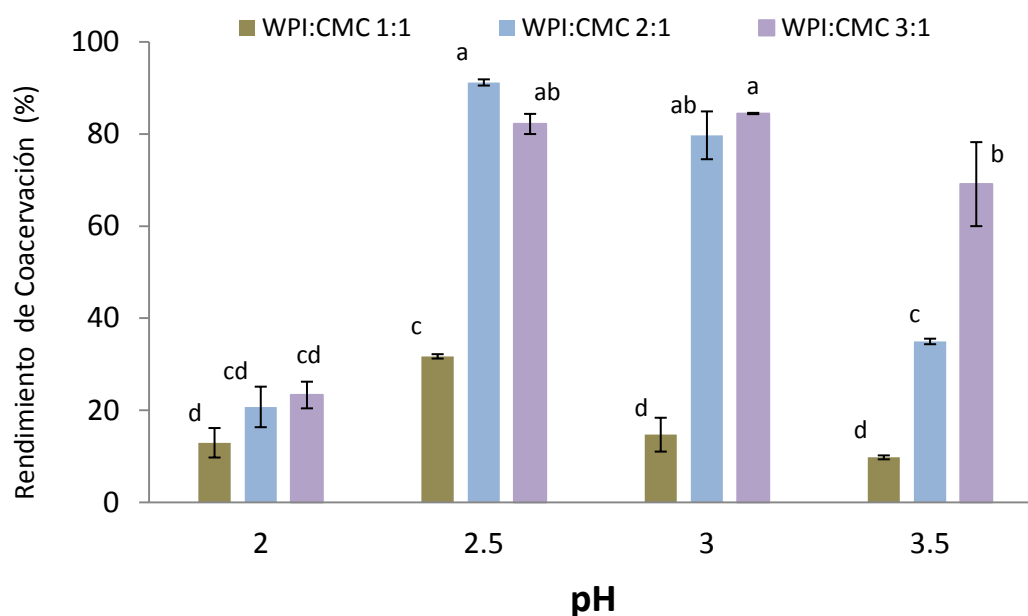


Figura 28 Rendimiento de coacervación del sistema aislado de proteína de suero de leche/carboximetilcelulosa. Los valores medios con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$)

Un comportamiento distinto se observó para el sistema WPI:SA donde los más altos %RC's ($78.9\pm 1.32\%$, $79.2\pm 2.52\%$, $78.6\pm 0.83\%$ y $78.6\pm 0.33\%$) se obtuvieron para las proporciones CMC-SA de 2:1 (pH=2.5), 3:1 (pH=2.5), 3:1 (pH=3.0) y 3:1 (pH=3.5) respectivamente (Figura 29). Cuando la coacervación se llevó a cabo a una proporción

WPI:SA 1:1 el %RC resultó ser estadísticamente más bajo a valores de pH 2.5 ($66.4 \pm 4.4\%$) pero significativamente mayor que para el sistema WPI-CMC al mismo valor de pH.

La cantidad de coacervado formado está relacionada con el número de grupos cargados de forma opuesta tanto en el WPI como en la CMC y el SA en las condiciones experimentales. A una proporción WPI:polisacárido 1:1, los grupos negativos ya sea de la CMC o el SA están en exceso por el mayor tamaño de las moléculas de CMC y SA con respecto al WPI.

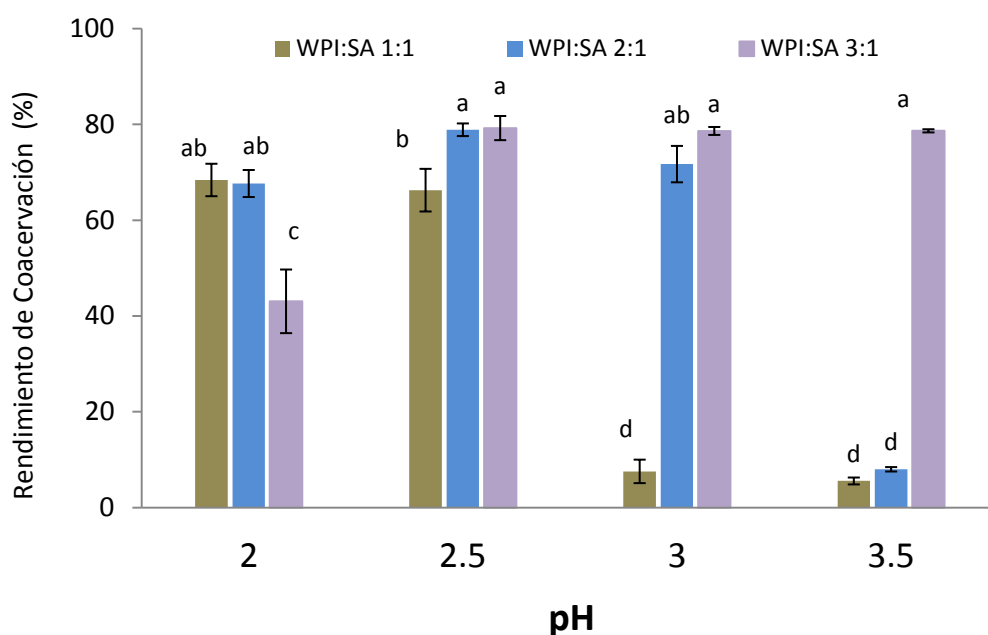


Figura 29 Rendimiento de coacervación del sistema aislado de proteína de suero de leche/alginate de sodio. Los valores medios con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$)

Finalmente, el %RC también fue evaluado en función de la concentración total de biopolímeros (WPI+CMC o WPI+SA) en solución 1% y 2% (Figura 30) a un pH de 2.5. Para el sistema WPI-CMC no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el %RC entre el 1 y 2% de sólidos totales ($89.9 \pm 3.35\%$ y $91.18 \pm 1.5\%$ respectivamente), y al contrario para el sistema WPI-SA se encontró un %RC significativamente mayor al 2% de sólidos totales ($91.1 \pm 1.5\%$) con respecto al 1% de sólidos totales ($78.9 \pm 1.32\%$). Por tal motivo se seleccionó trabajar al 2% de sólidos

totales para los siguientes experimentos con el objetivo de tener soluciones más concentradas en el proceso de secado.

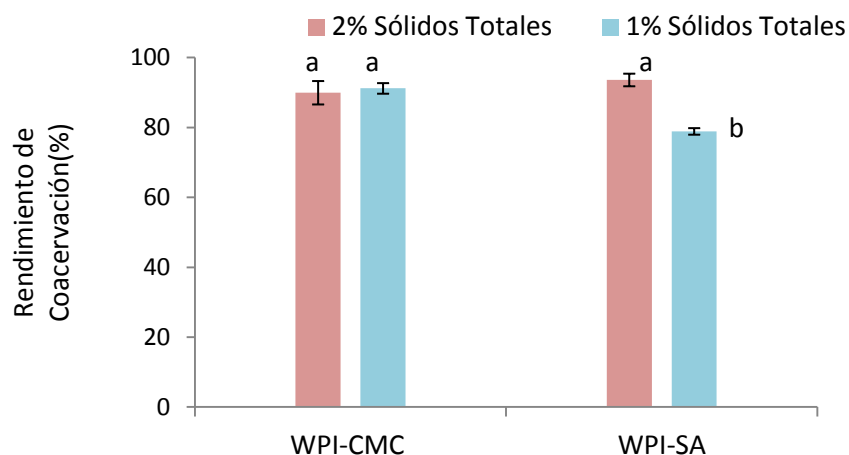


Figura 30 Rendimiento de coacervación del sistema aislado de proteína de suero de leche/carboximetilcelulosa y aislado de proteína de suero de leche/alginate de sodio al 1 y 2% de sólidos totales pH 2.5 Los valores medios con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$)

6.4 Coacervación de la emulsión doble agua en aceite en agua

La coacervación de la emulsión doble W/O/W se llevó a cabo como se indicó en la sección 5.2.3.4. El Cuadro 14 resume las mejores condiciones de coacervación de las emulsiones dobles W/O/W obtenidas de los resultados previos. Por lo tanto para los siguientes experimentos se utilizaron estos parámetros.

En el Cuadro 15 se observa una formulación típica de la coacervación de las emulsiones dobles W/O/W para las proporciones material pared/Emulsión W/O planteadas de acuerdo al cuadro 14. El pH de la mezcla resultó de 6.5 ± 0.2 para las microcápsulas coacervadas con CMC y 6.6 ± 0.2 para las microcápsulas coacervadas con SA. Una vez que el pH de las mezclas se redujo al pH de máxima diferencia estequiométrica de cargas ($\text{pH}=2.5$ tanto para la CMC como para el SA) se observó la separación de fases entre el disolvente y la fase rica en biopolímeros como se muestra

en la Figura 31 después de 24 hrs de reposo confirmando que la coacervación se llevó a cabo de manera correcta.

Cuadro 14 Parámetros para la coacervación de emulsiones dobles agua en aceite en agua

Parámetro	Valor
Fi:FO	1:2
WPI:Emulsión W/O	1.33:1, 0.66:1
Material pared:Emulsión W/O	1:1, 2:1
WPI:polisacárido	2:1
CMC, SA	1% p/v
WPI	10% p/v
Concentración Total de Biopolímeros	2%

Cuadro 15 Formulación típica para la coacervación de las emulsiones dobles agua en aceite en agua

	Material Pared/Emulsión W/O	
	1:1	2:1
^a Emulsión W/O Fi:FO 1:2 (g)	18	9
^b WPI 10% p/v (g)	120	120
^{a+b} Emulsión doble W/O/W (g)	138	129
^c CMC o SA 1%p/v (g)	600	600
^{a+b+c} Masa Total (g)	738	729

Por otro lado se llevó a cabo el análisis por microscopia óptica de la emulsión doble W/O/W coacervada para corroborar que conservó su estructura intacta. La Figura 32a muestra las microcápsulas coacervadas del sistema WPI/CMC donde se aprecia claramente la estructura de la emulsión doble W/O/W (pequeños glóbulos dentro de un glóbulo mayor). Además en la Figura 32b se aprecian los cúmulos amorfos por la

ausencia de cargas de repulsión en la superficie confirmándose por este medio que la coacervación se llevó a cabo de forma correcta.



Figura 31 Separación de fases después de la coacervación del sistema aislado de proteína de suero de leche/carboximetilcelulosa y aislado de proteína de suero de leche/alginate de sodio

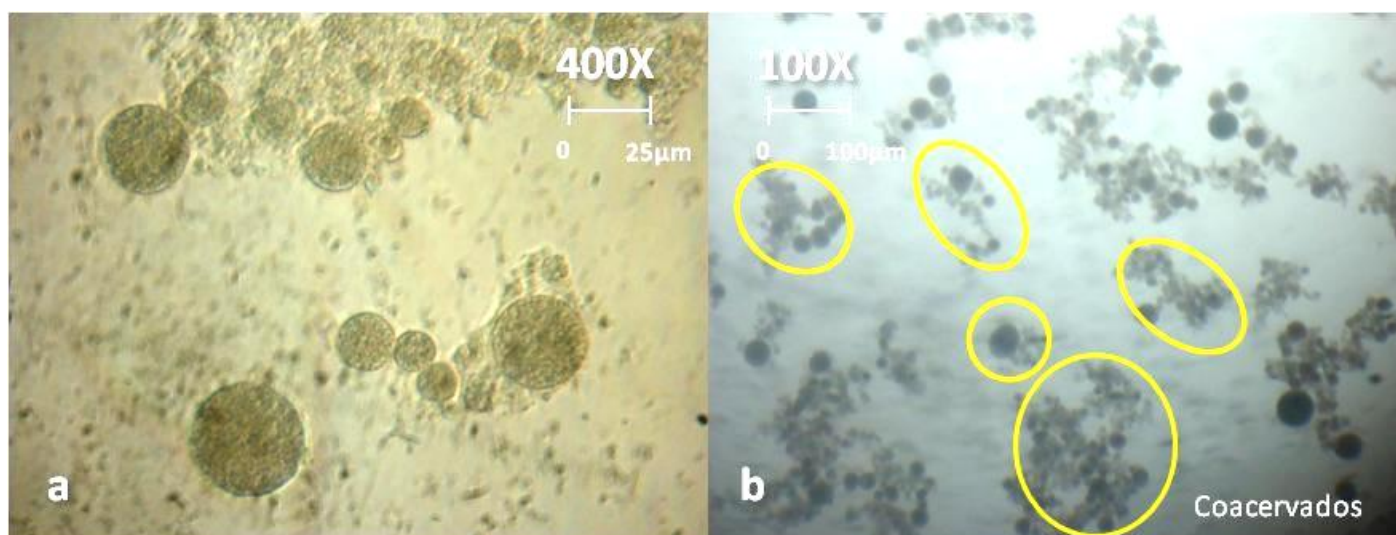


Figura 32 Emulsión doble coacervada del sistema aislado de proteína de suero de leche/carboximetilcelulosa material de pared:emulsión agua en aceite 1:1 (a:400x, b:100x)

De igual forma la Figura 33a muestra las microcápsulas coacervadas del sistema WPI/SA donde al igual que el sistema WPI/CMC se observa la estructura de la doble

emulsión y en la Figura 33b se aprecia como las microcápsulas tienden a agruparse formando cúmulos amorfos por la ausencia de cargas de repulsión en la superficie confirmándose por este medio que la coacervación se llevó a cabo de forma correcta.

6.5 Secado por aspersion de la emulsión doble agua en aceite en agua coacervada

Una de las principales reticencias para utilizar el secado por aspersion para la producción de formulaciones de proteínas o péptidos, es si las proteínas termolábiles pueden resistir la desnaturalización por efecto del aire caliente (Ameri y Maa, 2006). Esto se explica con un principio fisicoquímico sencillo. Durante la primera fase de secado la superficie de la gota se mantiene saturada de humedad por lo que la temperatura de la superficie de la gota se mantiene a la temperatura de bulbo húmedo del aire de secado que es significativamente menor que la T_e .

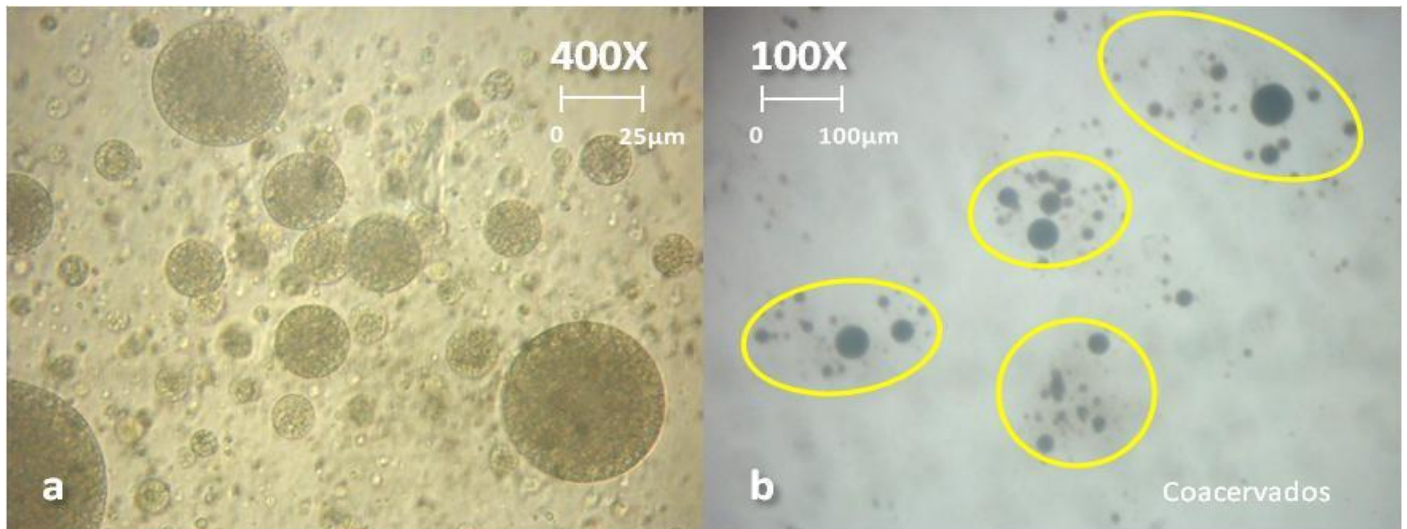


Figura 33 Emulsión doble coacervada del sistema aislado de proteína de suero de leche/alginate de sodio material de pared:emulsión agua en aceite 1:1 (a:400x, b:100x)

El calor del aire de secado se emplea para evaporar el agua de la superficie de la gota. Conforme avanza el secado, la temperatura de la gota comienza a subir y se aproxima

a la T_s ya que la difusión del agua a la superficie de la gota no puede mantener saturada de humedad la superficie. En el caso del secado de emulsiones dobles W/O/W, la insulina que contiene la emulsión W/O nunca alcanza la T_s por estar dentro de los glóbulos de aceite.

Las dos preocupaciones principales en el secado por aspersion de las emulsiones dobles W/O/W coacervadas eran si las microcápsulas iban a mantener su microestructura intacta y la cantidad de insulina que iba a permanecer bioactiva después de secado por aspersion, lo cual se presente a continuación.

6.5.1 Integridad de las microcápsulas coacervadas después del secado

Con respecto a la integridad de las microcápsulas coacervadas después del secado por aspersion la Figura 34 muestra la microfotografía de una emulsión doble W/O/W rehidratada en buffer de fosfatos pH 7.0 En esta figura se aprecia claramente que la estructura de la emulsión doble W/O/W después del secado por aspersion se mantiene intacta.

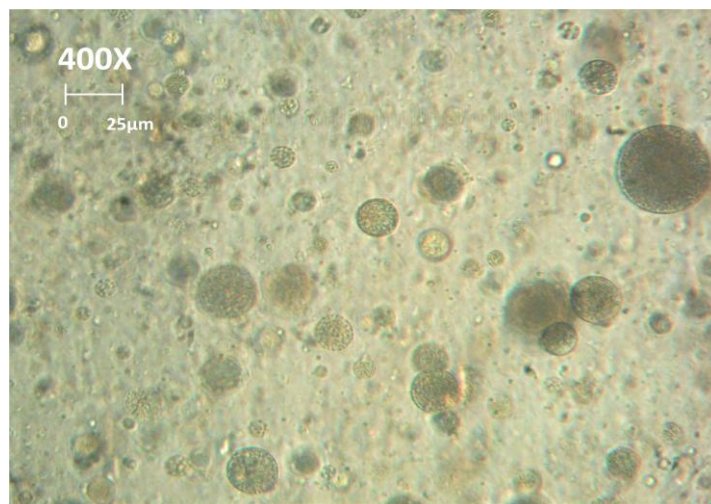


Figura 34 Morfología de la emulsión doble agua en aceite en agua coacervada después del secado por aspersion (180/70°C) y rehidratada en buffer de fosfatos pH 7.0. Sistema aislado de proteína de suero de leche/alginate de sodio. Material pared:emulsión agua en aceite 1:1

6.5.2 Morfología de los coacervados por microscopía electrónica de barrido

La Figura 35 muestra las microfotografías tomadas con microscopía electrónica de barrido (SEM) de la emulsión doble W/O/W coacervada después del secado por aspersión (180/70°C) del sistema WPI-CMC con una relación material pared:emulsión W/O 1:1. En general se observan partículas esféricas con una superficie de rugosidad variable. En la mayoría de las partículas se observan abolladuras y una superficie cóncava que es clásica en el encogimiento en las partículas secadas por aspersión (Gallardo et al., 2013). En la Figura 35 a, b y c se observa como estas microcápsulas tienden a aglomerarse formando cúmulos de mayor tamaño. Esta aglomeración puede atribuirse a la ausencia de cargas repulsivas en la superficie por el coacervado formado.

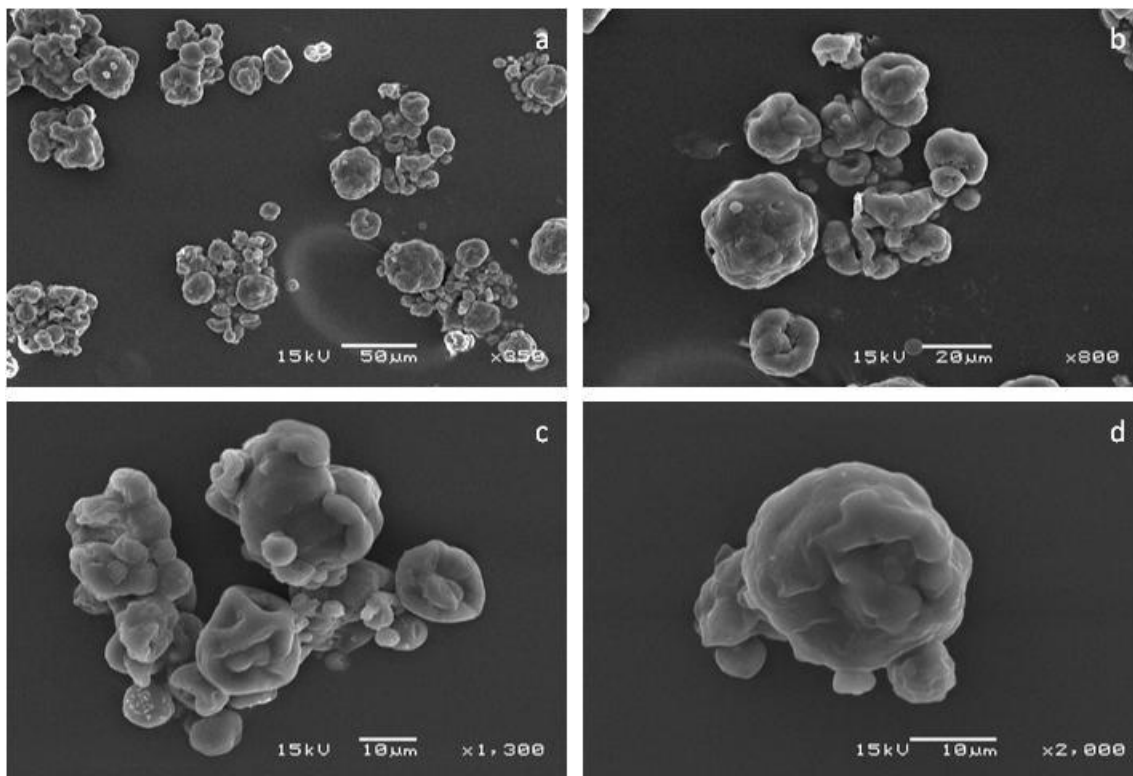


Figura 35 Microfotografía obtenida por microscopía electrónica de barrido de la emulsión doble agua en aceite en agua coacervada después del secado por aspersión (180/70°C) a diferentes aumentos (a:650X, b:800X, c:1,300X y d:2000X) Sistema aislado de proteína de suero de leche/carboximetilcelulosa. Material pared:emulsión agua en aceite 1:1

La Figura 36 muestra las microfotografías tomadas con microscopía electrónica de barrido (SEM) de la emulsión doble W/O/W coacervada después del secado por aspersion (180/70°C) del sistema WPI-SA con una relación material pared:emulsión W/O 1:1. Al igual que con la CMC, se observan partículas esféricas con una superficie de rugosidad variable y encogimiento de las mismas. En la Figura 36 a y b se observa claramente como estas microcápsulas tienden a agruparse por la ausencia de cargas en la superficie de las mismas formando cúmulos de mayor tamaño que las partículas individuales.

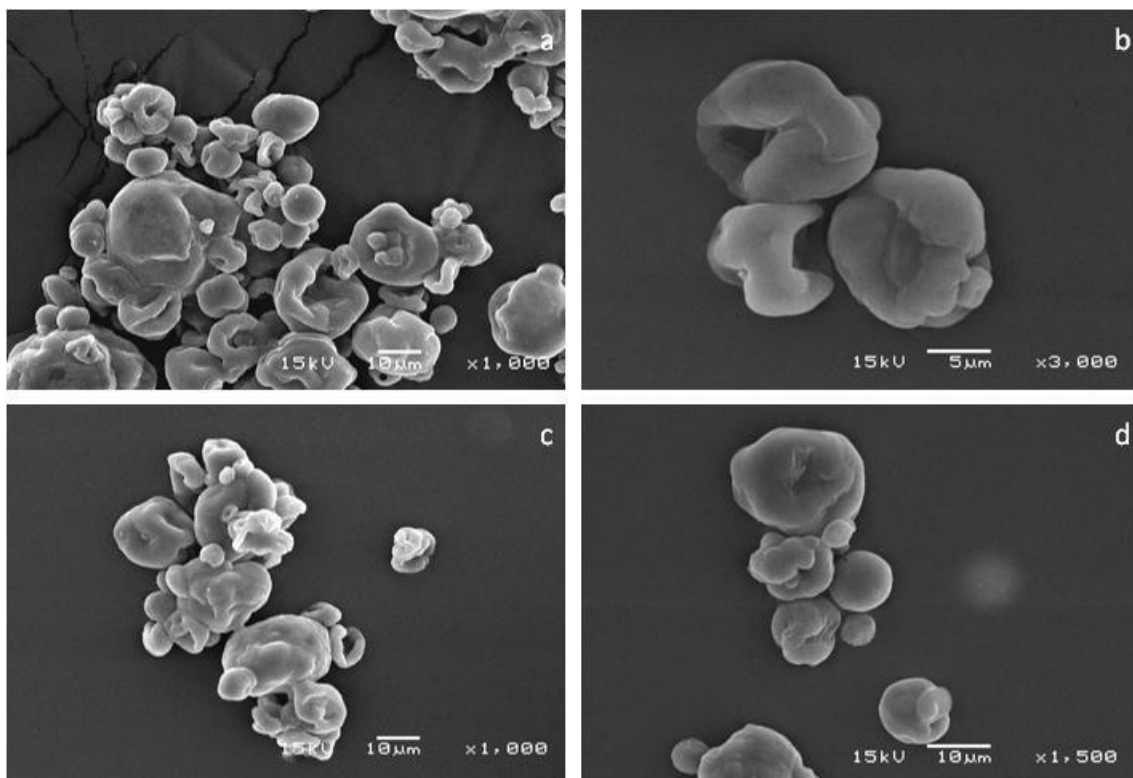


Figura 36 Microfotografía obtenida por microscopía electrónica de barrido de la emulsión doble agua en aceite en agua coacervada después del secado por aspersion (180/70°C) a diferentes aumentos (a)1000X, b)3000X, c)1000X y d)1500X Sistema aislado de proteína de suero de leche/alginato de sodio. Material pared:emulsión agua en aceite 1:1

Esta morfología ya ha sido reportada anteriormente por Wang et al. (2013) quienes utilizaron WPI y maltodextrina como material de pared en la microencapsulación por secado por aspersion de salsa de soya; por Bylaitė et al. (2001) quienes encapsularon aceite de comino en una matriz de proteínas suero de leche y maltodextrina y por Botrel

et al. (2014) quienes encapsularon aceite de pescado en una matriz de WPI y maltodextrina. Esta morfología se atribuye a la presencia del WPI asociada con un carbohidrato en la superficie de la microcápsula y a la velocidad de secado. De acuerdo con Ré (1998), las abolladuras pueden asociarse a un encogimiento ocasionado por un colapso de las gotas asperjadas durante las primeras etapas de secado. Finalmente en ambos casos se observa una población polidispersa de los tamaños de partícula.

6.5.3 Tamaño de partícula de la emulsión doble agua en aceite en agua coacervada después del secado por aspersión

La Figura 37 muestra la distribución del tamaño de partícula de la emulsión doble W/O/W coacervada, después del secado por aspersión para los sistemas WPI-CMC y WPI-SA. En la Figura 37 se puede observar que la distribución del tamaño de partícula es polidispersa para ambos sistemas debido a los cúmulos de partículas observadas en las Figura 36 y Para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-CMC se encontraron tres poblaciones principales (10, 22, y 40 μ m) aproximadamente mientras que para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-SA se encontró una distribución bimodal con picos en 10 y 28 μ m aproximadamente. No se encontró diferencia estadísticamente significativa en el diámetro de esfera equivalente ($D_{4,3}$), aunque el diámetro sauter medio ($D_{3,2}$) resultó ligeramente mayor para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-SA ($14.2\pm 0.11\mu$ m) con respecto a las preparadas con el sistema WPI-CMC ($13.2\pm 0.05\mu$ m).

Comparando las distribuciones de la Figura 37 con los de la Figura 22 a 15000rpm por 1min (emulsión doble W/O/W antes de coacervar) se observan partículas de mayor tamaño después del secado por aspersión. Esto puede explicarse debido a que las partículas tienden a aglomerarse por la ausencia de cargas repulsivas en la superficie de la misma. No existen reportes en la literatura del tamaño de partícula de emulsiones dobles (W/O/W) coacervadas y secadas por aspersión, por lo que no puede realizarse comparación alguna.

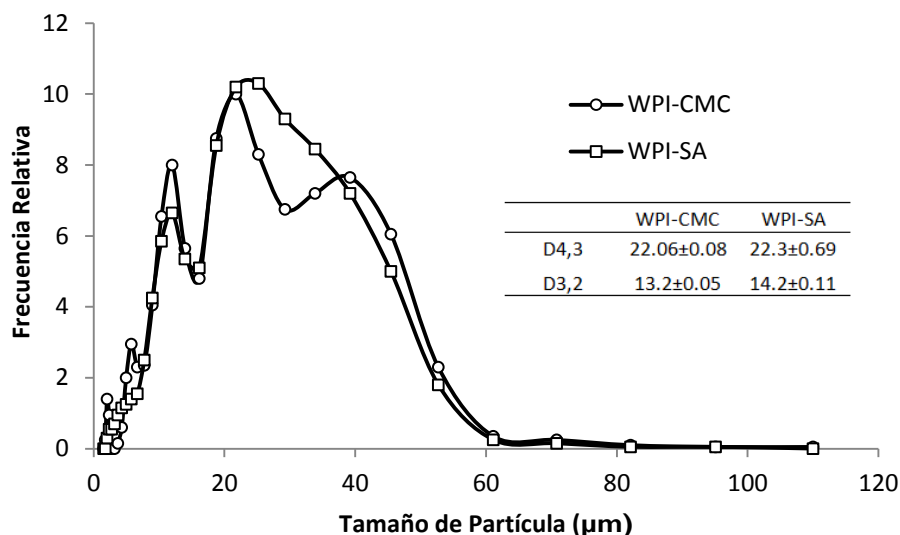


Figura 37 Distribución del tamaño de partícula de la emulsión doble agua en aceite en agua coacervada, después del secado por aspersión (180/70°C) Sistema aislado de proteína de suero de leche/arboimetilcelulosa y aislado de proteína de suero de leche/alginate de sodio. Material pared:emulsión agua en aceite 1:1

6.5.4 Extracción de la fase acuosa interna con acetonitrilo

Para evaluar BA_r de la insulina, fue necesario extraer la insulina de la Fi de la emulsión W/O para su cuantificación. Esto se hizo como se indicó en la sección 5.3.7.1. La Figura 38 muestra la curva de calibración de la insulina en acetonitrilo obtenida a 280nm en la región UV del espectro.

El Cuadro 16 muestra el cálculo de la concentración de insulina de muestras de concentración conocida extraídas con acetonitrilo para validar la técnica de extracción utilizada. Como puede apreciarse los valores obtenidos fueron muy cercanos al valor real conocido (92.1-93.1%). Por lo que puede afirmarse que el acetonitrilo fue capaz de romper la emulsión W/O y la insulina de la Fi se disolvió en el acetonitrilo.

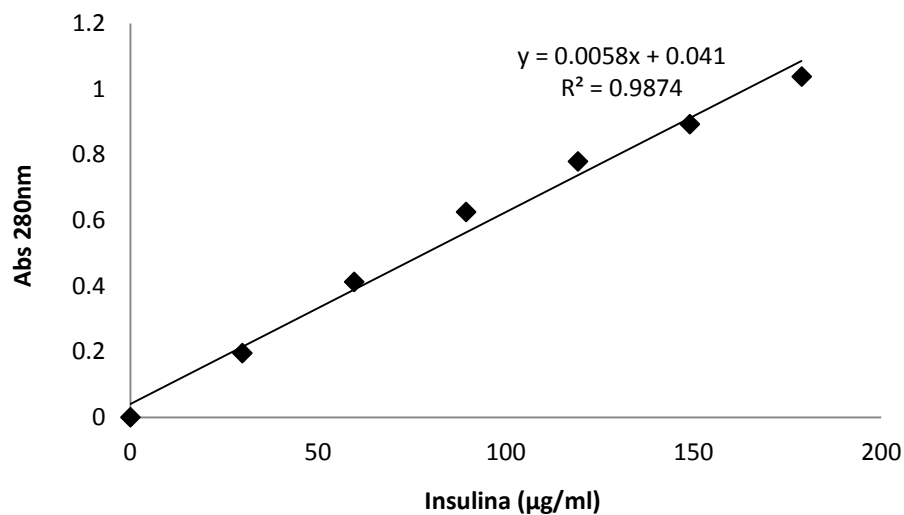


Figura 38 Curva de calibración insulina en acetoniitrilo a 280nm

Cuadro 16 Cálculo de concentración insulina en acetoniitrilo

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Abs 280 nm en Extracto de muestra sin insulina	0.336	0.327	0.328
Abs 280 nm en Extracto de muestra con insulina	0.695	0.688	0.690
Diferencia	0.359	0.361	0.361
Concentración calculada (µg/mL)	54.3	55.1	55.4
Concentración real (µg/mL)	59.5	59.5	59.5
%Recuperación (90-110%)	92.1	92.6	93.1

6.5.5 Bioactividad residual de la insulina después del secado

Para medir la bioactividad residual (BAR) en el polvo secado por aspersión, se utilizó un inmunoensayo por la técnica de ELISA diseñado para medir insulina humana en suero. Este método fue seleccionado ya que es altamente sensible y específico. No existe reacción cruzada con la proinsulina o péptido C cuyas estructuras son similares a la insulina, por lo tanto se puede evaluar la pérdida de la actividad biológica debido al rearreglo de la configuración tridimensional. La Figura 39 muestra la curva de calibración obtenida a 450nm con los estándares proporcionados por el fabricante del kit. En ella se aprecian los pozos con el color desarrollado y se observa que la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración con una $r^2=0.995$. Esta curva se muestra a manera de ejemplo ya que se repitió en cada ocasión que fue realizada la prueba para obtener resultados confiables. Se midió la concentración insulina en la Fi preparada como se mencionó en 5.3.3.5.1 siendo de $3.08\pm 0.14\text{mg/mL}$ y la concentración insulina en la Fi preparada como se mencionó en 5.3.3.5.2 siendo de $2.93\pm 0.18\text{mg/mL}$, lo que nuevamente demuestra la confiabilidad de la determinación.

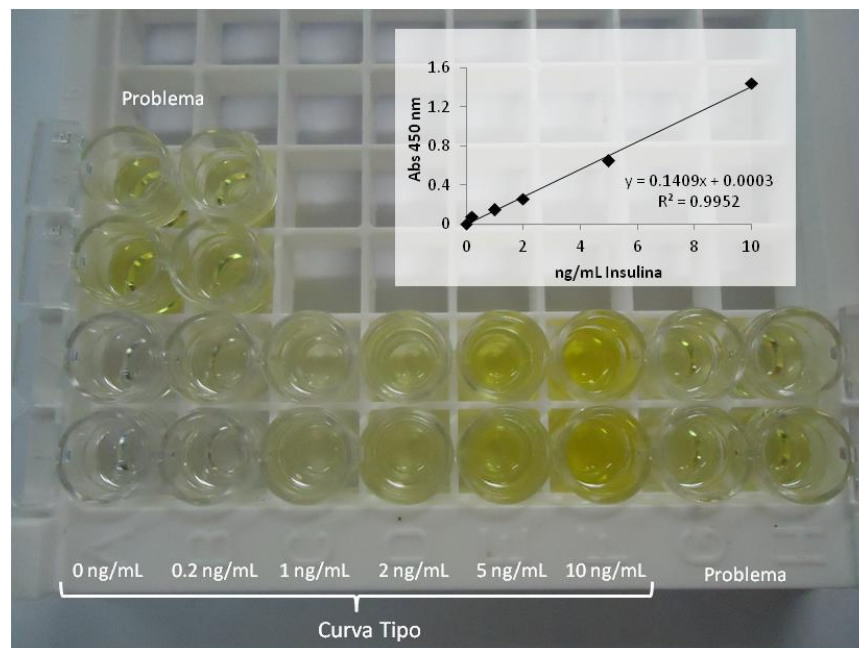


Figura 39 Curva de calibración insulina humana utilizando la técnica de ELISA

La Figura 40 muestra la BA_r de la insulina dentro de las microcápsulas coacervadas después del proceso de secado por aspersion para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-CMC a diferentes T_e y T_s del aire de secado. Se puede observar que la máxima BA_r se obtuvo cuando se utilizó una $T_e=180^\circ\text{C}$ y una $T_s=70^\circ\text{C}$ ($95.5\pm 1.27\%$ and $96\pm 0.96\%$ material pared:emulsión W/O proporción 2:1 and 1:1 respectivamente), aunque para la proporción material de pared:emulsión W/O 1:1 se obtuvo una BA_r comparable de $88.2\pm 2.19\%$ utilizando una $T_e=170^\circ\text{C}$ y una $T_s=70^\circ\text{C}$. La cantidad de insulina para estas condiciones resultó ser 11 y 12.9UI/gss para la proporción material de pared:emulsión W/O 1:1 y 5.5 y 8.5UI/gss para la proporción material de pared:emulsión W/O 2:1.

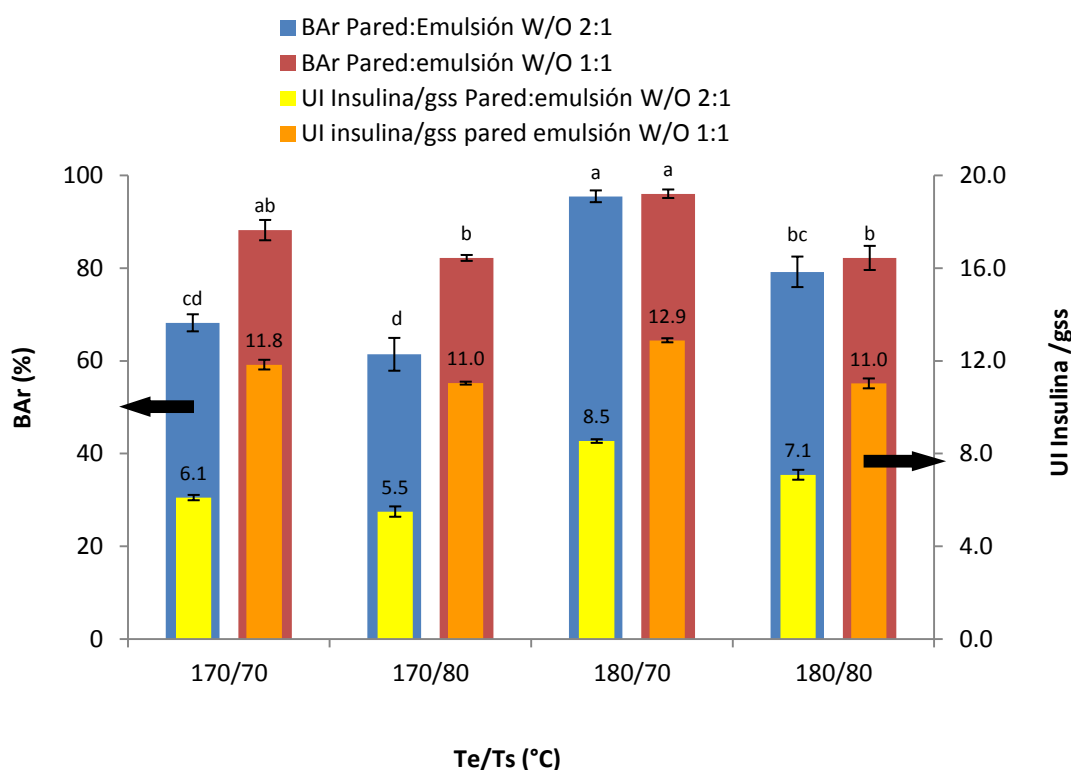


Figura 40 Bioactividad residual de insulina después del secado por aspersion de las microcápsulas coacervadas con el sistema aislado de proteína de suero de leche/carboximetilcelulosa a distintas T_e y T_s . Los valores medios con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$)

Con respecto a las microcápsulas preparadas con el sistema CMC-SA, la Figura 41 muestra la BA_r de la insulina después del proceso de secado por aspersión a diferentes T_e y T_s del aire de secado. En este caso la máxima BA_r se obtuvo también cuando se utilizó la misma combinación $T_e=180^\circ\text{C}$ y $T_s=70^\circ\text{C}$ ($89.0\pm 1.13\%$ y $83.3\pm 6.72\%$ material pared:emulsión W/O proporción 2:1 and 1:1 respectivamente) aunque para la proporción material de pared:emulsión W/O 1:1 con una $T_e=170^\circ\text{C}$ y $T_s=70^\circ\text{C}$ y material de pared:emulsión W/O 2:1 con una $T_e=180^\circ\text{C}$ y $T_s=80^\circ\text{C}$ se obtuvieron BA_r 's comparables de $84.1\pm 6.78\%$ y $84.7\pm 0.49\%$ respectivamente. La cantidad de insulina activa para estas condiciones resultó ser de 11.2 y 11.3 UI/gss para la proporción material de pared:emulsión W/O 1:1 y de 8.0 y 7.6 UI/gss para la proporción material de pared:emulsión W/O 2:1, valores estadísticamente significativos menores que los obtenidos con el sistema WPI-CMC.

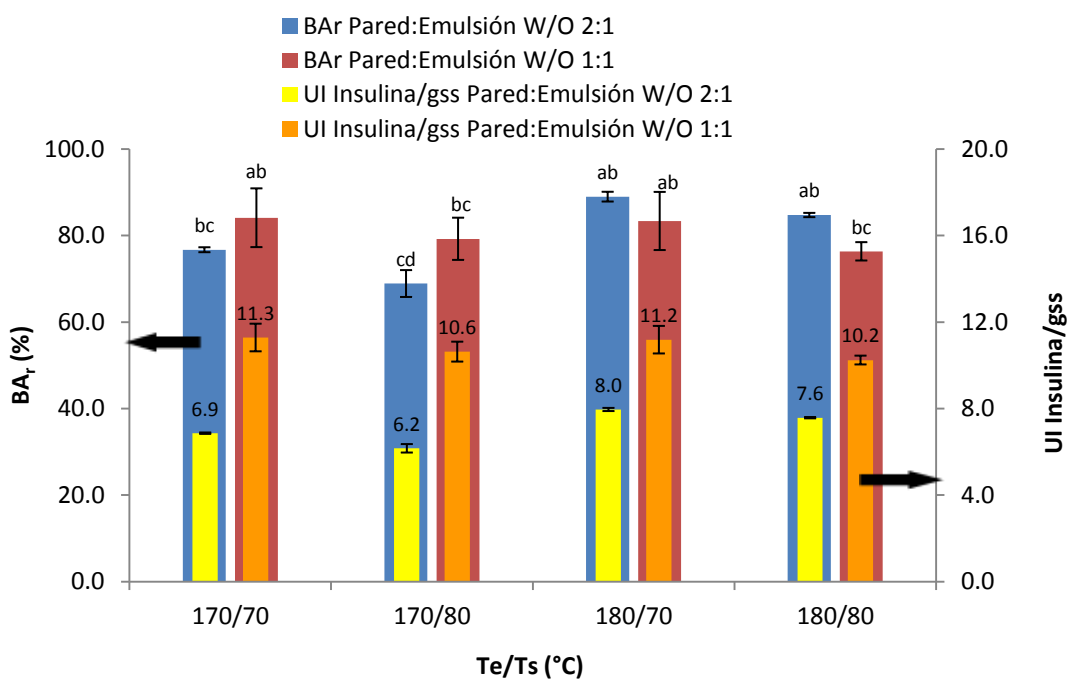


Figura 41 Bioactividad residual de insulina después del secado por aspersión de las microcápsulas coacervadas con el sistema aislado de proteína de suero de leche/alginato de sodio a distintas T_e y T_s . Los valores medios con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$)

De la Figura 40 y Figura 41 se puede observar que la BA_r disminuyó cuando aumentó la T_s , mientras que un aumento de la T_e produjo un aumento en la BA_r . También en ambas figuras puede observarse que cuanto la ΔT fue mayor ($T_e=180^\circ\text{C}$ y $T_s=70^\circ\text{C}$, $\Delta T=110^\circ\text{C}$) se obtuvo la mayor BA_r para ambos sistemas y en ambas proporciones material de pared:emulsión W/O. Este resultado sugiere que la BA_r está gobernada por la ΔT resultante de las T_e y T_s más que por las temperaturas individuales en el intervalo de temperaturas estudiado. Este hecho responde a que al tener una mayor ΔT en el sistema el tiempo de exposición a las temperaturas de secado es menor.

El secado por aspersion de insulina ya ha sido reportado previamente por Bowey et al. (2013) quien reportó un $88\pm 15\%$ de liberación de insulina bioactiva de micropartículas de alginato cargadas con insulina secadas por aspersion concluyendo que el secado por aspersion tuvo un mínimo impacto en la estructura de la insulina. Maltesen et al. (2008) no observaron ningún cambio en la integridad física o química de la insulina después del secado por aspersion a una $T_e=220^\circ\text{C}$ y a una $T_s=80^\circ\text{C}$. Por lo tanto los resultados encontrados en la presente investigación están de acuerdo a lo publicado por estos autores.

6.5.6 Características fisicoquímicas de las microcápsulas

El Cuadro 17 muestra el contenido de humedad del producto seco que resultó entre 3.73 y 5.35% para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-CMC y de entre 3.02 y 4.55% para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-SA. Estos valores están dentro de los valores esperados para polvos secados por aspersion y son favorables para mantener la estabilidad química, física y microbiológica del polvo deshidratado (Cortés-Rojas et al., 2014).

Con respecto a la solubilidad de las partículas secas, ya que la coacervación compleja ocurrió a valores de pH bajos, se esperaba que estas microcápsulas fueran prácticamente insolubles a pH 2.0 y se disolvieran gradualmente a pH 7.0. En el Cuadro 17, se observa que las microcápsulas preparadas en todas las condiciones son solubles a pH 7 (93,1% a 99,9%). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre los

valores de solubilidad a pH 7.0. Por otra parte, se observa también en el Cuadro 17 que la solubilidad a pH 2 fue diferente para la CMC con respecto al SA. Las microcápsulas preparadas con CMC mostraron una solubilidad parcial (25.5 a 33.6%), sin diferencia estadísticamente significativa entre los valores; mientras que las microcápsulas preparadas con SA mostraron menor solubilidad en el intervalo de 2.4 a 9.2%, sin diferencia estadísticamente significativa entre los valores. Esta diferencia en la solubilidad podría ser debido a la diferencia en la composición química de los polímeros. La CMC es un polímero de unidades de glucosa sustituida por grupos carboximetilo en algunos grupos hidroxilo de las unidades de glucosa; mientras que el SA es un polímero de residuos de manuronato y glucuronato (Figura 42). Así que podrían interactuar de manera diferente con el WPI durante la formación de complejos de este modo la solubilidad a pH 2.0 resultó ser diferente.

Cuadro 17 Contenido de humedad y solubilidad a pH 7.0, 2.0 y 2.5 del producto secado por aspersión

	Material de pared/emulsión W/O	T _e (°C)	T _s (°C)	Humedad (%)	Solubilidad pH 7.0 (%)	Solubilidad pH 2.0 (%)	Solubilidad pH 2.5 (%)
CMC	2:1	170	70	5.35±0.06 ^a	97.4±0.49 ^{ab}	33.6±0.91 ^a	3.05±1.06 ^{ab}
			80	3.99±0.19 ^{bcd}	99.9±0.07 ^a	27.9±3.88 ^a	5.05±0.49 ^{ab}
		180	70	4.13±0.32 ^{bc}	96.2±2.19 ^{ab}	26.6±1.90 ^a	2.5±1.13 ^{ab}
			80	3.73±0.16 ^{bd}	94.7±0.35 ^{ab}	27.3±2.75 ^a	4.15±0.07 ^a
	1:1	170	70	3.75±0.21 ^{bcd}	95.8±3.25 ^{ab}	29.8±2.82 ^a	1.95±0.35 ^{ab}
			80	4.00±0.09 ^{bcd}	95.7±0.14 ^{ab}	29.3±0.07 ^a	1.9±0.42 ^{ab}
		180	70	4.09±0.14 ^{bc}	96.4±1.20 ^{ab}	26.8±1.9 ^a	2.55±2.05 ^{ab}
			80	3.87±0.46 ^{bcd}	96.6±2.12 ^{ab}	25.5±0.56 ^a	0.30±0.84 ^b
SA	2:1	170	70	4.46±0.70 ^{ab}	93.1±0.85 ^b	3.50±1.98 ^b	0.95±1.80 ^{ab}
			80	4.55±0.11 ^{ab}	94.4±0.21 ^{ab}	4.90±1.55 ^b	0.75±1.62 ^{ab}
		180	70	3.93±0.01 ^{bcd}	94.8±0.14 ^{ab}	5.70±0.35 ^b	2.25±0.35 ^{ab}
			80	4.45±0.10 ^{ab}	94.5±0.99 ^{ab}	9.20±1.62 ^b	0.20±1.41 ^b
	1:1	170	70	3.36±0.01 ^{cd}	94.8±1.27 ^{ab}	2.40±0.28 ^b	1.75±1.34 ^{ab}
			80	3.82±0.27 ^{bd}	95.0±1.98 ^{ab}	4.90±4.38 ^b	1.95±0.63 ^{ab}
		180	70	3.78±0.11 ^{bcd}	93.7±1.34 ^{ab}	5.40±1.55 ^b	-0.15±0.354 ^b
			80	3.02±0.09 ^d	95.2±3.18 ^{ab}	4.40±0.91 ^b	1.40±2.26 ^{ab}

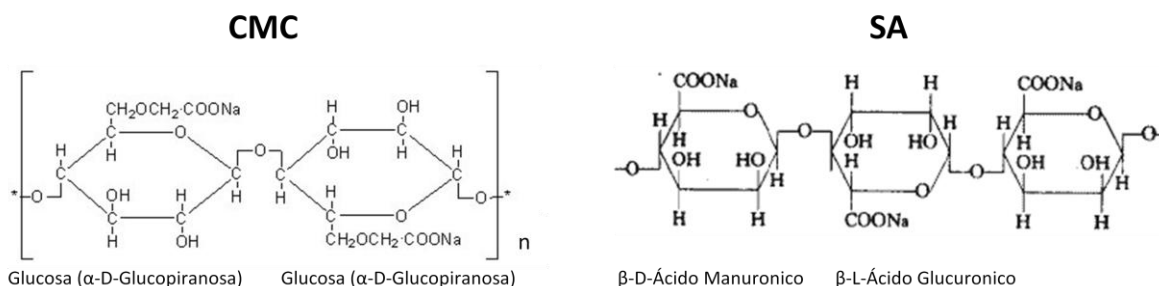


Figura 42 Estructura molecular de la carboximetilcelulosa y del alginato de sodio

También en el Cuadro 17 se muestra la solubilidad de las microcápsulas a pH 2.5 (pH de coacervación). De acuerdo a los valores obtenidos 0.30 a 5.5% para CMC y 0.0 a 2.25% para SA, las microcápsulas preparadas con ambos polisacáridos son insolubles a pH 2.5. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores.

Estos resultados confirman que las microcápsulas preparadas son insolubles o moderadamente solubles dependiendo del sistema a valores de pH del estómago y completamente solubles a valores de pH del intestino por lo que pueden emplearse con la finalidad de administrar péptidos terapéuticos por la vía oral.

6.6 Evaluación del efecto protector *in vitro* de la microcápsulas sobre la insulina a valores de pH gastrointestinal

Se evaluó el efecto protector de la microcápsulas desarrolladas como se describió en la sección 5.3.9. En la Figura 43 se observa el efecto protector de la microcápsula desarrollada tanto con el sistema WPI-CMC como con el WPI-SA. En estos resultados se observa que aunque para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-CMC presentaron una mejor BAr (96%) después de la etapa crítica de secado (Figura 40), la protección de la insulina resultó de apenas $77.04 \pm 4.14\%$ con respecto a la cantidad de insulina bioactiva después de la etapa de secado, mientras que para las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-SA que presentaron una BAr ligeramente menor (83.3%) después del secado (Figura 41), la protección de la insulina resultó de

96.4±8.7% con respecto a la cantidad de insulina bioactiva después de la etapa de secado. Estas diferencias en la protección de insulina a valores de pH gastrointestinal podrían atribuirse a la diferencia en solubilidades encontradas entre las microcápsulas preparadas con los distintos polímeros al pH del estómago. También puede observarse en la Figura 44 que la insulina sin microencapsular no resistió los cambios bruscos de pH por lo que perdió casi por completo su actividad muy probablemente debido a la desnaturalización de la misma por la exposición a valores extremos de pH en el estómago.

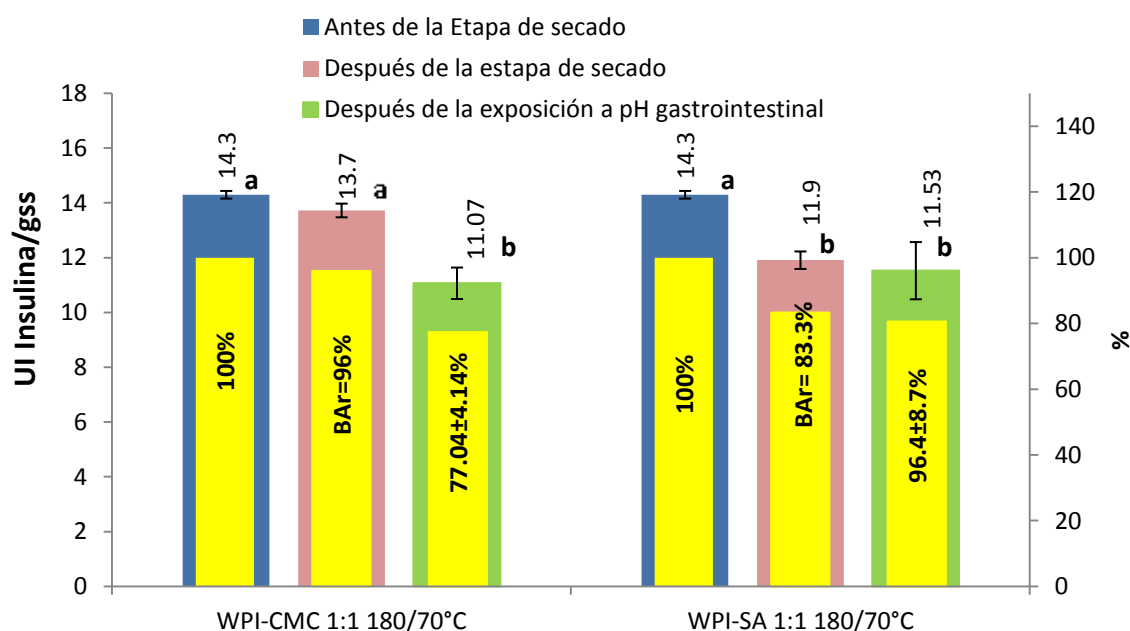


Figura 43 Efecto protector del sistema desarrollado hacia la insulina a valores de pH gastrointestinal. Los valores medios con letras distintas difieren significativamente ($p < 0.05$).

Debe recordarse que las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-CMC presentaron una solubilidad significativamente mayor a pH=2.0 que las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-SA. Este hecho podría contribuir a una mayor exposición de la emulsión W/O a un medio ácido causando una desestabilización de la emulsión W/O y la subsecuente exposición de la insulina a un pH ácido a diferencia de

las microcápsulas preparadas con el sistema WPI-SA, que al parecer al tener una menor solubilidad a pH 2.0 mejora la protección de la misma.

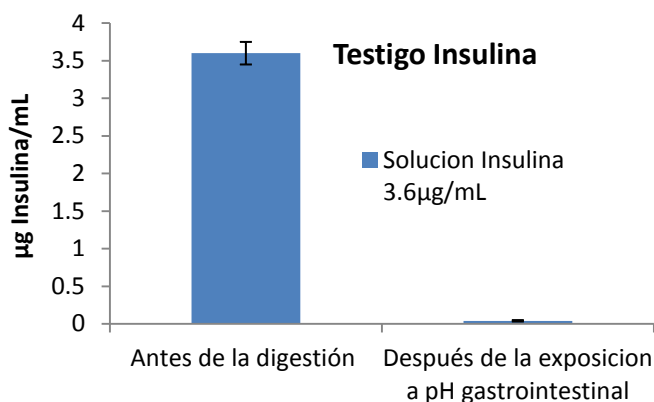


Figura 44 Testigo de insulina sin microencapsular sometido a valores de pH intestinal

Los cuadros 1 y 2 describen las técnicas de microencapsulación de insulina reportadas recientemente en la literatura. Del cuadro 1 se observa que con la emulsión doble W/O/W de Morishita et al. (1998), con el sistema de administración auto-emulsionante desarrollado por Ma et al. (2006a) y el de nanopartículas de lípidos sólidos reportado por Zhang et al. (2012b), se obtienen valores de biodisponibilidad oral de 12%, 15% y 13.8% respectivamente. Desafortunadamente no se logró obtener valores de biodisponibilidad con el sistema desarrollado en este trabajo para hacer la comparación pertinente. El enfoque desarrollado en este trabajo presenta eficiencias de encapsulación un poco inferiores con respecto a las reportadas por Ma et al. (2006a) (99% vs 88%). Una de las limitantes de los sistemas reportados por Morishita et al. (1998) y Ma et al. (2006a) es su forma farmacéutica en emulsión, lo que implica la estabilidad de la misma durante su vida de anaquel. Con el sistema desarrollado no existe este problema ya que la forma farmacéutica es en polvo. Ahora con respecto a las nanopartículas de lípidos sólidos reportadas por Zhang et al. (2012b), éstas presentan una eficiencia de encapsulación inferior (76%) con respecto a las desarrolladas en el presente trabajo (88%), además de requerir el uso de un disolvente orgánico como la acetona para formular las nanopartículas y la liofilización para la etapa de secado.

Con respecto al cuadro 2, las técnicas reportadas por Chalasani et al. (2007a), Mathiowitz et al. (2008), Woitiski et al. (2010), Zhang et al. (2012a) y Jain et al. (2012) han mostrado los valores más altos de biodisponibilidad oral reportados hasta el momento (29.4%, 23%, 13.12%, 10.5% y 20.4%, respectivamente). Sin embargo, el enfoque reportado por Chalasani et al. (2007a) implica tres reacciones químicas, un secado por aspersion, la carga de insulina en las microcápsulas y una liofilización elevando enormemente los costes de producción con apenas 70% de eficiencia de encapsulación. El enfoque reportado por Woitiski et al. (2010), un sistema multicapa combinando la gelificación ionotrópica interna con la coacervación compleja sin el uso de disolventes orgánicos es lo más parecido al sistema desarrollado en el presente trabajo aunque las microcápsulas no fueron deshidratadas, solo concentradas. La eficiencia de encapsulación no fue reportada. Las microcápsulas preparadas por Mathiowitz et al. (2008) por una técnica de inversión de fases presentan la desventaja de utilizar cloruro de metileno y éter de petróleo que tienen que ser eliminados antes de su administración a seres vivos aunque la eficiencia de encapsulación reportada fuera del 100%. La técnica por evaporación de disolvente reportada por Zhang et al. (2012a) requiere el uso de etilacetato y las microcápsulas no son deshidratadas, además de tener una eficiencia de encapsulación bastante baja de alrededor del 52% solamente. Y finalmente el enfoque desarrollado por Jain et al. (2012) también requiere disolventes orgánicos además de reacciones químicas y liofilización por lo que su producción a escala comercial se hace cuestionable. Resumiendo, las microcápsulas desarrolladas en este trabajo comparándolas con otras técnicas reportadas en la literatura presentan las siguientes ventajas: no se requiere el uso de disolventes orgánicos, presentan una alta eficiencia de encapsulación y se usa el secado por aspersion para la presentación final que es económicamente más viable que la liofilización para su producción a gran escala, aunque hace falta la valoración biológica en modelos biológicos para corroborar su funcionalidad.

6.7 Consideraciones alérgicas

Uno de los excipientes utilizados es el aislado de proteína de suero de leche por lo que se deben tener algunas consideraciones alérgicas. La alergia a la leche de vaca es una anomalía clínica en la respuesta inmune a las proteínas de leche de vaca, lo que conduce a la respuesta inmune inmediata regulada por la inmunoglobulina E. Después del nacimiento de un bebé, además de la leche materna, la leche de vaca es la fuente más común de los alimentos. Por lo tanto, la alergia a la leche de vaca es común en bebés y niños pequeños, alrededor del 90% de los niños que sufren de síntomas de alergia a la leche de vaca mejora antes de la edad de 4 años (El-Agamy 2007). Las principales fuentes de proteínas de la leche de vaca son la caseína y el suero de la leche. La caseína incluye a la α , β y κ -caseína; las proteínas de suero incluyen a la α -lactalbúmina, β -lactoglobulina, la albúmina y las inmunoglobulinas. Las β -lactoglobulinas son los principales alérgenos del WPI (El-Agamy 2007). Por tal motivo, la formulación de las microcápsulas preparadas en el presente trabajo, se deberá limitar su uso a pacientes adultos que no reporten alergia a las proteínas del suero de leche de vaca.

6.8 Perspectivas a futuro

Se logró microencapsular insulina por la técnica combinada emulsión doble W/O/W-coacervación compleja con el posterior secado por aspersion de las mismas. La eficiencia de encapsulación fue alta y la actividad biológica residual resultó ser también alta. Se demostró que las microcápsulas son insolubles a pH del estómago y se disgregan completamente a valores de pH del intestino. Se demostró que por lo menos a valores de pH gastrointestinal a 37°C las microcápsulas protegen a la insulina por lo que esta llega activa al intestino, sin embargo quedan varias perspectivas que podrían abordarse en trabajos posteriores como el uso de otra proteína en vez del aislado de proteína de suero de leche, evaluación de la estructura tridimensional de la insulina después de la etapa de secado, una valoración biológica en un modelo de ratas diabéticas entre otras. Se dejan esas cuestiones para trabajos posteriores.

Conclusiones

7. CONCLUSIONES

- Con la incorporación de polirricinoleato de poliglicerilo 8%p/p en la fase oleosa fue posible obtener emulsiones agua en aceite con un tamaño de glóbulo de alrededor de $665\pm 06\text{nm}$ para la proporción fase acuosa interna:fase oleosa 1:4, $721\pm 25\text{nm}$ para la proporción fase acuosa interna:fase oleosa 1:3 y $774\pm 37\text{nm}$ para la proporción fase acuosa interna:fase oleosa 1:2 estables hasta por 5 meses.
- Fue posible la obtención de emulsiones dobles agua aceite en agua utilizando aislado de proteína de suero de leche como surfactante hidrofílico en la fase acuosa externa con altas eficiencias de encapsulación utilizando una homogenización con alta tasa de corte en la segunda etapa de preparación a 15000rpm por 1min obteniendo glóbulos en la emulsión doble agua aceite en agua cargadas con pequeños glóbulos de la emulsión agua en aceite.
- El punto de máxima atracción electrostática entre la carboximetilcelulosa y el alginato de sodio con el aislado de proteína de suero de leche resultaron en valores de pH ácido por lo que pueden emplearse en la encapsulación de fármacos de naturaleza proteica para protección en el estómago y liberación en el intestino.
- La estructura de la emulsión doble se conservó después del proceso de secado por aspersión en los dos sistemas seleccionados.
- La bioactividad residual resultó estar gobernada por la ΔT resultante entre la T_e y T_s , obteniéndose una mayor actividad residual a una $\Delta T=110^\circ\text{C}$ ($T_e=180^\circ\text{C}$ y $T_s=70^\circ\text{C}$) para ambos sistemas estudiados.

- Las microcápsulas preparadas fueron solubles a pH 7.0 y parcialmente insolubles a pH 2.0 siendo las microcápsulas preparadas con el sistema aislado de proteína desuero de leche/alginate de sodio más insoluble a pH 2.0 que aquellas preparadas con el sistema aislado de proteína desuero de leche/carboximetilcelulosa.
- La bioactividad residual resultó ser del 96% y 83.3% con respecto a la cantidad de insulina realmente encapsulada después del proceso de secado para las temperaturas $T_e=180^{\circ}\text{C}$ y $T_s=70^{\circ}\text{C}$ para las microcápsulas preparadas con los sistemas WPI-CMC y WPI-SA respectivamente demostrando que la estructura de la insulina se mantiene intacta después del proceso de secado.
- Finalmente a valores de pH gastrointestinal la insulina se mantiene activa y junto con los datos de solubilidad y bioactividad residual (96%) después de la etapa de secado la técnica de microencapsulación de insulina utilizada en este trabajo tiene un gran potencial para la administración oral de insulina e incluso algunos otros péptidos terapéuticos aunque hace falta una valoración biológica del sistema para conocer su eficacia real en un sistema biológico.

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA

Adams MJ, Blundell T, Dodson E, Dodson G, Vijayan M, Baker E, Harding M, Rimmer B Sheat S. Structure of rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature*, 1969; 224: 491-95.

Agarwal V, Khan MA. Current status of the oral delivery of insulin. *Pharm Tech*, 2001; 76-90.

Ameri M, Maa Y. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Drying Tech*, 2006; 24: 763-68.

Artusson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 175 (3): 880-85.

Aserin A. Multiple emulsions: Technology and applications. Wiley-Interscience, 2008.

Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletchert AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. *Can Med Assoc J*, 1991; 145 (10):1281-86.

Baracat MM, Nakagawa AM, Freitas LA, De Freitas O. Microcapsule processing in spouted bed. *Can J Chem Eng*, 2004; 82: 134-41.

Bastida-Rodriguez, J. The food additive polyglycerol polyricinoleate (E-476): structure, applications and production methods. *Chem Eng*, 2013; 2013:1-21.

- Bendayan M, Ziv E, Gingras D, Sasson RB, Bar-On H, Kidron M. Biochemical and cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia*, 1994; 37:119–26.
- Bendayan M, Ziv E, Sasson RB, Bar-On H, Kidron M. Morpho-cytochemical and biochemical evidence for insulin absorption by the rat ileal epithelium. *Diabetologia*, 1990; 33:197–204.
- Benichou A, Aserin A y Garti N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI–polysaccharide complexes. *Colloid Surf A*, 2007; 294: 20–32.
- Benichou A, Aserin A, Garti N. Polyols, high pressure and refractive indices equalization for improved stability of W/O emulsions for food applications. *J Disp Sci Tech*, 2001; 22: 269-80.
- Bonnet M, Cansell M, Berkaoui A, Ropers MH, Anton M, Leal-Calderon F. Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions. *Food Hydrocol*, 2009; 23: 92-101.
- Botrel DA, Borges SV, Fernandes RVB, Yoshida MI. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. *Food Res Int*, 2014; 62: 344-52.
- Bowey K, Swift BE, Flynn LE, Neufeld RJ. Characterization of biologically active insulin loaded alginate microparticles prepared by spray drying. *Drug Dev Ind Pharm*, 2013; 39 (3): 457-69.

- Brang J, Langkjar L. Insulin structure and stability. Stability and characterization of protein and peptide drugs: Case Histories, edited by Y. John Wang and Rodney Pearlman. Plenum Press, New York, 1993; 5:315-50.
- Bylaitė E, Venskutonis PR, Mapdbierienė R. Properties of caraway (*Carum carvi* L.) essential oil encapsulated into milk protein-based matrices. Eur Food Res Technol, 2001; 212:661–70.
- Cárdenas-Bailon F, Osorio-Revilla G, Gallardo-Velazquez, T. Microencapsulation techniques to develop formulations of insulin for oral delivery: a review. J Microencapsul, 2013; 30 (5): 409-24.
- Chalasani KB, Russell JGJ, Jain AK, Diwan PV, Jain SK. Effective oral delivery of insulin in animal models using vitamin B12-coated dextran nanoparticles. J Control Release, 2007b; 122:141–50.
- Chalasani KB, Russell JGJ, Yandrapu SK, Diwan PV, Jain SK. A novel vitamin B12-nanosphere conjugate carrier system for peroral delivery of insulin. J Control Release, 2007a; 117:421–9.
- Chang SG, Choi KD, Jang SH, Shin HC. Role of disulfide bonds in the structure and activity of human insulin. Mol Cells, 2003; 16(3):323–30.
- Constantinides PP, Scalart JP, Lancaster C, Marcello J, Marks G, Ellens H, Smith PL. Formulation and intestinal absorption enhancement evaluation of water in oil microemulsions incorporating medium chain glycerides. Pharm Res, 1994; 11:1385–90.

Cortés-Rojas DF, Souza CRF, Oliveira W. Optimization of spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. spray drying conditions for production of *Bidens pilosa* L. dried extract. Chem Eng Res Des, 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2014.06.010>

Cournarie F, Rosilio V, Chero´n M, Vauthier C, Lacour V, Grossiord JL, Seiller M. Improved formulation of W/O/W/multiple emulsion for insulin encapsulation. Influence of the chemical structure of insulin. Colloid Polym Sci, 2004a; 282:562–8.

Cournarie F, Savelli MP, Rosilio V, Bretez F, Vauthier C, Grossiord JL, Seiller M. Insulin-loaded W/O/W multiple emulsions: Comparison of the performances of systems prepared with medium-chain triglycerides and fish oil. Eur J Pharm Biopharm, 2004b; 58:477–82.

Cui F, Shi K, Zhang L, Tao A, Kawashima Y. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin–phospholipid complex for oral delivery: Preparation, *in vitro* characterization and *in vivo* evaluation. J Control Release, 2006; 114:242–50.

Cunha AS, Cheron M, Grossiord JL, Puisieux F, Seiller M. W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: Biological activity after oral administration to normal and diabetic rats. Int J Pharm, 1998; 169:33–44.

Cunha AS, Grossiord JL, Puisieux F, Seiller M. Insulin in w/o/w multiple emulsions: Preparation characterization and determination of stability towards proteases *in vitro*. J Microencapsul, 1997a; 14(39):311–19.

- Cunha AS, Grossiord JL, Puisieux F, Seiller M. W/O/W multiple emulsions of insulin containing a protease inhibitor and an absorption enhancer: Preparation, characterization and determination of stability towards proteases *in vitro*. *Int J Pharm*, 1997b; 158:79–89.
- Dai Y, Tang JG. Characteristic, activity and conformational studies of [A6- Ser, A11-Ser]-insulin. *Biochem Biophys Acta*, 1996; 1296(1):63–8.
- Dekel Y, Glucksam Y, Margalit R. Novel fibrillar insulin formulations for oral administration: Formulation and *in vivo* studies in diabetic mice. *J Control Release*, 2010; 143:128–35.
- Deveci SS, Basal G. Preparation of PCM microcapsules by complex coacervation of silk fibroin and chitosan. *Colloid Polym Sci*, 2009; 287:1455–67.
- Dong Z, Ma Y, Hayat K, Jia C, Xia S, Zhang X. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. *J Food Eng*, 2011; 104(3): 455-60.
- Eastman JE, Moore CO. Cold-water-soluble granular starch for gelled food compositions. 1894 U.S. Patent 4,465,702.
- El-Agamy EI. The challenge of cow milk protein allergy. *Small Rumin Res*, 2007; 68:64–72.
- El-Sayed A, Remawi MA, Qinna N, Farouk A, Badwan A. Formulation and characterization of an oily-based system for oral delivery of insulin. *Eur J Pharm Biopharm*, 2009; 73:269–79.

- Forbes RT, Davis KG, Hindle M, Clarke JG, Maas J. Water vapor sorption studies on the physical stability of a series of spray-dried protein/sugar powders for inhalation. *J Pharm Sci*, 1998; 87:1316-21.
- Foss AC, Goto T, Morishita M, Peppas NA. Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004; 57:163–9.
- Gallardo G, Guida L, Martinez V, López MC, Bernhardt D, Blasco R, Pedroza-Islas Hermida LG. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Res Intern*, 2013; 52: 473–82.
- Gouin S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Tech*, 2004; 15:330-47.
- Graf A, Rades T, Hook SM. Oral insulin delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types: Optimisation and *in vivo* evaluation. *Eur J Pharm Sci*, 2009; 37:53–61.
- Gualandi-Signori AM, Giorgi G. Insulin formulations-a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2001; 5:73-83.
- Gunasekaran S, Ko S, Xiao L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *J Food Eng*, 2007; 83: 31-40.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. 2012. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

- Hansen JF. The self-association of zinc-free human insulin and insulin analogue BI3-glutamine. *Biophys Chem*,1991; 39:107-110.
- Harfenist EJ, Craig LC. 1952. The molecular weight of insulin. *J Am Chem Soc*; 74:3087–9.
- Hildebrandt P. Subcutaneous absorption of insulin in insulin-dependent diabetic patients. Influence of species, physico-chemical properties of insulin and physiological factors. *Dan Med Bull* 1991; 38: 337-46.
- Hoffman A, Ziv E. Pharmacokinetic considerations of new insulin formulations and routes of administration. *Clin Pharmacokinet*,1997; 33:285–301.
- Howey DC, Browsher RR, Brunelle RL, Woodworth JR. [Lys(B28), Pro(B29)] human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin. *Diabetes*, 1994; 43: 396-401.
- IDF, 2013. Atlas de Diabetes. 6a Edición. International Diabetes Federation.
- Iqbal S, Baloch MK, Hameed G, McClements DJ. Controlling W/O/W multiple emulsions microstructure by osmotic swelling and internal protein gelation. *Food Res Int*, 2013; 54 (2): 1613-20.
- Jain D, Panda AK, Majumdar DK. Eudragit S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*, 2005; 6(1): E100-07.

- Jain S, Rathi VV, Jain AK, Das M, Godugu C. Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally designed vehicle for the oral delivery of insulin. *Nanomedicine*, 2012; 7(9):1–27.
- Jehle PM, Micheler C, Jehle DR, Breitig D, Boehm BO. Inadequate suspension of neutral protamina Hagedorn (NPH) insulin in pens. *Lancet* 1999; 354: 1604-07.
- Jelvehgari M, Milani PZ, Shadbad MRS, Loveymi BD, Nokhodchi A, Azari Z, Valizadeh H. Development of pH-sensitive insulin nanoparticles using Eudragit L100-55 and chitosan with different molecular weights. *AAPS PharmSciTech*, 2010; 11(3):1237–42.
- Jiménez-Alvarado R, Beristain CI, Medina-Torres L, Román-Guerrero A, Vernon-Carter EJ. Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein–polysaccharide complexes. *Food Hydrocoll*, 2009; 23: 2425–33.
- Jun-xia, X, Hai-yan Y, Jian Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chem*, 2011; 125:1267-72.
- Karasulu HY, Karasulu E, Buyükhelvacigil M, Yildiz M, Ertugrul A, Buyükhelvacigil K, Ustün Z, Gazel N. Soybean oil: Production process, benefits and uses in pharmaceutical dosage forms. *Soayben and Health*, 2011; 13 Ed El-Shemy: 283-310.
- Kavimandan NJ, Peppas NA. Confocal microscopic analysis of transport mechanisms of insulin across the cell monolayer. *Int J Pharm*, 2008; 354(1–2):143–8.

- Kennedy FP. Recent developments in insulin delivery techniques: Current status and future potential. *Drugs*, 1991; 42:213–27.
- Khan AY, Talegaonkar S, Iqbal Z, Ahmed FJ, Khar RK. Multiple emulsions: an overview. *Current Drug Delivery*, 2006; 3: 429-43.
- Kinesh VP, Neelam DP, Punit BP, Bhavesh SB, Pragna KS. Novel approaches for oral delivery of insulin and current status of oral insulin products. *Int J Pharm Sci Nanotech*, 2010; 3(3):1057–64.
- Klein M, Aserin A, Ishai PB, Garti N. Interactions between whey protein isolate and gum Arabic *Colloids Surf B*, 2010; 79: 377–83.
- Krauland AH, Guggi D, Schnürch AB. Oral insulin delivery: The potential of thiolated chitosan-insulin tablets on non-diabetics rats. *J Control Release*, 2004;95:547–55.
- Kruif CG, Weinbreck F, Vries R. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 2004; 9: 340–49.
- Lamprecht A, Ubrich N, Maincent P. Oral low molecular weight heparin delivery by microparticles from complex coacervation. *Eur J Pharm & Biopharm*, 2007; 67(3): 632-38.
- Lin YH, Mi FL, Chen CT, Chang WC, Peng SF, Liang HF, Sun HW. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules*, 2007; 8:146–52.

- Liu R, Huang SS, Wan YH, Ma GH, Su ZG. Preparation of insulin-loaded PLA/PLGA microcapsules by a novel membrane emulsification method and its release *in vitro*. *Colloids Surf B-Biointerfaces*, 2006; 51:30–8.
- Lopes MA, Abraham BA, Cabral LM, Rodrigues CR, Seica RMF, Veiga FGB, Ribeiro AJ. Intestinal absorption of insulin nanoparticles: Contribution of M cells. *Nanomedicine: NBM*, 2014; 10 (6): 1139-51.
- Lowman AM, Morishita M, Kajita M, Nagai T, Peppas NA. Oral delivery of Insulin using pH-responsive complexation gels. *J Pharm Sci*, 1999; 88(9):933–7.
- Ma EL, Ma H, Liu Z, Zheng C, Duan M. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a novel oral insulin formulation. *Acta Pharmacol Sin*, 2006a; 27(10):1382–8.
- Ma H, Shieh KJ, Lee SL. Study of ELISA technique. *Nat Sc*, 2006b; 4(2): 36-37.
- Mahmoud A, Yuh-Fun M. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. *Drying Techn*, 2006; 24: 763-68.
- Makhlof A, Tozuka Y, Takeuchi H. Design and evaluation of novel pH sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. *Eur J Pharm Sci*, 2011; 42:445–51.
- Maltesen MJ, Bjerregaard S, Hovgaard L, Havelund S, Van de Weert M. Quality by design – Spray drying of insulin intended for inhalation. *Eur J Pharm & Biopharm*, 2008; 70:828-38.
- Marrero DG. Overcoming patient barriers to initiating insulin therapy in type 2 diabetes mellitus. *Clin Cornerstone*, 2007; 8(2):33–43.

- Marschütz MK, Caliceti P, Schnürch AB. Design and *in vivo* evaluation of an oral delivery system for insulin. *Pharm Res*, 2000; 17(12):1468–74.
- Mathiowitz E, Furtado S, Abramson D, Burril R, Olivier G, Gourd C, Bubbers E. Oral delivery of insulin loaded poly(fumaric-co-sebacic) anhydride microspheres. *Int J Pharm*, 2008; 347:149–55.
- Matos M, Gutierrez G, Coca J, Pazos G. Preparation of water-in-oil-in-water (W1/O/W2) double emulsions containing trans-resveratrol. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2014; 442 : 69–79.
- McClements DJ. *Food emulsions: Principles, practices, and techniques*, Boca Raton, Florida: CRC Press 2005.
- Mendanha DV, Molina OSE, Favaro-Trindade CS, Mauri A, Monterrey-Quintero ES, Thomazini M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Res Int*, 2009; 42:1099-104.
- Miller WL, Baxter JD. Recombinant DNA: a new source of insulin. *Diabetologia*, 1980; 18: 431-36.
- Morihara K, Oka T, Tsuzuki H. Semisynthesis of human insulin by trypsin-catalyzed replacement of Ala-B30 by Thr in porcine insulin. *Nature*, 1979; 280: 412-23.
- Morishita I, Morishita M, Takayama K, Mashida Y, Nagai T. Hypoglycemic effect of novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor in normal and diabetic rats. *Int J Pharm*, 1992a; 92:9–16.

- Morishita M, Goto T, Nakamura K, Lowman AM, Takayama K, Peppas NA. Novel oral insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: Single and multiple administration studies in type 1 and 2 diabetic rats. *J Control Release*, 2006; 110:587–94.
- Morishita M, Matsuzawa A, Takayama K, Isowa K, Nagai T. Improving insulin enteral absorption using water-in-oil-in-water emulsion. *Int J Pharm*, 1998; 172:189–98.
- Morishita M, Morishita I, Takayama K, Machida Y, Nagai T. Novel oral microspheres of insulin with protease inhibitor protecting from enzymatic degradation. *Int J Pharm*, 1992b; 78:1–7.
- Mukherjee B, Santra K, Pattnaik G, Ghosh S. Preparation, characterization and *in vitro* evaluation of sustained release protein-loaded nanoparticles based on biodegradable polymers. *Int J Nanomed*, 2008; 3(4):487–96.
- Mun S, Choi Y, Rho S, Kang C, Park C, Kim Y. Preparation and Characterization of Water/Oil/Water Emulsions Stabilized by Polyglycerol Polyricinoleate and Whey Protein Isolate. *J Food Sci*. 2010; 75 (2): 116-25.
- Musabayane CT, Munjeri O, Bwititi P, Osim EE. Orally administered, insulin-loaded amidated pectin hydrogel beads sustain plasma concentrations of insulin in streptozotocin-diabetic rats. *J Endocrinol*, 2000; 164:1–6.
- Myers D. *Surfaces, interfaces and colloids: Principles and applications*. 2nd Edition. John Wiley and Sons Inc. 1999; New York.

- Okamoto H, Todo H, Lida K, Danjo K. Dry Powders for Pulmonary Delivery of Peptides and Proteins. *Kona*, 2002; 20:71-83.
- Okochi H, Nakano M. Comparative study of two preparation methods of W/O/W emulsions: stirring and membrane emulsification. *Chem Pharm Bull*. 1997; 45: 1323–326.
- Onder E, Sarier N, Cimen E. Encapsulation of phase change materials by complex coacervation to improve thermal performances of woven fabrics. *Thermoch Acta*, 2008; 467: 63–72.
- Patel N, Craddock BL, Staniforth JN, Tobyn MJ, Welham MJ. Spray-dried insulin particles retain biological activity in rapid in-vitro assay. *J Pharm & Pharmacol*, 2001; 53: 1415–18.
- Pays K, Giemanska-Kahn J, Pouligny B, Bibette J, Leal-Calderón F. Coalescence in surfactant-stabilized double emulsions. *Langmuir*, 2001; 17: 7758-69.
- Pozippe NM, Favaro-Trindade CS, Matias de Alencar S, Thomazini M, de Camargo BJC, Contreras CCJ. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *Food Sci Tech*, 2011; 44: 429-35.
- Prusty AK, Sahu SK. Biodegradable nanoparticles – A novel approach for oral administration of biological products. *Int J Pharm Sci and Nanotech*, 2009; 2(2): 503-8.
- Ré MI. Microencapsulation by spray drying. *Drying Tech*, 1998; 16(6):1195–236.

Ritschel WA. Microemulsions for improved peptide absorption from gastrointestinal tract.

Meth Find Exp Clin Pharmacol, 1991; 13:205–20.

Rocha-Selmi GA, Bozza FT, Thomazini M, Bolini HMA, Fávaro-Trindade CS.

Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex

coacervation to provide protection and prolong sweetness. Food Chem, 2013;

139: 72-78.

Roy SK, Prabhakar B. Bioadhesive Polymeric platforms for transmucosal drug delivery

systems – a Review. Trop J Pharm Res, 2010; 9 (1): 91-104.

Ryle AP, Sanger F, Smith LF, Kitai R. The disulphide bonds of insulin. Biochem J, 1955;

60:542–56.

Sajeesh S, Sharma CP. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid

based nanoparticles for oral insulin delivery. Int J Pharm, 2006; 325(1–2):147–54.

Sanger F. Chemistry of insulin: Determination of the structure of insulin opens the way to

greater understanding of life processes. Science, 1959;129:1340–44.

Sanger F. The terminal peptides of insulin. Biochem J, 1949; 45:563–74.

Saravanan MK, Panduranga RK. Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex

coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides

and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules.

Carbohy Polym, 2010; 80: 808–16.

- Sarmiento B, Martins S, Ferrerira D, Souto EB. Oral insulin delivery by means of solid lipids nanoparticles. *Int J Nanomed*, 2007a; 2(4):743–9.
- Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Ferreira D, Neufeld R. Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules*, 2007b; 8:3054–60.
- Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Ferreira D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids Surf B-Biointerfaces*, 2006; 53:193–202.
- Seifriz W. Studies in emulsions IV. Multiple systems, *J Phys Chem*, 2005; 29: 744-46.
- Sharma G, Wilson K, Van der Walle CF, Sattar N, Petrie JR, Ravi Kumar MN. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010; 76(2): 159-69.
- Sheeja VS, Reddy MH, Joseph J, Reddy ND. Insulin therapy in diabetes management. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 2010; 2(2):98–105.
- Shilling RJ, Mitra AK. Intestinal mucosa transport of insulin. *Int J Pharm*, 1990; 62:53–64.
- Shima M, Tanaka M, Fujii T, Egawa K, Kimura Y, Adachi S, Matsuno R. Oral administration of insulin included in fine W/O/W emulsions to rats. *Food Hydrocolloids*, 2006;20:523–31.

- Silva CM, Ribeiro AJ, Ferreira D, Veiga F. Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur J Pharm Sci*, 2006;29:148–59.
- Singh S, Patel D, Patel RN, Kumar K, Gautam MK.. Insulin oral delivery may be possible: Review Article. *Int J Pharm Profe Res*, 2010; 1(1): 46-51.
- Singnurkar PS, Gidwani SK. Insulin-egg yolk dispersions in self microemulsifying system. *Indian J Pharm Sci*, 2008; 70(6):727–32.
- Thimma RT, Tammishetti S. Study of complex coacervation of gelatin with sodium carboximethyl guar gum: microencapsulation of clove oil and sulphamethoxazole. *J Microencapsul*, 2003; 20(2): 203-10.
- Tiyaboonchai W, Ritthidej GC. Development of indomethacin sustained release microcapsules using chitosan-carboxymethylcellulose complex coacervation. *Songklanakarin J Sci Tech*, 2003; 25(2): 245-54.
- Trenktrog T, Muller BW, Seifert J. *In vitro* investigation into enhancement of intestinal peptide absorption by emulsion systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 1995; 41:284–90.
- USP 30, 2007. United States Pharmacopeia NF 25.
- Vahabzadeh F, Zivdar M, Najafi A. Microencapsulation of orange oil by complex coacervation and its release behavior. *IJE Transactions B: Applications*, 2004; 14(4): 333-42.

- Wang W, Jiang Y, Zhou W. Characteristics of soy sauce powders spray-dried using dairy whey proteins and maltodextrins as drying aids. *J Food Eng*, 2013; 119: 724-30.
- Watnasirichaikul S, Rades T, Tucker IG, Davies NM. In-vitro release and oral bioactivity of insulin in diabetic rats using nanocapsules dispersed in biocompatible microemulsion. *J Pharm Pharmacol*, 2002; 54:473–80.
- Weinbreck F, Minor M, Kruif G. Microencapsulation of oils using whey protein and gum Arabic coacervates. *J Microencapsul*, 2004; 21(6): 667-79.
- Weiss J, Muschioli G. Factors Affecting the Droplet Size of Water-in-Oil Emulsions (W/O) and the Oil Globule Size in Water-in-Oil-in-Water Emulsions (W/O/W). *J Disp Sci & Tech*, 2007; 28. 703-26.
- WHO, 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation.
- Woitiski CB, Neufeld RJ, Veiga F, Carvalho RA, Figueiredo IV. Pharmacological effect of orally delivered insulin facilitated by multilayered stable nanoparticle. *Eur J Pharm Sci*, 2010; 41:556–63.
- Wu ZM, Zhou L, Guo XD, Jiang W, Ling L, Qian Y, Luo KQ, Zhang LJ. HP55-coated capsule containing PLGA/RS nanoparticles for oral delivery of insulin. *Int J Pharm*, 2012; 425:1–8.

- Xing F, Cheng G, Yang B, Ma L. Microencapsulation of Capsaicin by the Complex Coacervation of Gelatin, Acacia and Tannins. *J App Polym Sci*, 2003; 91: 2669–75.
- Yang SZ, Huang YD, Jie XF, Feng YM, Niu JY. Relationship between insulin A chain regions and insulin biological activities. *World J Gastroenterol*, 2000; 6(3):371–3.
- Ye A. Complexation between milk proteins and polysaccharides via electrostatic interactions: Principles and applications — a review. *Int J Food Sci Tech*, 2008; 43(3): 406–15.
- Yin L, Ding J, He C, Cui L, Tan C, Yin C. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials*, 2009; 30:5691–700.
- Zhang Y, Wei W, Lv P, Wang L, Ma G. Preparation and evaluation of alginate–chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *Eur J Pharm Biopharm*, 2011; 77:11–19.
- Zhang Y, Wu X, Meng L, Zhang Y, Ai R, Qi N, He H, Xu H, Tang X. Thiolated Eudragit nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation, characterization and *in vivo* evaluation. *Int J Pharm*, 2012a; 436:341–50.
- Zhang ZH, Zhang YL, Zhou JP, Lv HX. Solid lipid nanoparticles with stearic acid–octaarginine for oral administration of insulin. *Int J Nanomed*, 2012b; 7:3333–39.