



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Enfermería y Nutrición

Tesis para la obtención del título de Licenciado en Nutrición

TÍTULO:

“Desarrollo y evaluación de un sistema de nanoemulsión de tipo W/O/W a base de mucílago de linaza en un modelo de ratas Wistar para la liberación de insulina”

Autor:

PLN. Alejandra Rodríguez Fernández

Director:

Dr. Jaime Reyes Hernández

Co-Director:

Dra. Paola Algara Suárez

Colaborador:

M.C. Concepción López Padilla

Noviembre 2017

San Luis Potosí, S.L.P.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Enfermería y Nutrición

Tesis para la obtención del título de Licenciado en Nutrición

TÍTULO:

“Desarrollo y evaluación de un sistema de nanoemulsión de tipo W/O/W a base de mucílago de linaza en un modelo de ratas Wistar para la liberación de insulina”

Presenta:

PLN. Alejandra Rodríguez Fernández

Director:

Dr. Jaime Reyes Hernández

Co-Director:

Dra. Paola Algara Suárez



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Enfermería y Nutrición

Tesis para la obtención del título de Licenciado en Nutrición

Presenta:

PLN. Alejandra Rodríguez Fernández

Sinodales

Presidente:

QFB. Ana Margarita Martínez Verástegui, MNH

Secretario:

LN. Iván Israel Uresti González, MNC

Vocal:

Dr. Jaime Reyes Hernández

PROYECTO REALIZADO EN:

LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA
DE LA FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN
DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

**ESTE TRABAJO DE TESIS FUE DESARROLLADO GRACIAS AL
FINANCIAMIENTO: CLAVE DEL PROYECTO; FMSLP-2013-C02-208475**

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en especial a la Facultad de Enfermería y Nutrición por la formación profesional que desarrollé dentro de sus aulas, a mis profesores (as) por la dedicación y apoyo durante estos 5 años de formación académica.

Agradezco a mi director de tesis el Dr. Jaime Reyes Hernández, gran maestro y mentor durante mi año de servicio social, por su valioso tiempo, dedicación y apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación.

A mi codirectora de tesis la Dra. Paola Algara Suárez, por el apoyo, consejos y valioso tiempo brindado durante el desarrollo del proyecto de investigación.

A el M.C.A Juan Francisco López Rodríguez por todo el apoyo que me brindó durante mis días de investigación dentro del bioterio de la Facultad de Medicina.

Agradezco a la Mtra. Concepción López Padilla por todo el apoyo y asesoría que me otorgó durante mi servicio social y desarrollo de tesis, eres un excelente ser humano.

Siempre Autónoma por mi Patria Educaré

Agradecimientos Personales

A mis padres con la mayor gratitud por los esfuerzos realizados para que yo lograra terminar mi carrera profesional, siendo para mi la mejor herencia.

A mi madre que es el ser mas maravilloso del mundo. Gracias por el apoyo moral, su cariño y comprensión que desde pequeña me ha bridado, por guiar mi camino y estar siempre junto a mi en los momentos mas difíciles.

A mi padre por que desde pequeña ha sido para mi un hombre grande y maravilloso que siempre he admirado. Gracias por guiar mi vida con energía, esto es lo que ha hecho de mi lo que soy. Con amor, respeto y admiración.

A Dios que me ha heredado el tesoro mas valioso que puede dársele a un hijo “sus padres” y que sin él nada seria posible.

¡GRACIAS!

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN.....	13
II. INTRODUCCIÓN.....	14
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
IV. MARCO TEÓRICO	17
4.1.- Diabetes Mellitus	17
4.1.1.- Diabetes Mellitus tipo 1	18
4.2.- Insulina.....	18
4.2.1.- Tipos de insulina.....	21
4.3.- Emulsión.....	24
4.3.1.- Tipos de emulsión	25
4.3.2.- Emulsificante	26
4.4.- Polímeros	26
4.4.1.- Mucílago de linaza.....	27
4.5.- Aceite de coco.....	28
4.6.- Digestión.....	29
4.6.1.- Digestión de hidratos de carbono	29
4.6.2.- Digestión de lípidos	31
4.6.3.- Digestión de proteínas	33
4.7.- Modelo animal	34
4.8.- Antecedentes.....	35
V. JUSTIFICACIÓN	37
VI. OBJETIVOS.....	38
6.1.- Objetivo general	38
6.2.- Objetivos específicos.....	38
VII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	39
7.1.- Hipótesis.....	39

VIII. METODOLOGÍA.....	40
8.1.- Tipo de estudio	40
8.2.- Diseño metodológico	40
8.3.- Límites de espacio y tiempo	40
8.4.- Muestra	40
8.4.1.- Criterios de inclusión.....	41
8.4.2.- Criterios de exclusión.....	41
8.4.3.- Criterios de eliminación	41
8.5.- Variables	42
8.6.- Procedimientos.....	43
8.6.1.- Obtención del mucílago de la linaza.....	43
8.6.2.- Preparación de la nanoemulsión	43
8.6.3.- Análisis de tamaño de partículas y polidispersión	43
8.6.4.- Análisis termogravimétrico.....	44
8.6.5.- Análisis microestructural	44
8.6.6.- Inducción de diabetes en ratas	44
8.6.7.- Determinación de glucosa en sangre.....	45
8.6.8.- Preparación de solución fisiológica	45
8.6.9.- Administración vía oral de emulsión	46
8.6.10.- Toma de muestra de sangre.....	46
8.6.11.- Inducción de eutanasia	46
8.7.- Recursos Humanos y Materiales	46
8.7.1.- Recursos Humanos.....	46
8.7.2.- Recursos Materiales	46
IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES	47
X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
10.1.- Evaluación de la distribución de partículas y el grado de polidispersión en la nanoemulsión	56
10.2.- Análisis termogravimétrico (TGA).....	60
10.3.- Análisis microestructural	64
10.4.- Análisis <i>IN vivo</i>	65

XI. CONCLUSIÓN	73
XII. CONSIDERACIONES Y RECOMENDACIONES	74
XIII. REFERENCIAS	75
XIV. ANEXOS	80
Anexo 1.- Carta de no conflictos de interés	80
Anexo 2.- Dictámen por parte del comité de ética	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Activación del receptor de insulina en la membrana celular	19
2	Incorporación de transportadores de glucosa (GLUT) de los depósitos intracelulares en el músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo por la intervención de la insulina	20
3	Perfil farmacocinético de las insulinas	22
4	Tipos de emulsiones simples, aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O)	25
5	Tipos de emulsiones complejas, agua en aceite en agua (W/O/W) y aceite en agua en aceite (O/W/O)	26
6	Tipos de transportadores de glucosa, fructuosa y galactosa en el enterocito	30
7	Absorción de lípidos por la membrana de las microvellosidades del intestino delgado	32
8	Estructura química de los aminoácidos	33
9	Diagrama de flujo del procedimiento para identificar la peligrosidad de un residuo	54
10	Tamaños de partículas de la emulsión simple (Ac. de coco-Insulina) en diferentes concentraciones de emulsificante PGPR	57
11	Tamaño de partículas y polidispersión de la emulsión múltiple (Mucílago -Ac. de coco-Emulsificante al 3%-Insulina)	58
12	Termogravimetría de los componentes de la emulsión (NeS y NeM). A) Mucílago al 3 %. B) Aceite de coco. C) Emulsificante PGPR. D) Insulina glargina	61
13	A) Emulsión simple (NeS). B) Emulsión múltiple (NeM). Resultados de termogravimetría	62
14	Identificación de componentes de la emulsión simple (Ac. de coco-Insulina) y emulsión múltiple (Mucílago-Ac. de coco-Insulina)	62

15	Imágenes al microscopio de la emulsión múltiple. A) a un objetivo de 40x. B) a un objetivo de 10x	64
16	Inducción de diabetes en ratas con STZ por canalización de arteria caudal	66
17	Toma de muestra de sangre para la medición de glucosa sanguínea	66
18	Glucosa sanguínea en ratas diabéticas con inyección intramuscular de 30UI de insulina glargina, a los 0, 15, 45, 90 y 140 minutos después de su administración	68
19	Inyección intramuscular de insulina glargina en ratas control	69
20	Administración de emulsión (NeS y NeM) en ratas experimentales	69
21	Resultados de la diferencia entre glucosa final (140 minutos) – glucosa inicial (0 minutos) de ratas diabéticas con dosis 1 y 2 de emulsión múltiple (NeM)	69
22	Resultados de la diferencia entre glucosa final (140 minutos) – glucosa inicial (0 minutos) de ratas diabéticas control, con emulsión simple (ReS) y con emulsión múltiple (ReM)	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Clasificación de insulinas dependientes de la duración de su acción biológica	23
2	Tipo de clasificación de los polímeros	27
3	Tipos de variables	42
4	Composición bromatológica requerida para un alimento de roedores de laboratorio	48
5	Almacenamiento de residuos peligrosos biológico-infecciosos	51
6	Determinación del equipo de protección personal	53
7	Clasificación de residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (tóxicos crónicos)	55
8	Códigos de peligrosidad de los residuos (CPR)	55
9	Resultados del número de dosis de Estreptozotocina (STZ) al total de ratas a través de la canalización de arteria caudal	65
10	Resultados de peso (g) al momento de llegada al bioterio, peso (g) al momento del sacrificio, glucosa (mg/dl) del día de la inducción y glucosa (mg/dl) del día de la experimentación del total de las ratas	66
11	Resultados del total de muestra al final de la experimentación	67
12	Media, desviación estándar y valor de N de las dosis de la emulsión múltiple	70
13	Media, desviación estándar y valor de N en grupos ReS, control y ReM	71

I. RESUMEN

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce suficiente insulina o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Actualmente los tratamientos con insulina utilizados para la diabetes son administrados, más comúnmente, por vía subcutánea, generando molestias físicas que disminuyen un adecuado apego al tratamiento. El desarrollo de otras alternativas para la administración de insulina se ha ido estudiando por años, así como su posible administración por vía oral.

Considerando estudios previos sobre la emulsificación de la insulina, en el presente trabajo se estudió la posibilidad de encapsular insulina mediante un sistema de nanoemulsiones a base de mucílago de linaza. Se desarrolló una nanoemulsión por el método de homogenización a presión, esta se administró vía oral en un modelo animal a base de ratas diabéticas de tipo 1, por la aplicación del agente oxidante de células β Estreptozotocina (STZ), se tomaron muestras de sangre para determinar la cantidad de glucosa sanguínea antes y después de la inducción de diabetes (considerándose diabéticas con glucosa sanguínea >180 mg/dl), así como antes y después de la administración de la nanoemulsión por vía oral. Como resultados se obtuvo un tamaño de partículas de 357 nm y una polidispersión de 0.519 en la nanoemulsión múltiple, idóneos para una absorción intestinal adecuada. Sin embargo en la aplicación de la nanoemulsión en el modelo *in vivo* los resultados no fueron estadísticamente significativos.

II. INTRODUCCIÓN

En México uno de los principales problemas de salud pública es la prevalencia de diabetes mellitus, esta enfermedad es el resultado de una deficiencia en la producción o acción de la insulina y está asociada con complicaciones como pie diabético, enfermedad renal, problemas vasculares (lesiones en vasos sanguíneos) y retinopatía. A mediados del siglo pasado, el doctor Salvador Zubirán publicó los resultados de las primeras encuestas en relación con la diabetes en México, en esos años solo el 1 y 2% de la población adulta tenía diabetes, porcentajes que han ido en aumento en los últimos años. Así mismo, se estima que la diabetes representa un gasto importante para los servicios de salud, ocupa entre el 5 - 10% del presupuesto de un país (1).

Los carbohidratos, grasas y proteínas son los tres constituyentes más importantes en la alimentación. De los carbohidratos ingeridos la glucosa es el último eslabón, sus destinos principales son ser almacenada en forma de glucógeno en el hígado y músculo, o ser metabolizada para la generación de energía. Durante los procesos de metabolismo y anabolismo de la insulina la regulación glucémica natural tiene por objetivo asegurar un perfecto equilibrio entre la producción de glucosa y su consumo, las principales hormonas implicadas en su control son la insulina, el glucagón, la hormona de crecimiento, los glucocorticoides, la adrenalina y la tiroxina (2).

Siendo la insulina la principal hormona involucrada en la regulación glucémica, se relaciona de primera mano con la diabetes mellitus; en la diabetes tipo 1 al existir una falta de producción de insulina proveniente del páncreas y en la diabetes tipo 2 por la existencia de resistencia a la insulina. Esta hormona tiene, como función principal, ayudar a la glucosa a traspasar la membrana celular. Para evitar los efectos del deterioro físico a causa de la diabetes se requieren terapias con insulina (3), este tratamiento se administra por vía subcutánea, donde las inyecciones más frecuentes de son el área del abdomen, brazo, muslo y tórax posterior, predominando una mayor absorción en las áreas con mayor tejido adiposo. En ocasiones se llega a administrar por vía intravenosa o intramuscular. Debido a las molestias físicas que se presentan al

utilizar este tipo de métodos (hematomas, dolor etc.), se ha buscado implementar otras opciones, como su administración por la vía oral, en donde sus principales inconvenientes son: la degradación enzimática, la insulina al ser una hormona de origen proteico sufre degradación por medio de la *tripsina* y *α -quimotripsina* que son las principales enzimas proteolíticas secretadas por el páncreas; una baja permeabilidad, al ser una molécula hidrofílica su absorción en el intestino se dificulta (4); un pH de 4 – 8 es el ideal para la absorción de la insulina, el estómago tiene un pH aproximado de 2 lo que genera la desnaturalización de la hormona (5).

La emulsificación de la insulina ha resultado ser una posible alternativa para el tratamiento farmacológico de la diabetes, debido a que las macropartículas protegen el fármaco de la degradación proteolítica y pueden también promover la absorción de péptidos y proteínas (6). El mucílago de la linaza al ser un polímero natural, cuenta con características como: buena capacidad de retención de agua, propiedades mucodhesivas, de gelificación y pH sensible (7). La implementación de un sistema de nanoemulsiones a base de mucílago de linaza aumenta las posibilidades de cumplir con el objetivo de una alternativa oral del tratamiento insulínico. El presente trabajo detalla una disyuntiva en la investigación de su posible aplicación como método de encapsulación de proteínas, en este caso la insulina, al proponer la administración de un sistema de nanoemulsiones a base de mucílago de linaza por medio de la experimentación en un modelo animal con ratas diabéticas tipo 1.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes mellitus afecta a más de 400 millones de personas a nivel mundial, el 8.5% de los adultos (18 años o mayores) tenía diabetes en el 2014, en el 2012 1.5 millones de personas fallecieron como consecuencia directa de la diabetes y los niveles altos de glucemia fueron causa de otras 2.2 millones de muertes según la Organización Mundial de la Salud en el 2016 (8). La ENSANUT publicó que en el 2016 en México el 9.4% de la población padecía diabetes (9). En San Luis Potosí la prevalencia de diagnóstico médico previo de diabetes estaba por encima de la media nacional con 9.17% en el 2013 (10) y en el 2016 se encuentra en 8.7% (9). Esta enfermedad crónico degenerativa sigue generando deterioros en calidad de vida en gran medida por la falta de apego al tratamiento médico.

En la actualidad la insulina se administra por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular, esto puede llegar a genera presencia de hematomas e inflamación lo que resulta una limitante al ser un método invasivo. La búsqueda de otras alternativas para el tratamiento insulínico ha sido estudiada por generaciones, en su mayoría, los estudios se basan en la investigación de la posibilidad de su administración oral. Muchas de las limitantes encontradas durante la búsqueda de esta alternativa farmacéutica son los procesos de digestión que favorecen la destrucción de la hormona, el pH ácido del estómago que la insulina no puede tolerar, la liberación de enzimas que incentivan la descomposición de las proteínas, siendo este su componente original. Estas limitantes afectan directamente a la biodisponibilidad y absorción intestinal de la hormona (6).

IV. MARCO TEÓRICO

4.1.- Diabetes Mellitus

La diabetes es una enfermedad crónico degenerativa que se presenta cuando el páncreas no produce insulina o la que llega a producir no es utilizada de manera eficiente por el organismo, la insulina es la hormona encargada de que la glucosa proveniente de los alimentos sea absorbida por las células para la generación de energía (11).

- La prevalencia es de 442 millones de diabéticos a nivel mundial (OMS, 2016) (8)
- Más del 80% de las muertes por diabetes se registra en países de ingresos bajos y medios (OMS, 2015) (12).
- 9.4% de la población mexicana padece diabetes, es decir, aproximadamente 6.4 millones de personas han sido diagnosticadas y sólo una cuarta parte de las personas con diabetes están controladas adecuadamente (ENSANUT, 2016) (10).

La Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010 Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus (13), clasifica la diabetes en:

- Diabetes Mellitus tipo 1: Se genera por la destrucción de las células β del páncreas, generalmente con deficiencia absoluta de insulina.
- Diabetes Mellitus tipo 2: Se presenta resistencia a la insulina y en forma concomitante una deficiencia de su producción, puede ser absoluta o relativa.
- Diabetes Gestacional: Es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo, ésta traduce una insuficiente adaptación a la insulinoresistencia que se produce en la madre.

4.1.1.- Diabetes Mellitus tipo 1

La diabetes tipo 1 se caracteriza por la falta de insulina endógena y por una notable tendencia a la cetosis cuando falta la administración exógena de insulina. La destrucción autoinmunitaria de los islotes no progresa siempre de manera uniforme, sino que puede evolucionar con periodos de actividad y remisión temporal. Es necesario que la masa total de las células β se reduzca en 80 - 90% para que la diabetes tipo 1 se manifieste. Los principales anticuerpos circulantes identificados en la diabetes tipo 1 son los que se dirigen contra componentes citoplasmáticos de las células β (anticuerpos antiislote) contra la *descarboxilasa* del ácido glutámico (anti-GAD65) contra la superficie de la célula β , contra la insulina y contra las *fosfatasa*s de tirosina IA-2 e IA-2- β (1).

4.2.- Insulina

La insulina es una hormona peptídica que se genera por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, se compone por 51 aminoácidos en dos cadenas polipeptídicas que son A (21 aminoácidos) y B (30 aminoácidos) unidas por dos puentes disulfuro. Su biosíntesis implica la producción de dos precursores inactivos que son la preproinsulina y la proinsulina, que son escindidos para formar la hormona activa más el péptido de conexión (péptido C) (14).

Esta hormona se almacena en el citosol, en gránulos que se liberan por exocitosis tras el estímulo correspondiente, por la liberación de glucagón mediante las células α del páncreas y principalmente es aumentada por la glucosa (la insulina es la responsable de permitir su paso a la célula para su metabolismo), aminoácidos (su aumento transitorio en niveles plasmáticos induce su secreción) y hormonas peptídicas gastrointestinales (el péptido intestinal similar al glucagón GLP-1, y el polipéptido gástrico inhibidor GIP, aumentan la sensibilidad de las células β a la glucosa). La disminución de su secreción puede deberse a la escasez de alimento y estrés fisiológico, en donde intervienen algunas catecolaminas como la adrenalina, teniendo un efecto en el metabolismo energético al generar una movilización rápida de los productores de energía como la glucosa (glucólisis y gluconeogénesis principalmente) y ácidos grasos (lipólisis). La degradación de la insulina se genera en los lisosomas por la

enzima degradadora de insulina encontrada en hígado y en menor grado en riñones (15). Sus efectos metabólicos son anabólicos, entre ellos está el metabolismo de hidratos de carbono al promover la generación de energía mediante el metabolismo de la glucosa y su almacenamiento en forma de glucógeno en hígado, músculo y tejido adiposo; efecto sobre el metabolismo de lípidos, en el tejido adiposo, al producir liberación de ácidos grasos mediante la inhibición de la *lipasa sensible a hormonas*, aumenta el transporte y metabolismo de la glucosa en los adipocitos generando glicerol 3-fosfato para la síntesis de triglicéridos y aumenta la expresión del gen para la *lipoproteína lipasa* (proporciona ácidos grasos para la esterificación de glicerol); efecto sobre la síntesis de proteínas al estimular la entrada de aminoácidos en la célula (15). El mecanismo de acción de la insulina es mediante la unión a receptores específicos (tirosina cinasa) con alta afinidad de la membrana celular (hígado, músculo y tejido adiposo), al generarse esta unión se inducen cambios conformacionales que promueven la autofosforilación rápida de las subunidades β del receptor, que a su vez genera una cascada de señalización de la célula, como la fosforilación de proteínas sustrato receptor de insulina (SRI) que interaccionan con moléculas señalizadoras que activan vías que afectan la expresión genética, metabolismo celular y crecimiento. Para la regulación del receptor de la insulina, los receptores llegan a ser degradados o reciclados a la superficie de la célula y la insulina se degrada en los lisosomas dentro de la célula (15).

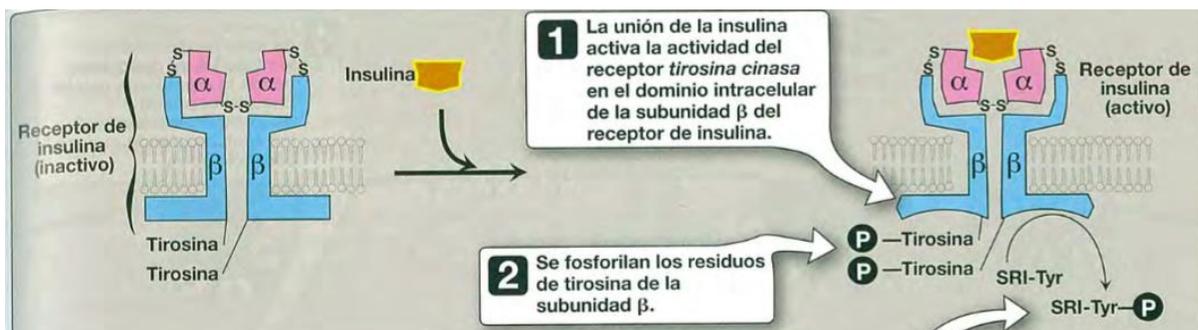


Figura 1. Activación del receptor de insulina en la membrana celular. R. Ferrier, Denise. Bioquímica. 6th ed.; 2014.

La captación de glucosa dentro de la célula inicia con la unión de la insulina a las subunidades α de su receptor (tirosina cinasa) formando el complejo insulina-tirosina cinasa en la membrana celular, que desencadena una cascada de señalización donde se favorece la incorporación de transportadores intracelulares de glucosa hasta la membrana celular denominados GLUT (por ejemplo GLUT-3 transporta la glucosa en las neuronas, GLUT-1 en los eritrocitos y barrera hematoencefálica, GLUT-4 en músculo y tejido adiposo, GLUT-2 en hígado, riñón y células β del páncreas) con ello se realiza la captación de la glucosa hacia el interior celular mediante su paso por estos canales (transportadores intracelulares), una vez dentro de la célula se activa la *enzima glucocinasa* que genera la fosforilación de la glucosa y el producto restante se dirige al ciclo de Krebs para la generación de energía o a la glucogénesis para su almacenamiento (15).

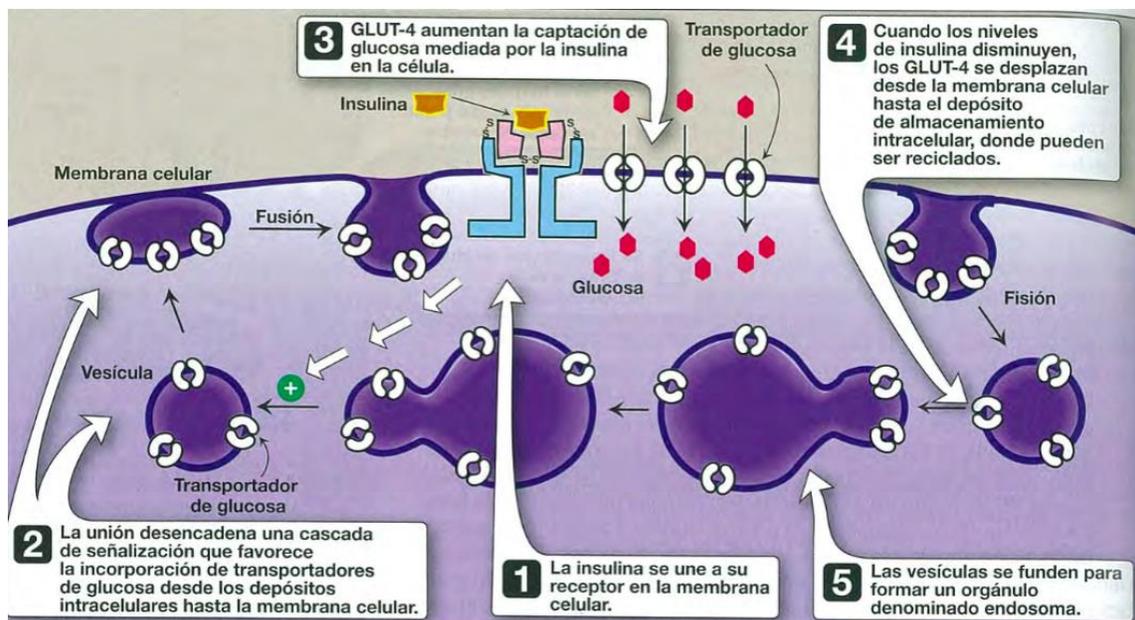


Figura 2. Incorporación de transportadores de glucosa (GLUT) de los depósitos intracelulares en músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo por la intervención de la insulina. R. Ferrier, Denise. Bioquímica. 6th ed.; 2014.

4.2.1.- Tipos de insulina

Las preparaciones comerciales de insulina difieren de la especie de la cual se obtienen, de su pureza, concentración y solubilidad, así como del principio activo y duración de su acción biológica. Existen diferentes tipos de insulina dependientes de la duración de su acción biológica (figura 3) como:

- Ultrabreve (ultrarrápida): Lispro (nombre genérico) es un análogo monomérico de la insulina, producido por tecnología recombinante, donde dos aminoácidos cercanos de la cadena B se intercambian de posición: la prolina en la posición B28 es movida a la B29 y la lisina en la posición B29 es movida a la B28. Estos cambios no interfieren con las características generales de la insulina regular, su ventaja es la baja propensión para formas hexámeros.
- Acción breve (rápidas): La insulina regular (nombre genérico) es una insulina con zinc, cristalina, soluble y de acción breve. Es el único tipo de insulina que debe administrarse por vía intravenosa o mediante bombas de infusión.
- Acción Intermedia: Las forman dos tipos de insulinas, una que tiene protamina y zinc, y otras que están mezcladas con una alta proporción de zinc. La primera tiene un inicio de acción retardado por la combinación de insulina y protamina en una proporción aproximada de 10:1 en peso, lo cual involucra aproximadamente seis moléculas de insulina por una de protamina, después de su inyección subcutánea, las enzimas proteolíticas degradan la protamina para permitir la absorción de la insulina.
- Acción prolongada: En este grupo se encuentran las insulinas ultra-lentas y la protamina-zinc. Las insulinas humanas de acción prolongada tienen un perfil farmacodinámico diferente a sus similares de origen animal. La presencia de zinc en la insulina humana aumenta su capacidad hidrofílica, lo que aumenta su solubilidad y por lo tanto su absorción a partir del tejido graso subcutáneo.

Existen preparaciones premezcladas de insulina con el objetivo de emular los dos componentes de la secreción de insulina, estas consisten en una cantidad establecida de insulina intermedia con un porcentaje de insulina regular. Otras preparaciones consisten en una cantidad de insulina intermedia protamina con una proporción de lispro (16).

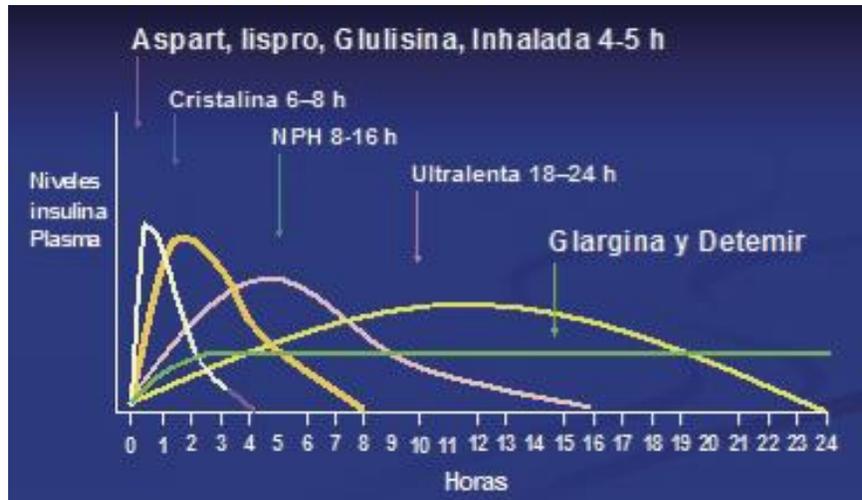


Figura 3. Perfil farmacocinético de las insulinas. Bejarano-Roncancio J. J, Almaz-Labarca J. C, Veloza-Naranjos A. L. Análogos de insulina: relevancia clínica y perspectiva futura; 2011.

Tipo de insulina	Insulina		Acción			
	Nombre genérico	Nombre comercial	Comienzo	Pico máximo	Duración	Aspecto
Ultrarrápida	Aspart	NovoRapid	5 – 15 minutos	1 – 2 horas	2 – 4 horas	Claro
	Glulisina	Apidra				
	Lispro	Humalog				
Rápidas	Regular	Humulin R	30 – 60 minutos	2 – 4 horas	5 – 7 horas	Claro
		Insuman R				
		Novolin R				
Intermedias	NPH	Humulin N	1 - 2 horas	5 – 7 horas	Hasta 24 horas	Turbio
		Insuman N				
		Novolin N				
Prolongadas	Detemir	Levemir	1 – 2 horas	No tiene	Hasta 24 horas	Claro
	Glargina	Lantus				
Mezclas	Humanas	Humulin 70/30	30 – 60 minutos	2 – 7 horas	Hasta 24 horas	Turbio
		Novolin 70/30				
	Análogos	Humalog 25	5 – 15 minutos	1 – 2 horas		
		NovoMix 30				

Tabla 1. Clasificación de insulinas dependientes de la duración de su acción biológica. Gonzáles Ortiz M., Martínez Abundis E.: Las insulinas; 2001.

En general las insulinas disponibles se encuentran en concentraciones de 100 unidades/ml (100 UI) y se expenden en envases de 10 ml (16).

4.3.- Emulsión

Una emulsión puede definirse como una operación de mezcla en la cual se consigue combinar íntimamente dos o más sustancias que normalmente serían inmiscibles (17).

La emulsificación se consigue dispersando una de las fases en forma de minúsculas gotas o glóbulos de la otra fase. La sustancia que se desintegra de ese modo se conoce como la fase dispersa, discontinua o interna, y la fase contraria se denomina dispersante, continua o externa; además de determinar las dos fases principales se suele añadir, en pequeñas cantidades, otras sustancias conocidas como agentes emulsionantes con el fin de estabilizar la emulsión (17).

Las emulsiones cuyos glóbulos de la fase interna son muy pequeños, del orden de 0,0015 – 0,15 micras de diámetro, se denominan microemulsiones. Tienen una apariencia transparente, y las gotas proporcionan un área de contacto muy grande y buenas propiedades de penetración. Son útiles en la aplicación de herbicidas y pesticidas, administración de medicamentos orales y por vía intravenosa (18).

Si existe algún pequeño desequilibrio entre los grupos polares y apolares en las moléculas de una sustancia, estas serán adsorbidas en la interfase entre las fases de la emulsión, estas moléculas se colocarán alineadas en la interfase de forma que los grupos polares se orientan hacia la fase acuosa y los apolares hacia la fase oleosa; al recubrir de esta forma la interfase, las moléculas del emulsionante reducen la tensión interfacial entre ambas fases y forman una película alrededor de las gotas de la fase interna, estabilizándola (18).

4.3.1.- Tipos de emulsión

Los tipos de emulsiones simples se pueden clasificar en:

- Emulsión de aceite en agua (O/W): las gotas de aceite están dispersas en agua
- Emulsión de agua en aceite (W/O): las gotas de agua se encuentran dispersas en aceite.

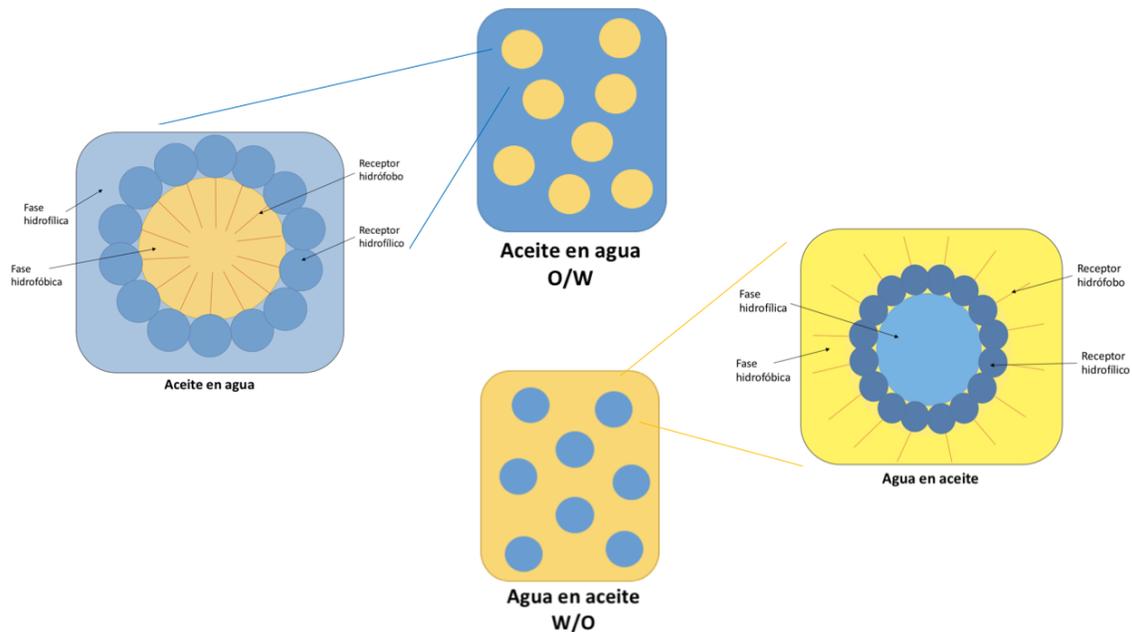


Figura 4. Tipos de emulsiones simples, aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O).

Cuando se mezclan por emulsificación la fase hidrofílica y la hidrófoba se pueden lograr dos tipos de emulsiones, puede ser la oleosa la que se disperse en la fase hidrofílica lo que produce una emulsión de aceite en agua, o puede ser la fase hidrofílica la que se disperse en la fase hidrófoba produciendo una emulsión de agua en aceite (18).

Algunos sistemas de emulsiones más complejos, llamados emulsiones complejas trifásicas pueden ser de tipo:

- Emulsión de aceite en agua en aceite (O/W/O)
- Emulsión de agua en aceite en agua (W/O/W)

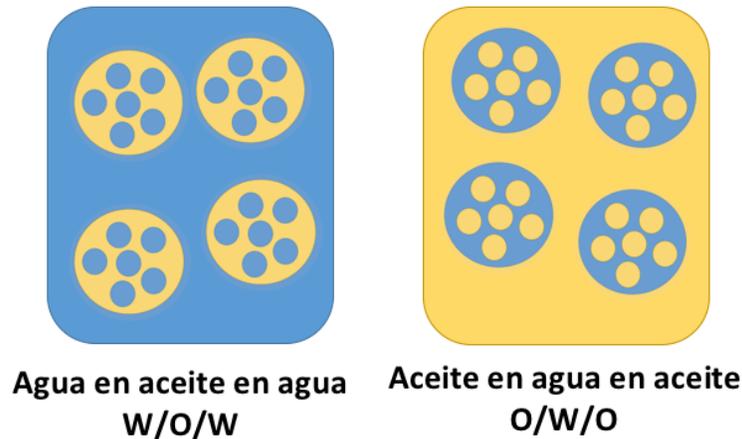


Figura 5. Tipos de emulsiones complejas, agua en aceite en agua (W/O/W) y aceite en agua en aceite (O/W/O).

4.3.2.- Emulsificante

Emulsificante es cualquier sustancia de superficie activa, que es capaz de adsorber a una interfase de aceite en agua, creando una barrera entre el líquido atrapado dentro de las gotas emulsificadas que ralentiza los mecanismos de desestabilización como la agregación, floculación y coalescencia (19).

La capacidad emulsionante de un agente puede clasificarse según el equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de sus moléculas. El HLB se define como la razón entre el porcentaje ponderado de los grupos hidrofílicos respecto al porcentaje ponderado de los grupos hidrofóbicos en las moléculas del agente emulsionante. Los valores HLB de los agentes emulsionantes varían de 1 a 20. Los valores HLB bajos (3 – 6) fomentan la formación de emulsiones agua en aceite, mientras los agentes con valores alto (8 – 16) favorecen la formación de emulsiones del tipo aceite en agua (18).

4.4.- Polímeros

Los polímeros son compuestos macromoleculares en los cuales cadenas o redes de pequeñas unidades respectivas forman moléculas enormes. Los polímeros se sintetizan mediante dos tipos principales de reacciones: reacciones de adición y reacciones de condensación; los grupos funcionales presentes en los materiales iniciales determinan que tipo de reacción se utiliza (20).

Tipo de clasificación		Descripción
Por tamaño	Oligómeros	Peso molecular inferior a 1500g/mol y longitud de cadena de 50Å.
	Hemicoloídes	Peso molecular de 1500 – 5000g/mol y longitud de cadena de 50Å – 500Å.
	Mesocolídes	Peso molecular entre 5000g/mol y 10000g/mol y longitud de cadena de 500 – 2500Å.
	Eucoloídes	Peso molecular mayor a 10000g/mol y longitud de cadena mayor a 2500Å.
Por naturaleza de los monómeros	Homopolímeros	Todos los monómeros que lo constituyen son iguales
	Copolímeros	Están formados por dos o más monómeros diferentes. A su vez se clasifican en: copolímeros aleatorio, en bloques y de injerto.
Por su estructura de cadena	Lineal	Se repite siempre el mismo tipo de unión
	Ramificado	Con cadenas laterales unidas a la principal. Estos a su vez se clasifican en: en árbol o en estrella y dendrímeros
	Entrecruzados	si se forman enlaces entre cadenas vecinas. Estos a su vez se clasifican en: unión directa y a través de una tercera molécula

Tabla 2. Tipos de clasificación de los polímeros. Atkins P., Jones L.: Principios de química: Los caminos del descubrimiento; 2010.

Los polímeros derivados de las plantas han suscitado un enorme interés debido a sus diversas aplicaciones farmacéuticas como diluyentes, aglutinantes, desintegrantes en tabletas, espesantes en líquidos orales, coloidales protectores en suspensiones, gelificantes en geles y bases en supositorios (21).

4.4.1.- Mucílago de linaza

La semilla de la linaza, es una pequeña semilla ovalada y plana de lino (*Linum usitatissimum*), el mucílago de la linaza se obtiene de dicha semilla. La goma de la linaza comprende aproximadamente el 8 % del peso de la semilla y su rendimiento depende de los regímenes de extracción (22). Es un polisacárido heterogéneo soluble en agua, compuesto de xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa, ácido galacturónico, ramnosa y fructuosa (23).

Este polisacárido aniónico tiene una carga negativa debido a la presencia de un grupo carboxilo ionizado. La repulsión electrostática intermolecular debida a homo-cargas hace que las cadenas moleculares queden completamente extendidas e interpretadas entre sí, para formar reticulación intermolecular que induce la gelificación (22). Es un

hidrocoloide con buena capacidad de retención de agua, debido a su marcada capacidad de hinchamiento y alta viscosidad en solución acuosa. La presencia de muchos oligosacáridos y polisacáridos en muchas sustancias imparte propiedades muco-adhesivas y este mucílago es una rica fuente de polisacáridos lo que le confiere una notable capacidad de hinchamiento y alta viscosidad (24).

4.5.- Aceite de coco

El aceite de coco se deriva del núcleo de *Cocos nucifera L.*, una planta tropical. Es un líquido transparente a temperatura ambiente que se compone principalmente de ácidos grasos saturados (<91%) principalmente de cadena media (>51%) que son de fácil digestión y absorción. Contiene más del 50% de triglicéridos de cadena media (TG-CM) que se forman a partir del ácido caprílico, ácido láurico y ácido mirístico (25). Esto favorece su absorción intestinal, ya que los TG-CM se absorben con mayor rapidez y mayor eficacia en comparación con los triglicéridos de cadena larga (TAG-CL) (26).

Los TG-CM que contienen ácidos cáprico y caprílico son hidrolizados por las lipasas gástricas, lingual e intestinal y rápidamente absorbidos, la masa molar es suficientemente pequeña para que sean hidrosolubles por lo que se requieren menos sales biliares para su digestión, no se re-esterifican en el enterocito y son transportados por la vena porta, pueden ingresar en las células de la mucosa intestinal en forma de diglicéridos y monoglicéridos, los cuales son hidrolizados por la lipasa de la mucosa a ácidos grasos de cadena media (AGCM) y glicerol, los AGCM libres son unidos a albúmina y transportados por vía porta al hígado (27).

Los ácidos grasos de cadena media tienen algunas propiedades funcionales y nutricionales específicas que incluyen efectos antivirales, antibacterianos, antiplacas, antiprotozoarios, cicatrizantes, antiinflamatorios entre otros (28).

Los procesos para la refinación más utilizados para el aceite de coco son la refinación química y física, la refinación física es la más utilizada ya que no necesita hidróxido de sodio el cual es utilizado en la refinación química para neutralizar los ácidos grasos

libres, lo que evita la generación de jabón y se evita la formación de aguas residuales con alto contenido de sulfatos y la pérdida de aceite neutro (26). El aceite de coco se consume principalmente para fines comestibles y no comestibles como lo son productos farmacéuticos, confitería, panadería, cocina y cosméticos (28).

4.6.- Digestión

4.6.1.- Digestión de hidratos de carbono

Los hidratos de carbono están formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, los principales hidratos de carbono de la dieta se pueden clasificar en: monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

La digestión de los hidratos de carbono inicia en la boca por acción de la *amilasa salival* activa a un pH neutro o ligeramente alcalino, que degrada pequeñas cantidades de almidón (moléculas grandes formadas por cadenas rectas o ramificadas de moléculas de azúcar que están unidas entre sí), esta enzima se inactiva en contacto con el ácido clorhídrico presente en el estómago; el estómago habitualmente se vacía antes de que tenga lugar una digestión significativa de hidratos de carbono, después, en el intestino delgado (donde se realiza la mayor parte de la digestión de hidratos de carbono), se degrada por completo el almidón y dextrinas, por secreción de la α -*amilasa* desde el páncreas generando hidratos de carbono de menor peso molecular como dextrinas y maltosa; así mismo las enzimas de borde de cepillo en el intestino delgado como: *sacarasa* donde su sustrato es la sacarosa para formar glucosa y fructuosa, α -*dextrinasa* (*isomaltasa*) donde su sustrato es la dextrina (*isomaltasa*) y *maltasa* donde su sustrato es la maltosa para generar glucosa y *lactasa* donde su sustrato es la lactosa para formar glucosa y galactosa, hidrolizan aún más los disacáridos y oligosacáridos para la obtención de monosacáridos (glucosa, galactosa y fructuosa) atraviesan las células de la mucosa y pasan hacia el torrente sanguíneo, a través de los capilares de las vellosidades, desde donde son transportados por la vena porta al hígado en donde se metabolizan o almacenan (27).

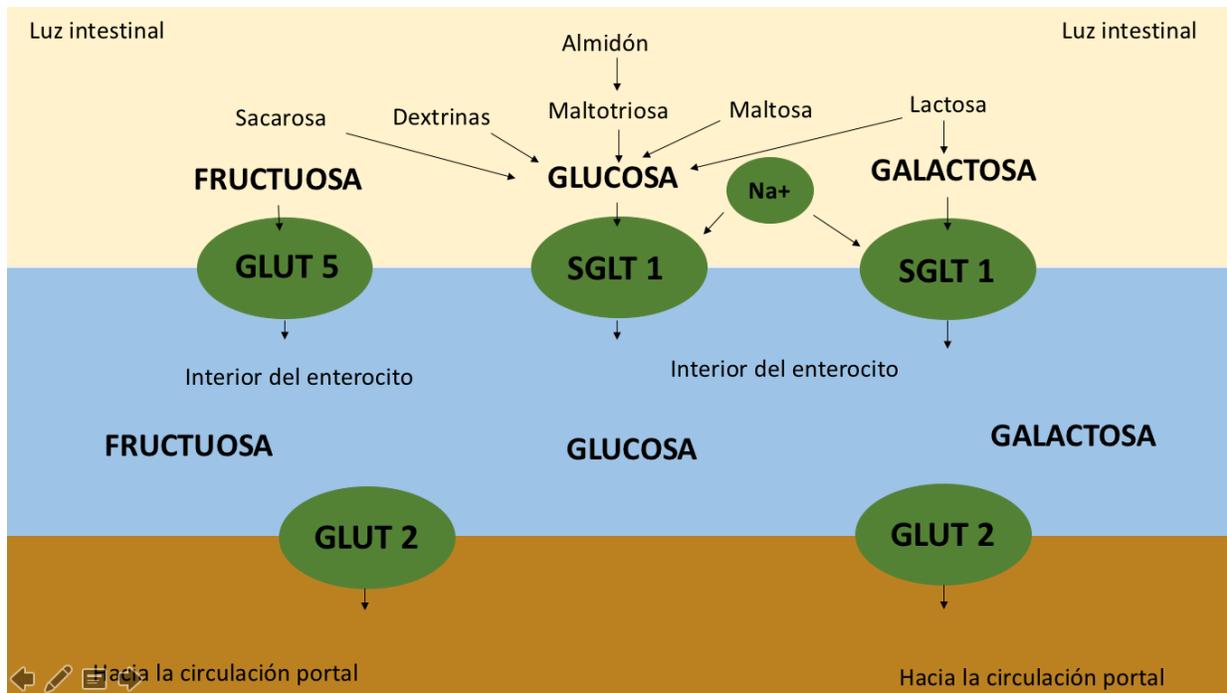


Figura 6. Tipos de transportadores de glucosa, fructuosa y galactosa en el enterocito. Kathleen Mahan L., Escott-Stump S., L. Raymond J.: Krause Dietoterapia; 2013.

La glucosa y la galactosa se absorben por transporte activo a concentraciones bajas, el co-transportador de glucosa (galactosa) es SGLT1. El GLUT2 es el principal transportador, a mayores concentraciones, facilita el paso hacia el interior de la célula intestinal. La fructuosa se absorbe más lentamente con el transportador GLUT5. Se utiliza GLUT2 para transportar tanto glucosa como fructuosa a través de las membranas de las células intestinales hacia la sangre (27). La glucosa se transporta desde el hígado hasta los tejidos, donde parte de la glucosa se metaboliza por medio de la glucólisis o se almacena en el hígado o músculo en forma de glucógeno por medio de la glucogénesis. La mayor parte de la fructuosa y galactosa se transporta a hígado para formar glucosa (27).

4.6.2.- Digestión de lípidos

Los ácidos grasos son cadenas hidrocarbonadas no ramificadas con un número par de átomos de carbono, se clasifican según el número de átomos de carbono, número de dobles enlaces y la posición de los dobles enlaces en la cadena (27).

La digestión de los lípidos inicia en el estómago por medio de *la lipasa lingual* y *la lipasa gástrica* que degrada triglicéridos, continua en el intestino delgado (duodeno) en donde se lleva a cabo la emulsión de grasas, por medio de la sales biliares (producidas en el hígado y almacenadas en la vesícula biliar) y el proceso mecánico de mezcla por peristaltismo, liberando colesterol en donde *la lipasa pancreática* unida con *la colipasa* realizan degradación de las moléculas de triacilgliceroles en monoglicéridos y ácidos grasos libres, los ácidos grasos de cadena corta o media pasan directamente a torrente sanguíneo y los ácidos grasos de cadena larga junto con el monoacilglicerol y el colesterol producen micelas mixtas para facilitar la absorción en las células de la mucosa intestinal (enterocitos), estas a su vez atraviesan la membrana celular hasta llegar al retículo endoplásmico en donde los ácidos grasos y los monoglicéridos se resintetizan en triglicéridos y junto con colesterol, fosfolípidos y lipoproteínas forman micelas que se incorporan a un quilomacrón, y a su vez, pasan a la circulación sanguínea por medio de los vasos linfáticos y una vez en el torrente sanguíneo estos quilomicrones captan apolipoproteínas E y C (15).

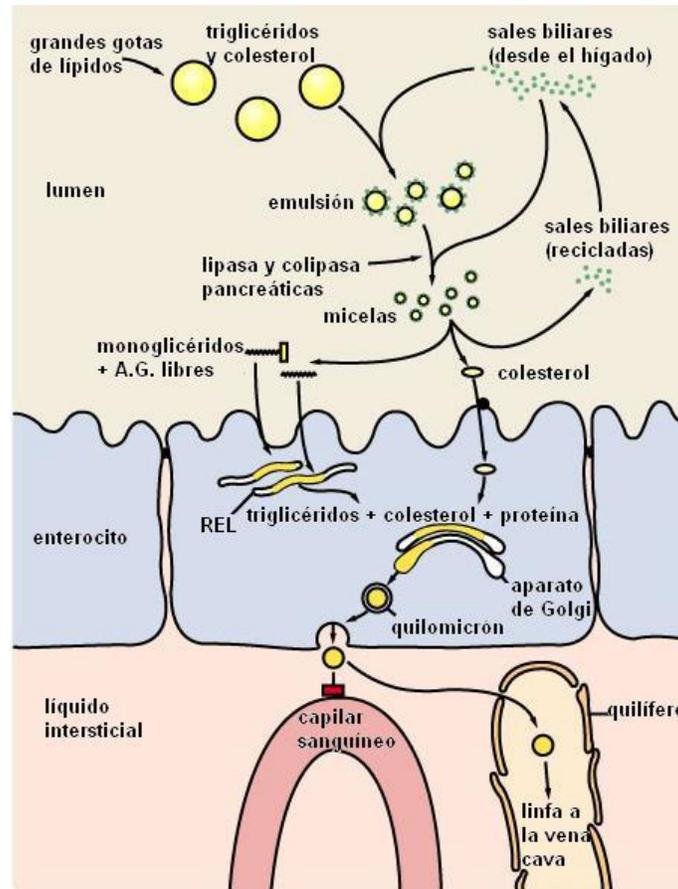


Figura 7. Absorción de lípidos por la membrana de las microvellosidades del intestino delgado. Kathleen Mahan L, Escott-Stump S, L. Raymond J. Krause Dietoterapia. 13th ed.; 2013.

Los triglicéridos contenidos en los quilomicrones se descomponen principalmente en los capilares del músculo esquelético, cardíaco y tejido adiposo, se degradan a ácidos grasos libres y glicerol por intervención de la *lipoproteína lipasa*. Los ácidos grasos libres resultantes pueden entrar a las células musculares, adipocitos (la mayoría de las células pueden oxidar ácidos grasos) o transportarse por sangre y unirse a la albúmina para absorberse en las células. El glicerol es fosforilado por la *glicerol cinasa* hepática para producir glicerol 3-fosfato que puede entrar en la glucólisis o gluconeogénesis por la oxidación de dihidroxiacetona fosfato (15).

4.6.3.- Digestión de proteínas

Las proteínas están formadas por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos y los aminoácidos son ácidos carboxílicos con un grupo amino unido al carbono α (27).

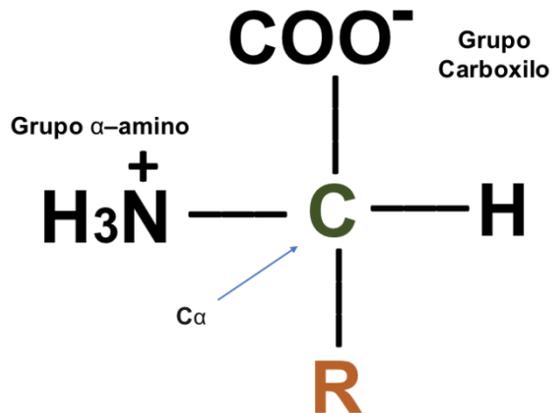


Figura 8. Estructura química de los aminoácidos.

La digestión de proteínas comienza en el estómago, donde algunas de las proteínas son hidrolizadas para dar proteasas, peptonas y polipéptidos grandes. El pepsinógeno inactivo se convierte en la enzima pepsina cuando entra en contacto con el ácido clorhídrico y con otras moléculas de pepsina, la principal función de la enzima *pepsina* es digerir el colágeno. La mayor digestión de las proteínas es en la porción superior del intestino delgado. El contacto del quimo y la mucosa intestinal estimula la liberación de *enterocinasa* que transforma el tripsinógeno pancreático inactivo en *tripsina* activa (principal enzima pancreática que digiere proteínas). La *tripsina*, *quimiotripsina* y *carboxipeptidasa* hidrolizan proteínas hasta formar polipéptidos pequeños y aminoácidos. Las *peptidasas* proteolíticas localizadas en el borde de cepillo también actúan sobre los polipéptidos, escindiéndolos para dar aminoácidos, dipéptidos y tripéptidos. Los productos finales de la digestión de proteínas se absorben en forma de aminoácidos y de péptidos pequeños, se necesitan varios transportadores para los diferentes aminoácidos debido a la diferente polaridad, tamaño, y configuración de diferentes aminoácidos. El transportador peptídico PEPT1 transporta grandes cantidades de dipéptidos y tripéptidos hacia las células intestinales. Los péptidos y

aminoácidos absorbidos son transportados hasta el hígado por medio de la vena porta para su metabolismo y son liberados hacia la circulación general (27).

4.7.- Modelo animal

El uso de animales como fuente de conocimientos experimentales tiene una larga tradición. Cuando la sacralidad del cuerpo humano era prohibida para la disección, eran animales los que brindaban, por analogía, el conocimiento de sus entrañas al servicio de la medicina. La estructura de las ciencias médicas sería inconcebible sin el empleo de animales y sin su sometimiento a condiciones que la conciencia moral prohíbe imponer a seres humanos.

En la actualidad, las ciencias biomédicas obtienen información relevante de distintos tipos de estudios experimentales. Los resultados de investigaciones con modelos animales proporcionan información necesaria para diseñar pruebas humanas, las mismas que deben cumplir para la aprobación legal de nuevos dispositivos, fármacos y procedimientos con carácter terapéutico y diagnóstico (29). Los estudios con animales son una obligación en los códigos de ética para la investigación biomédica, según el Código de Nuremberg “cualquier experimento hecho en seres humanos “debe estar diseñado a partir de resultados de investigación animal” (30). La declaración de Helsinki (adoptada en 1964 por la XIII Asamblea Médica Mundial) también señala que la investigación médica en sujetos humanos “debe estar basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación animal” (31).

Existen suficientes similitudes anatómicas, fisiológicas, neurológicas, bioquímicas, farmacológicas y de comportamiento entre seres humanos y animales como para estudiar en ellos efectos biológicos del desarrollo de enfermedades, efectos terapéuticos y otras intervenciones (32).

4.8.- Antecedentes

En 1982 Oppenheim y col. desarrollaron nanopartículas de insulina para su administración oral, se probaron en un modelo animal y se pudo obtener una reducción de 15 – 20% del valor inicial en la glucosa sanguínea, pero su principal problema fue que estas nanopartículas no protegían la insulina de la actividad proteolítica ocasionada por las enzimas digestivas (33). Seis años después en 1988 Damgé y col. desarrollaron nanocápsulas a base de un polímero biocompatible y biodegradable que administraron en ratas diabéticas por vía intragástrica, se obtuvo una disminución de glucosa en ayunas en un 50 - 60%, el efecto apareció 2 días después de su administración y se prolongó durante 20 días, pero en las ratas que se les administró insulina no encapsulada no hubo efecto en los niveles sanguíneos de glucosa y la reducción de glucosa era la misma independientemente de la dosis, pero su duración si dependía de la dosis de insulina (34).

Schilling y Mitra en 1990 en su estudio sobre el transporte de insulina en la mucosa intestinal concluyeron que la permeabilidad de la insulina aumentó a través del duodeno y yeyuno medio distal cuando se administraba a través de soluciones de micelas mixtas de glicocolato de sodio y ácido linoleico (35). Así mismo, en 1994 Moncrieff y col. Obtuvieron una biodisponibilidad absoluta de 1.8% en yeyuno medio por la administración enteral de 10 UI/kg de insulina con glicocolato de sodio 30 mM y 40 mM de ácido linoleico en perros (36). Un año más tarde, en 1995 Matsuzawua y col. realizaron una emulsión W/O/W de insulina en donde la biodisponibilidad de la emulsión respecto a la administración intravenosa era de 1.03% en íleon y 0.75% en colon, el efecto se debía a la promoción de la absorción linfática de la insulina y el aumento de la superficie de la emulsión filtrada que facilita la actividad de la lipasa, liberando ácidos grasos, formando micelas mixtas juntos con las sales biliares, promoviendo la absorción (37).

En 1996 Ho y col. descubrieron que las microemulsiones con ésteres de ácidos grasos como emulsionantes y alcoholes de cadena corta como co-tensoactivos son adecuados para la administración oral de insulina, ya que existe una mayor estabilidad,

viscosidad y eficacia protectora en medio ácido (38). En ese mismo año Takeuchi y col. encontraron que en los liposomas recubiertos con quitosano tenían una mayor adhesividad en función a la cantidad de quitosano en la superficie, en su estudio de administración intragástrica (24 UI/rata) en ratas normales se redujo la glucosa en sangre basal 30 minutos después de su administración en comparación de los liposomas no recubiertos donde el efecto hipoglucémico se mantuvo durante 12 horas, su biodisponibilidad relativa con respecto a la inyección subcutánea de 5 UI fue de 10% y 1 UI de insulina fue 5% (39). En su estudio realizado en 1999 sobre el mecanismo de la encapsulación de la insulina en nanocápsulas obtenidas por polimerización, Aboubakar y col. concluyeron que el efecto biológico de la insulina no se debe a la interacción química o incluso física entre el polímero y la insulina (6).

V. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es una realidad que genera millones de muertes anuales a nivel mundial, incrementa los gastos en la economía de una nación en materia de salud y disminuye la esperanza de vida de una persona. En la actualidad las molestias ocasionadas por el uso de insulina intravenosa, intramuscular o subcutánea son más frecuentes, esto afecta directamente la calidad de vida, por ello, es de gran importancia el desarrollo de una alternativa oral, al ser un método menos invasivo se podría incrementar el apego al tratamiento y así mismo, podría generar una disminución en costos referentes a su administración.

Estudios previos demuestran la viabilidad de la emulsificación de proteínas incluida la insulina. Por ello, una de las opciones para que la insulina pueda ser administrada oralmente es la utilización de emulsiones que proteja dicha hormona de los procesos de digestión, se logre su liberación en el intestino para su absorción y pueda utilizarse en el metabolismo de la glucosa. Una vez dicho esto, se logró desarrollar un sistema de nanoemulsiones a base de polímeros provenientes del mucílago de linaza, este sistema ha presentado características que sugieren su posible utilización en la protección de proteínas.

Por ello, se llevó a cabo la investigación de la nanoemulsión desarrollada con su evaluación *in vivo*, en un modelo animal para conocer sus efectos y responder a la interrogante de su existente posibilidad en la aplicación como método alternativo del tratamiento insulínico en seres humanos. Con esto estaremos más cerca de desarrollar una alternativa farmacéutica para la administración de la insulina, por consiguiente, disminuir molestias, aumentar el apego al tratamiento y mejorar la calidad de vida de las pacientes diabéticas.

VI. OBJETIVOS

6.1.- Objetivo general

Evaluar la liberación de insulina de un sistema de nanoemulsiones tipo W/O/W a base de mucílago de linaza en un modelo de ratas Wistar diabéticas.

6.2.- Objetivos específicos

1. Desarrollo de una nanoemulsión a base de mucílago de linaza con resistencia a pH.
2. Inducir diabetes tipo 1 en ratas macho Wistar.
3. Estandarizar la administración vía oral de la nanoemulsión de insulina a base de polímeros en ratas diabéticas.
4. Evaluar los niveles de insulina presentes en la sangre de las ratas, así como medir sus niveles de glucosa sanguínea mediante el uso de glucómetro.

VII. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La administración por vía oral de insulina mediante una nanoemulsión en un sistema polimérico pH sensible a base de mucílago de linaza disminuye los niveles de glucosa en sangre en un modelo de hiperglucemia en ratas?

7.1.- Hipótesis

Los niveles de glucosa en ratas Wistar diabéticas pueden ser reducidos con la administración oral de una nanoemulsión a base de un sistema polimérico pH sensible.

VIII. METODOLOGÍA

8.1.- Tipo de estudio

Experimental con enfoque cuantitativo

8.2.- Diseño metodológico

Correlacional, transversal

8.3.- Límites de espacio y tiempo

- Lugar: Bioterio de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. El protocolo se sometió a consideración en el comité de ética de la Facultad de Enfermería y Nutrición y fue aceptado en enero del 2017 con el registro CEIFE-2017-201

- Tiempo: Enero 2017 – agosto 2017

8.4.- Muestra

El tamaño de la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$N = (z \cdot \zeta / \delta)^2$$

Donde:

$$Z = 1.96$$

$$\zeta = 0.1$$

$$\delta = 0.07$$

$$N = 7.84 = 8$$

Se calculó una N= 8 para cada grupo experimental, solo se usó una N= 5 en dos grupos experimentales, por protocolo, y una N= 10 en un grupo experimental con un total de muestra de 20 ratas.

8.4.1.- Criterios de inclusión

- Ratas con certificado de salud y calidad
- Raza Wistar
- Machos
- Peso mayor de 150 g

En el momento del experimento:

- Ratas diabéticas con glucosa >180 mg/dl

8.4.2.- Criterios de exclusión

- Ratas sin certificado de salud y calidad
- Raza distinta a la Wistar
- Hembras
- Peso menor 150 g

En el momento del experimento:

- Ratas no diabéticas o con glucosa <180 mg/dl

8.4.3.- Criterios de eliminación

- Ratas muertas durante el periodo de diabetes

8.5.- Variables

Variable	Definición textual	Definición operativa	Tipo de variable
Glucosa en sangre	Concentración de glucosa en sangre durante el ayuno	Hiperglucemia= glucosa >180 mg/dl	Cuantitativa
Peso	Peso antes de la administración de Estreptozotocina	Kilogramos de peso total	Cuantitativa
	Peso después de la administración de la Estreptozotocina y antes de la administración de la nanoemulsión conteniendo 30 UI de insulina en cada dosis	Kilogramos de peso total	Cuantitativa
	Peso después de la administración de la nanoemulsión con insulina y antes de la eutanasia	Kilogramos de peso total	Cuantitativa

Tabla 3. Tipos de variables

8.6.- Procedimientos

8.6.1.- Obtención del mucílago de la linaza

Se realizó la extracción del mucílago de la linaza mediante calentamiento en base a la metodología de Yong Wang (2011). Utilizando semilla de linaza de proveedor local, lo cual fue sometida a un proceso de cocción en agua, en donde 100 g de semilla de se mezcló en 900 ml de agua destilada con agitación constante (300 rpm) a 90 °C por 30 minutos. Posteriormente el mucílago se filtró con una malla de tamaño 40. El filtrado resultante se secó a una temperatura de 55 °C por 24 horas con agitación constante, finalmente el producto deshidratado se trituró con mortero hasta obtener un polvo.

8.6.2.- Preparación de la nanoemulsión

Para la preparación de 100 ml de la nanoemulsión múltiple (NeM) de tipo W/A/W se llevó a cabo la primera fase que dió lugar a la nanoemulsión simple (NeS) en donde se calentó en un vaso de precipitado 26 g de aceite de coco a una temperatura máxima de 70 °C, una vez líquido se le añadió emulsificante PGPR al 3% y después se le agregó 6 ml de insulina (glargina) disuelta en 0.4 ml de agua desionizada la mezcla se llevó al ULTRA-TURRAX (T-25 basic marca IKA) a 13,500 rpm durante 20 segundos. El producto resultante se pasó por un Nano DeBEE Laboratory Homogenizer (BEE International, South Easton, USA) a una presión de 15,000 psi durante 38 segundos dando como resultado una nanoemulsión (NeS) de tipo W/A libre de mucílago. Para la segunda fase de NeM, la emulsión W/A antes preparada (NeS) se mezcló con el mucílago al 3% a una velocidad de 13,500 rpm durante 1 minuto; la mezcla resultante se pasó por el nanohomogenizador a una presión de 15,000 psi por 1 minuto y 30 segundos. La preparación del mucílago al 3% se realizó disolviendo 2 g de mucílago de linaza en polvo en 38 ml de agua desionizada y se mezclaron a 13,500 rpm/min durante 1 minuto.

8.6.3.- Análisis de tamaño de partículas y polidispersión

Para el análisis de la polidispersión y homogeneidad de la nanoemulsión se utilizó un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instrument Inc., Southborough, MA). Los parámetros

para medir los índices de refracción fueron de 1.44 y 1.33 utilizados para las gotas de emulsión y dispersante (agua y aceite) respectivamente, constante dieléctrica de 2.9 y viscosidad de 80 cp. Para identificar las concentraciones de emulsificante poliglicerol del ácido polirricinoleico (PGPR) más adecuadas, es decir con una menor polidispersión se utilizaron 3 concentraciones de 1, 2 y 3%.

8.6.4.- Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico se define como la técnica que mide la pérdida del peso de una muestra frente al tiempo o la temperatura (40). El análisis se realizó en un TGA TA-Q500 (TA instruments. New castle; Delaware; USA) con rango de temperatura desde los 30 °C a los 600 °C con una rampa de velocidad de 10 °C/minuto en una atmósfera de nitrógeno. La muestra (≈ 1 g) fue colocada en láminas de aluminio con capacidad de 1 g, con una $n= 2$.

8.6.5.- Análisis microestructural

El análisis con microscopía permite observar la estructura de la emulsión (41). Se utilizó un Microscopio de Polarización MOTIC BA-300 (Pol – Luz Polarizada) a un objetivo de 10x y 40x. Un gramo de cada una de las muestras fueron colocadas en un portaobjetos el cual fue cubierto con un cubreobjetos hasta lograr un espesor 0.5 mm.

8.6.6.- Inducción de diabetes en ratas

El manejo de los animales se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (42) y con la aprobación por parte del comité interno en la Facultad de Enfermería y Nutrición de la UASLP. Se utilizó un modelo de Diabetes Mellitus tipo 1 en ratas Wistar macho con peso mayor a 150 g al momento de la inducción de la diabetes. La selección de la cepa se debió a su amplio uso en la investigación relacionada con la Diabetes Mellitus. Según la clasificación de actividades experimentales de acuerdo al grado de invasión, molestia o daño producido sobre los animales de laboratorio este trabajo de investigación se considera de categoría B.

Las ratas se mantuvieron en jaulas individuales de acrílico con libre acceso de agua y 40 g/día de alimento (consumo promedio de alimento por rata al día). Al grupo experimental de ratas se les indujo Diabetes Mellitus mediante la aplicación del agente oxidante para células β , Estreptozotocina (STZ). Se les sometió a un ayuno de 12 horas previo a la aplicación de una dosis intravenosa de STZ de 65 mg/kg de peso diluida en 7 UI de solución salina estéril, mediante la aplicación de una sonda en la arteria caudal. Primero se pinchó en la punta de la cola para tomar una muestra de sangre periférica y analizar glucosa, enseguida se canalizó la arteria caudal y se le administró la dosis de Estreptozotocina. Se hicieron mediciones de peso 6 días a la semana y cada 7 días se realizaron mediciones de glucosa hasta obtener niveles de glucemia >180 mg/dl; después se les administró la emulsión e inyección respectivas a cada grupo experimental, se les tomaron muestras de sangre a los 0, 15, 45, 90 y 140 minutos después de su administración y por último se extrajeron tejidos para su donación a otros trabajos de investigación. Los animales no se expusieron a radiaciones ionizantes ni agentes patógenos, sin embargo, la STZ se considera un producto de toxicidad tipo 3 según la NOM-005-STPS-1998 (43), por lo cual su manejo se realizó acorde a la normativa para proteger la seguridad de los participantes en el estudio.

8.6.7.- Determinación de glucosa en sangre

Se tomaron muestras de sangre, en ayuno de 12 horas, de la vena caudal de las ratas y se analizaran con un glucómetro comercial (Accu-Chek Performa) y tiras reactivas de la misma marca. Considerándose Diabetes Mellitus niveles de glucosa sanguínea >180 mg/dl.

8.6.8.- Preparación de solución fisiológica

Se preparó solución fisiológica para su utilización en la extracción y desecación del tejido a utilizar la cual se elaboró con:

- Solución fisiológica alta en glucosa: 135 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.17 mM MgSO₄, 1.15 mM KH₂PO₄, 1.1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES y 20 mM Dextrosa.

8.6.9.- Administración vía oral de emulsión

La administración de la emulsión con insulina en el modelo animal fue por vía intragástrica, mediante la aplicación de sonda.

8.6.10.- Toma de muestra de sangre.

Después de la administración del tratamiento con la emulsión e inyección respectivamente, se tomaron muestras de sangre (4 – 5 muestras) en diferentes tiempos (0, 15, 45, 90 y 140 minutos) y de aproximadamente una gota para determinar los niveles de glucosa.

8.6.11.- Inducción de eutanasia

La dosis que se utilizó para anestésiar las ratas fue de 130 mg/kg de peso de pentobarbital sódico intraperitoneal en cantidad suficiente para ocasionar eutanasia y una vez obtenido los tejidos de interés, las ratas se sacrificaron, los órganos que no se donaron a otras investigaciones así como los cadáveres se desecharon mediante una compañía especializada en el servicio de desechos RPBI.

8.7.- Recursos Humanos y Materiales

8.7.1.- Recursos Humanos

- Tesista: PLN. Alejandra Rodríguez Fernández
- Director: Dr. Jaime Reyes Hernández
- Co-Director: Dra. Paola Algara Suárez
- Colaborador: MC. Concepción López Padilla

8.7.2.- Recursos Materiales

- | | | |
|---------------------------|------------|--------------------------------|
| - Glucómetro | - Catéter | - Tiras reactivas para glucosa |
| - Material de disección | - Jelcos | - Cinta adhesiva |
| - Jeringas de tuberculina | - Lancetas | - Esponja de gasa |

IX. CONSIDERACIONES ÉTICAS Y LEGALES

En función de que el estudio realizado requirió la experimentación con un modelo animal, se aseguró el manejo más adecuado en cuanto a manipulación, cuidados y método de sacrificio de los animales. El riesgo estimado para la investigación fue de categoría B. Así mismo, se solicitó aprobación por parte al Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Enfermería para la implementación de dicho protocolo.

Las consideraciones éticas y legales se apegaran estrictamente a lo señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (42), apéndices:

- ❖ 4. Disposiciones generales.
- ❖ 4.4. Obtención de animales. Todos los animales se adquirieron conforme a los preceptos jurídicos aplicables tanto a las instituciones como a los particulares que reciben o negocian con animales. Se promovió invariablemente que todas las transacciones que involucren la adquisición de animales se conduzcan legalmente.
- ❖ 4.5. Certificado de salud y calidad
- ❖ 4.5.1. Todos los animales adquiridos por compra, donación o intercambio estuvieron acompañados de documentos que establecieron las condiciones de salud y calidad en que se produjeron, criaron y mantuvieron hasta antes de su embarque o salida del lugar de origen.
- ❖ 4.7. Alimento. El alimento para todas las especies cumplió con las siguientes características: estar libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes, estar dentro de su periodo de caducidad, almacenado en bodegas o cuartos desinfectados, secos y ventilados, sobre tarimas o en contenedores.
- ❖ 5.1.3.1. Alimentación y provisión de agua. El alimento se proporcionó a libre acceso o en forma restringida dependiendo de las necesidades de la cepa y de los procedimientos experimentales. El alimento fue palatable, de una fórmula nutricional constante y certificada en cuanto a su composición. En la tabla 4 se describe la composición general de un alimento para roedores de laboratorio en

base seca para cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactación y mantenimiento. El agua fue potable y se suministró a libre acceso durante toda la vida del animal.

ANIMAL	PROTEINA CRUDA %	GRASA CRUDA %	FIBRA CRUDA %	CENIZAS %	CONSUMO DIARIO DE ALIMENTO	CONSUMO DIARIO DE AGUA	VITAMINA C
Cobayo	17-25	4-11	12-16	7-9	25-30 g	12-15 ml/100 g	0.25-1 mg/g
Jerbo	15-24	4-11	4-6	6-8	10-15 g	3-4 ml	-
Hámster	16-24	4-11	3-6	5-8	7-18 g	8-12 ml	-
Rata	12-24	4-11	3-6	6-8	10-20 g	20-45 ml	-
Ratón	17-24	4-11	3-6	5-7	3-6 g	3-7 ml	-

Tabla 4. Composición bromatológica requerida para un alimento de roedores de laboratorio. NOM-062-ZOO-1999.

- ❖ 5.1.4. Cama y nido. Los roedores alojados en cajas con piso sólido tuvieron el material de cama suficiente que garantizó la absorción de su orina, excremento y desperdicio de agua, favoreció su aislamiento térmico y construcción de nido. Los materiales de cama se seleccionaron por su suavidad, capacidad de absorción, laxitud, ausencia de polvo y fragmentación, así como por la constancia de su calidad, neutralidad química, inercia nutricional y carencia de palatabilidad.
- ❖ 5.1.5. Agrupamiento de animales. Con excepción de las indicaciones justificadas ante el Comité, los roedores se alojaron en grupos, cuyo tamaño estuvo limitado por las especificaciones de espacio del cuadro número 2. En ratones y cobayos no deben alojarse más de un macho con una hembra o varias hembras en reproducción.
- ❖ 5.1.6. Manipulación e inmovilización. Las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización que se realizaron en el bioterio deben estuvieron acordes con los principios humanitarios internacionales aceptados, aprobados por el Comité y supervisadas por el Médico Veterinario responsable.
- ❖ 8.1. Analgesia y anestesia. El animal fue manejado con cuidado, pero con firmeza, procurando la seguridad del personal que lo manipulaba. Se evitó la

lucha y el estrés en todo momento, ya que la excitación prolongada puede alterar la circulación y el estado metabólico del individuo e inducir un estado de choque. Previo a la anestesia los animales se sometieron a un periodo de ayuno suficiente para vaciar el estómago, con el fin de prevenir la regurgitación o aspiración del contenido gástrico. Además, se redujo al mínimo la perturbación emocional, la incomodidad y/o el sufrimiento experimentado por la persona que llevó a cabo el procedimiento.

- ❖ 9. Eutanasia.
- ❖ 9.1. Objetivo: describir los procedimientos empleados para inducir de manera humanitaria la muerte de los animales (eutanasia) empleados en la investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo y durante el procedimiento; para lograrlo cualquier técnica aplicada debe causar en el animal: rápida inconsciencia, paro cardiaco y/o respiratorio y pérdida de la función cerebral.
- ❖ 9.2.2.2. Criterios de elección para métodos de eutanasia. Depende de varios factores, entre los que se destacan la naturaleza del estudio, la especie animal involucrada y su número. Dependiendo de la especie, el procedimiento debe ser individual. Sin importar el tipo de grupo animal destinado para eutanasia se establece que el procedimiento seleccionado debe cumplir invariablemente con lo siguiente: Inducir la muerte sin producir signos de pánico o ansiedad en los sujetos. Inducir la inconsciencia de los animales en un tiempo mínimo. Ser un método confiable y reproducible. Ser seguro para el personal involucrado en su uso. Poseer compatibilidad con los requerimientos y el propósito del estudio. Tener un impacto ambiental mínimo. Ser a prueba de fallas. Localizarse en un sitio apartado de los cuartos de animales.
- ❖ 9.2.2.3. La selección y aplicación del método deben hacerse de acuerdo a los altos principios éticos y de conciencia social.

- ❖ 9.2.3.5. Después de aplicar eutanasia, es imperativo verificar la muerte del animal confirmando la cesación de los signos vitales y otros que, a juicio profesional, se tomen en consideración de acuerdo a la especie y al método de eutanasia empleado.

Principios Éticos Internacionales para Investigación Biomédica con Animales del CIOMS (44):

- El avance del conocimiento, la protección de la salud y/o el bienestar de los hombres y los animales requiere de la experimentación con animales vivos.
- Siempre que sea apropiado usar métodos alternativos (3R's).
- Realizar experimentación en animales después de estudiar su importancia para la salud humana y animal y para el avance del conocimiento biológico.
- Seleccionar animales de especie y calidad apropiadas. Usar el mínimo número requerido para obtener resultados científicamente válidos.
- Tratar a los animales como seres sensibles y considerar imperativo ético el cuidado y uso adecuado, evitando o minimizando las molestias, la angustia y el dolor.
- Presumir siempre que los procedimientos dolorosos para el hombre también causaran dolor en otras especies vertebradas. Procedimientos que pueden causar dolor o angustia momentánea o mínima deben ser realizados con sedación, analgesia o anestesia. No realizar procedimientos quirúrgicos o dolorosos en animales no anestesiados o paralizados con agentes químicos.
- Al final de la experiencia, o en el momento apropiado, los animales que puedan sufrir dolor crónico o severo, angustia, molestia o invalidez, que no puedan ser

aliviados, deben ser sacrificados sin dolor.

- Los animales mantenidos con fines biomédicos, deben tener las mejores condiciones de vida posibles, de preferencia con supervisión de veterinarios con experiencia en ciencia de animales de laboratorio.

Normal Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental. Salud ambiental. Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo (45), apéndices:

- ❖ 4. Clasificación de los residuos peligrosos biológico-infecciosos
- ❖ 4.3. Los patológicos
- ❖ 4.3.3. Los cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.
- ❖ 4.5. Los objetos punzocortantes.
- ❖ 4.5.1. Los que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.
- ❖ 6. Manejo de residuos peligrosos biológico-infecciosos
- ❖ 6.3. Almacenamiento

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FISICO	ENVASADO	COLOR
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo

Tabla 5. Almacenamiento de residuos peligrosos biológico-infecciosos.
NOM-087-ECOL SSA1-2002.

- ❖ 6.3.4. Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C (cuatro grados Celsius), en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas (43), apéndices:

- ❖ 9. Requisitos generales.
- ❖ 9.7. Se deben identificar los recipientes que contengan sustancias químicas peligrosas conforme a lo establecido en la NOM-114-STPS-1994 (46).
- ❖ 9.8 Los recipientes con sustancias químicas peligrosas deben permanecer cerrados mientras no estén en uso.
- ❖ 12. Requisitos de seguridad e higiene para el transporte y almacenamiento de sustancias corrosivas, irritantes o tóxicas
- 12.1 El almacenamiento de sustancias corrosivas, irritantes o tóxicas debe hacerse en recipientes específicos, de materiales compatibles con la sustancia de que se trate.

Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal.

Selección, uso y manejo en los centros de trabajo (47).

CLAVE Y REGION ANATOMICA	CLAVE Y EPP	TIPO DE RIESGO EN FUNCION DE LA ACTIVIDAD DEL TRABAJADOR
2) Ojos y cara	<p>A) Antejos de protección</p> <p>B) Goggles</p> <p>C) Pantalla facial</p> <p>D) Careta para soldador</p> <p>E) Gafas para soldador</p>	<p>A) Riesgo de proyección de partículas o líquidos. En caso de estar expuesto a radiaciones, se utilizan anteojos de protección contra la radiación.</p> <p>B) Riesgo de exposición a vapores o humos que pudieran irritar los ojos o partículas mayores o a alta velocidad.</p> <p>C) Se utiliza también cuando se expone a la proyección de partículas en procesos tales como esmerilado o procesos similares; para proteger ojos y cara.</p> <p>D) Especifico para procesos de soldadura eléctrica.</p> <p>E) Especifico para procesos con soldadura autógena.</p>
4) Aparato respiratorio	<p>A) Respirador contra partículas</p> <p>B) Respirador contra gases y vapores</p> <p>C) Mascarilla desechable</p> <p>D) Equipo de respiración autónomo</p>	<p>En este tipo de productos es importante verificar las recomendaciones o especificaciones de protección del equipo, hecha por el fabricante del producto.</p> <p>A) Protección contra polvos o partículas en el medio ambiente laboral y que representan un riesgo a la salud del trabajador.</p> <p>B) Protección contra gases y vapores. Considerar que hay diferentes tipos de gases y vapores para los cuales aplican también diferentes tipos de respiradores, incluyendo para gases o vapores tóxicos.</p> <p>C) Mascarilla sencilla de protección contra polvos.</p> <p>D) Se utiliza cuando el trabajador entra a espacios confinados o cuando un respirador no proporciona la protección requerida.</p>
5) Extremidades superiores	<p>A) Guantes contra sustancias químicas</p> <p>B) Guantes dieléctricos</p> <p>C) Guantes contra temperaturas extremas</p> <p>D) Guantes</p> <p>E) Mangas</p>	<p>En este tipo de productos es importante verificar las recomendaciones o especificaciones de los diferentes guantes existentes en el mercado, hecha por el fabricante del producto. Su uso depende de los materiales o actividad a desarrollar.</p> <p>A) Riesgo por exposición o contacto con sustancias químicas corrosivas.</p> <p>B) Protección contra descargas eléctricas. Considerar que son diferentes guantes dependiendo de protección contra alta o baja tensión.</p> <p>C) Riesgo por exposición a temperaturas bajas o altas.</p> <p>D) Hay una gran variedad de guantes: tela, carnaza, piel, pvc, látex, entre otros. Dependiendo del tipo de protección que se requiere, actividades expuestas a corte, vidrio, etc.</p> <p>E) Se utilizan cuando es necesario extender la protección de los guantes hasta los brazos.</p>
6) Tronco	<p>A) Mandil contra altas temperaturas</p> <p>B) Mandil contra sustancias químicas</p> <p>C) Overol</p> <p>D) Bata</p> <p>E) Ropa contra sustancias peligrosas</p>	<p>A) Riesgo por exposición a altas temperaturas; cuando se puede tener contacto del cuerpo con algo que esté a alta temperatura.</p> <p>B) Riesgo por exposición a sustancias químicas corrosivas; cuando se puede tener contacto del cuerpo con este tipo de sustancias.</p> <p>C) Extensión de la protección en todo el cuerpo por posible exposición a sustancias o temperaturas. Considerar la facilidad de quitarse la ropa lo más pronto posible, cuando se trata de sustancias corrosivas.</p> <p>D) Protección generalmente usada en laboratorios u hospitales.</p> <p>E) Es un equipo de protección personal que protege cuerpo, cabeza, brazos, piernas pies, cubre y protege completamente el cuerpo humano ante la exposición a sustancias altamente tóxicas o corrosivas.</p>

Tabla 6. Determinación del equipo de protección personal. NOM-017-STPS-2008.

Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos (48).

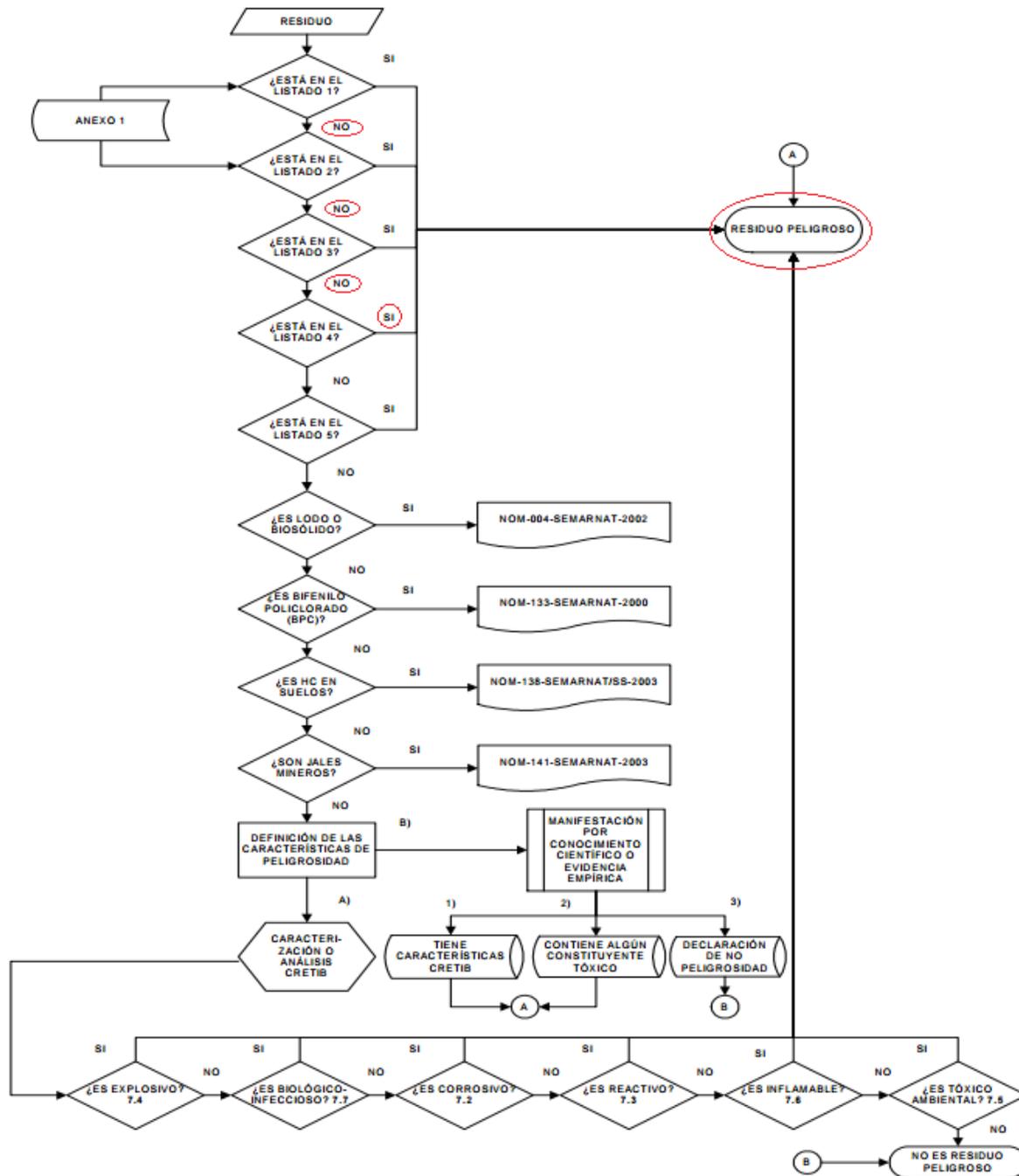


Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento para identificar la peligrosidad de un

residuo. NOM-052-SEMARNAT-2005.

30558-43-1	A2213/Etanimidotiico ácido, 2-(Dimetilamino)-n-hidroxi-2-oxo-, metil éster	(Tt)	T394
75-36-5	Acetilo, cloruro de	(C,R,Tt)	T006
98-86-2	Acetofenona/1-Fenil-etanona	(Tt)	T004
67-64-1	Acetona	(I,Tt)	T002
75-05-8	Acetonitrilo/2-Propanona	(I,Tt)	T003
79-06-1	Acrilamida/2-Propenamida	(Tt)	T007
79-10-7	Acrílico ácido/2-Propenoico ácido	(I,Tt)	T008
107-13-1	Acilonitrilo/2-Propennitrilo	(Tt)	T009
80-15-9	alfa,alfa-Dimetil bencilhidroperóxido	(R,Tt)	T096
134-32-7	alfa-Naftilamina/1-Naftalenamina	(Tt)	T167
61-82-5	Amitrol/1H-1,2,4-Triazol-3-amina	(Tt)	T011
62-53-3	Anilina/Bencenamina	(I,Tt)	T012
492-80-8	Auramina	(Tt)	T014

Tabla 7. Clasificación de residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (tóxicos crónicos). NOM-052-SEMARNAT-2005.

Características	Código de Peligrosidad de los Residuos (CPR)
Corrosividad	C
Reactividad	R
Explosividad	E
Toxicidad	T
Ambiental	Te
Aguda	Th
Crónica	Tt
Inflamabilidad	I
Biológico-Infecioso	B

Tabla 8. Códigos de peligrosidad de los residuos (CPR). NOM-052-SEMARNAT-2005.

X. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1.- Evaluación de la distribución de partículas y el grado de polidispersión en la nanoemulsión

La evaluación de partículas resulta de suma importancia debido a que un análisis del nivel de homogeneidad de las emulsiones y el tamaño de sus unidades es decir sus partículas, nos permitirá definir el nivel de estabilidad de la emulsión así como el impacto en la capacidad de absorción. De acuerdo con algunos autores como Schramm (2005) entre más pequeño sea el tamaño de las partículas/gotas la posibilidad de que estas se absorban en el intestino es mayor. Lo anterior facilitaría la inserción de insulina dentro del torrente sanguíneo para su accionar sobre la glucosa. Por otro lado, la polidispersión indica si existe una mayor o menor variación del tamaño de las partículas dentro de una emulsión, lo que da lugar a la homogeneidad de un sistema. Si la variación del tamaño de partículas es elevada, las partículas de mayor tamaño tienen menores posibilidades de absorción en el intestino, por lo que la cantidad de sustancia o emulsión que se absorba en el intestino será menor; entre menor sea la variación del tamaño de las partículas (polidispersión) mayor homogeneidad habrá dentro de la emulsión, por lo tanto se absorberá una mayor cantidad de la sustancia bioactiva (ej., insulina) (40).

Por otro lado el uso de emulsificante permite la incorporación o interacción entre dos sustancias lipofílicas e hidrofílicas. El PGPR es un emulsificante de tipo poliglicerol, por lo general se utiliza para reducir el valor de rendimiento en la producción de chocolate (49). Tiene la capacidad de disolverse en compuestos polares o no polares ya que es una molécula con “cabeza” hidrófila (afinidad por el agua) y “cola” lipófila (afinidad a los aceites), pero en general, este tipo de emulsificante tiene una mayor afinidad lipófila (50). Utilizar un emulsificante de tipo lipofílico o lipófilo hará formar una emulsión de agua en aceite (W/O), donde el aceite es la fase continua o dispersante (mayor cantidad) y el agua es la fase dispersa o discontinua (menor cantidad), es lo más conveniente ya que tiene la capacidad de mantener una mayor estabilidad debido a su

alta afinidad a compuestos lipofílicos (Garti y Aserin, 1996). En la figura 10 se puede observar que el tamaño promedio de las partículas de la emulsión simple (Ac. de coco-Insulina), varía conforme a la cantidad del emulsificante; con emulsificante PGPR al 1% se obtiene un tamaño promedio de partículas de 791 nm, con 2% un tamaño de 652 nm y con 3% un tamaño de 502 nm. Por lo tanto la concentración de 3% nos proporciona un tamaño más adecuado para facilitar una mayor absorción. Así mismo, el área bajo la curva de la figura 10, en donde se muestra la emulsión simple (NeS) (emulsión libre de mucílago) a diferentes concentraciones de PGPR, nos indica que la polidispersión de la emulsión con concentración de 1% de PGPR es mayor, seguida de la emulsión con 2% de PGPR y por último la emulsión con 3%.

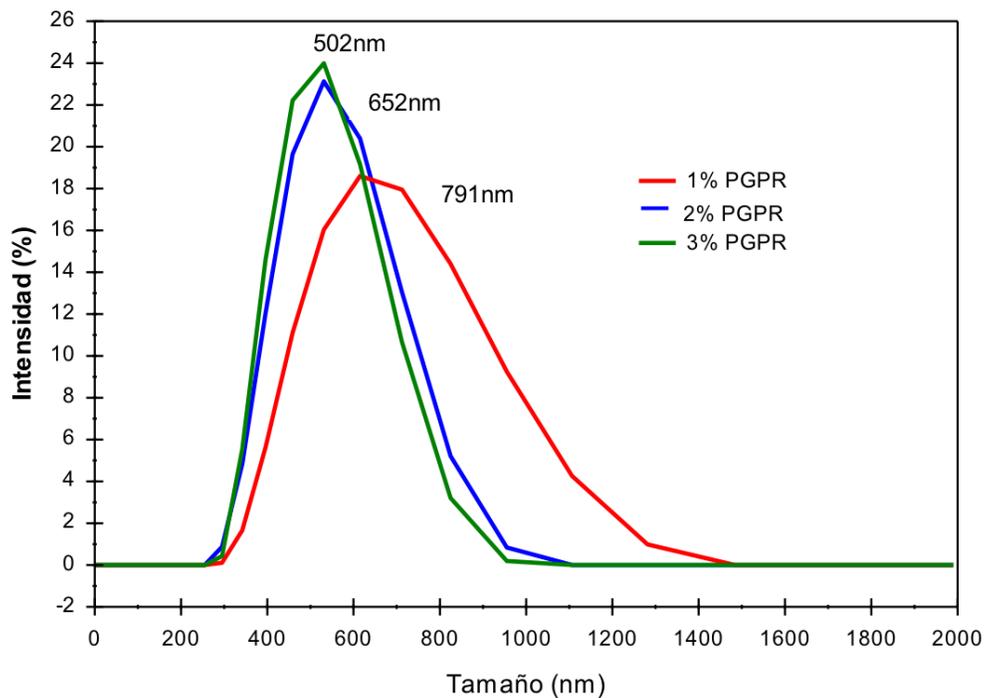


Figura 10. Tamaño de partículas de la emulsión simple (Ac. de coco-Insulina) en diferentes concentraciones de emulsificante PGPR.

Los resultados de la gráfica mostrada en la figura 10 indican que entre mayor sea la concentración de PGPR en la emulsión menor será el tamaño de gota y la polidispersión. McClements y col. (2007) referían que se pueden producir gotas más pequeñas y disminuir la polidispersión en una emulsión al aumentar la intensidad o

duración de la homogenización o aumentando la concentración del emulsificante utilizado. En base a estos resultados para el desarrollo de la emulsión múltiple compuesta por mucílago, aceite de coco e insulina se optó por utilizar una concentración del 3% de emulsificante PGPR en su preparación, ya que entre menor sea el tamaño de las partículas las probabilidades de absorción aumentan. Los resultados pueden ser observados en la figura 11.

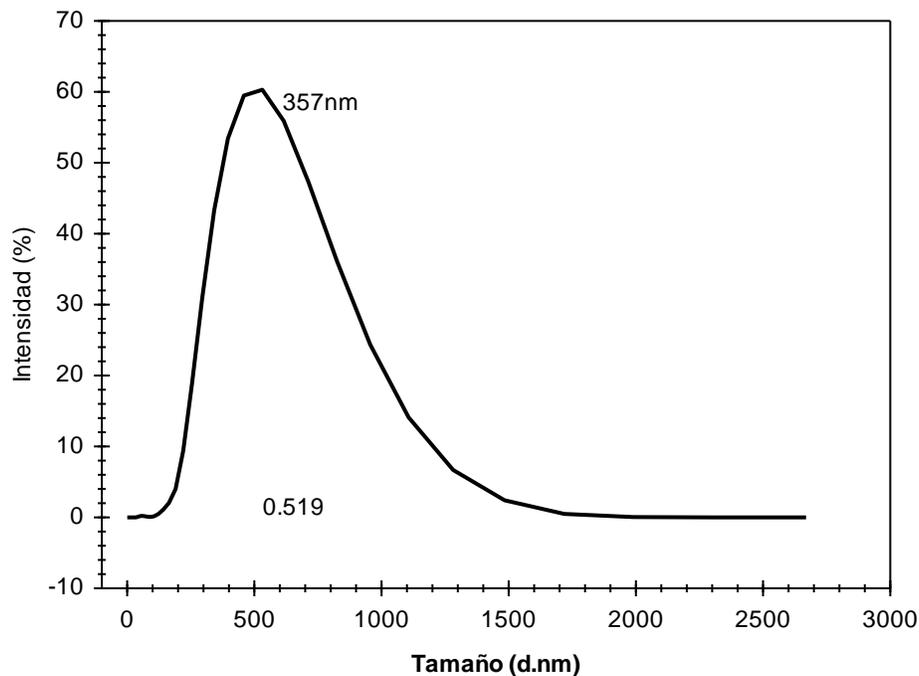


Figura 11. Tamaño de partículas y polidispersión de la emulsión múltiple (Mucílago-Ac. de coco-Emulsificante al 3%-Insulina).

En emulsiones múltiples o dobles de tipo agua en aceite en agua (W/O/W) se recomienda utilizar un emulsificante de tipo lipofílico para la primer fase (W/O) y un emulsificante de tipo hidrofílico para la segunda fase (W/O/W) esto con el fin de evitar romper las gotas formadas y mantener la estabilidad (Kosegarten y Jiménez, 2012), sin embargo, para la preparación de la emulsión múltiple NeM se utilizó solo el emulsificante PGPR para la estabilidad de la primera fase (Ac. de coco-Insulina) y durante la segunda fase de la emulsión, al agregar el mucílago de la linaza, se logró

mantener la estabilización de la emulsión final (NeM) y se dedujo que el mucílago cumplía con las funciones de un emulsificante de tipo hidrofílico.

Zuo y col. (2013) obtuvieron comprimidos de fenofibratos a partir de nanosuspensiones de principio activo, con tamaños de partícula de 606 nm, los perfiles de disolución de estos fenofibratos mostraron un incremento en la velocidad de disolución con la disminución del tamaño de partícula a escalas nanométricas. La figura 11 muestra que el tamaño promedio de las partículas de la emulsión múltiple (NeM) es de 357 nm y que la polidispersión promedio es de 0.519, los cuales son buenos indicadores para que las posibilidades de absorción, de las partículas de NeM se incrementen. Los valores de índice de polidispersividad más cercanos a 0 indican una mayor homogeneidad (Salvia, et. al., 2015). Una ventaja de un tamaño de partículas nanométrico es que poseen una alta adhesividad a las membranas biológicas así como un incremento en la velocidad de disolución permitiendo una disponibilidad casi completa del principio activo disuelto en el sitio de absorción (Xu, et. al., 2012).

10.2.- Análisis termogravimétrico (TGA)

La figura 12 muestra los resultados de termogravimetría de los componentes individuales de la emulsión (NeS y NeM), donde se puede observar que el mucílago de la linaza al 3% se encuentra a una temperatura de degradación de 257 °C, el aceite de coco a una temperatura de 350 °C, el emulsificante (PGPR) a una temperatura de 350 °C y la insulina (glargina) a una temperatura de 159 °C. Aunque no se encontraron estudios sobre termogravimetría de la insulina, Huus y col. (2005) encontraron que en análisis de DSC la insulina aparecía gradualmente a los 100 – 110 °C. Debido a que la temperatura de degradación del agua es menor que la de componentes más estructurados como lo son las proteínas (ej. la insulina), carbohidratos (ej. mucílago de linaza) y lípidos (ej. aceite de coco y emulsificante), en algunas gráficas de la figura 12 (inciso A) mucílago al 3% e inciso D) insulina glargina) y 13 se observa un primer pico, a los 100 °C aproximadamente, que dan lugar al agua.

En NeS y NeM (figura 13 y 14) se puede identificar la presencia de sus componentes que son Ac. de coco-PGPR-Insulina y Mucílago-Ac. de coco-PGPR-Insulina, respectivamente, en comparación con las temperaturas de degradación que se presentan en la figura 12, lo que significa que el proceso de homogenización por presión que se utilizó para su elaboración no afectó de manera directa y cabe destacar que es un buen indicador para garantizar su presencia al momento de la administración en el modelo de diabetes in vivo.

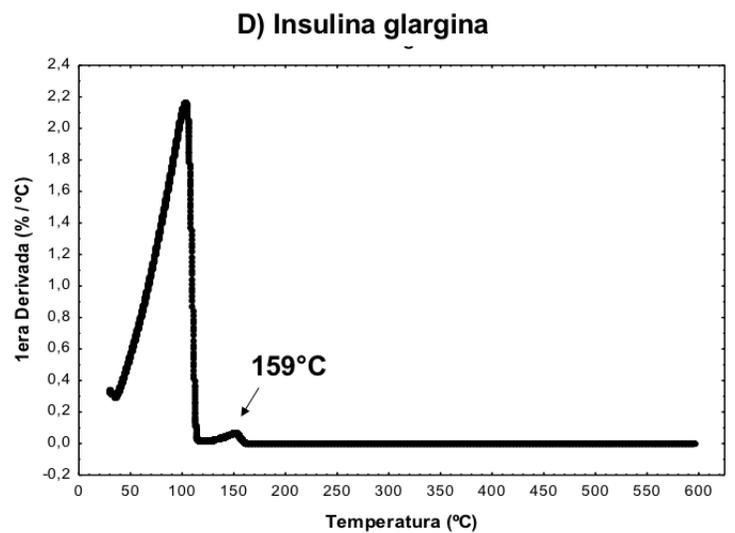
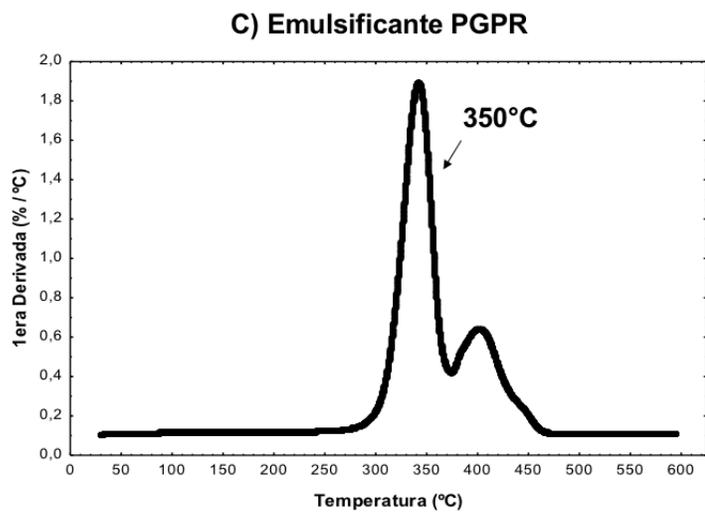
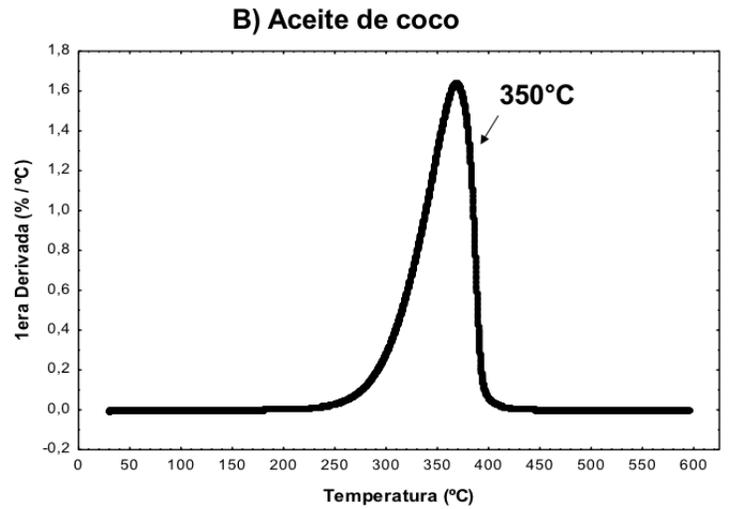
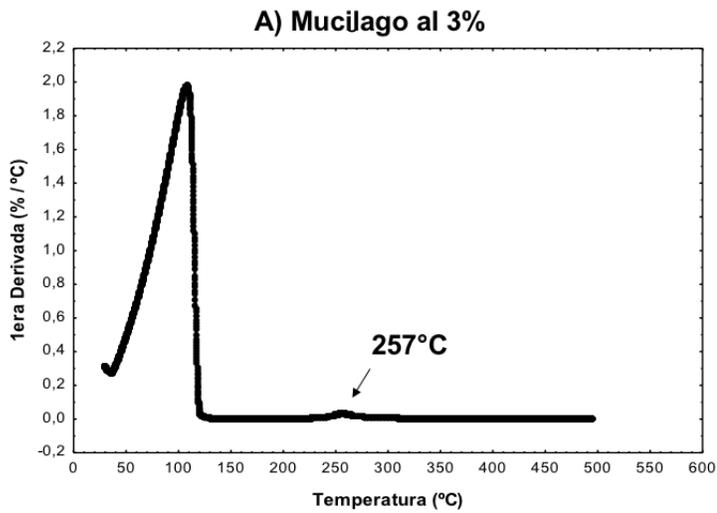


Figura 12. Termogravimetría de los componentes de la emulsión (NeS y NeM). A) Mucilago al 3%. B) Aceite de coco. C) Emulsificante PGPR. D) Insulina glargina.

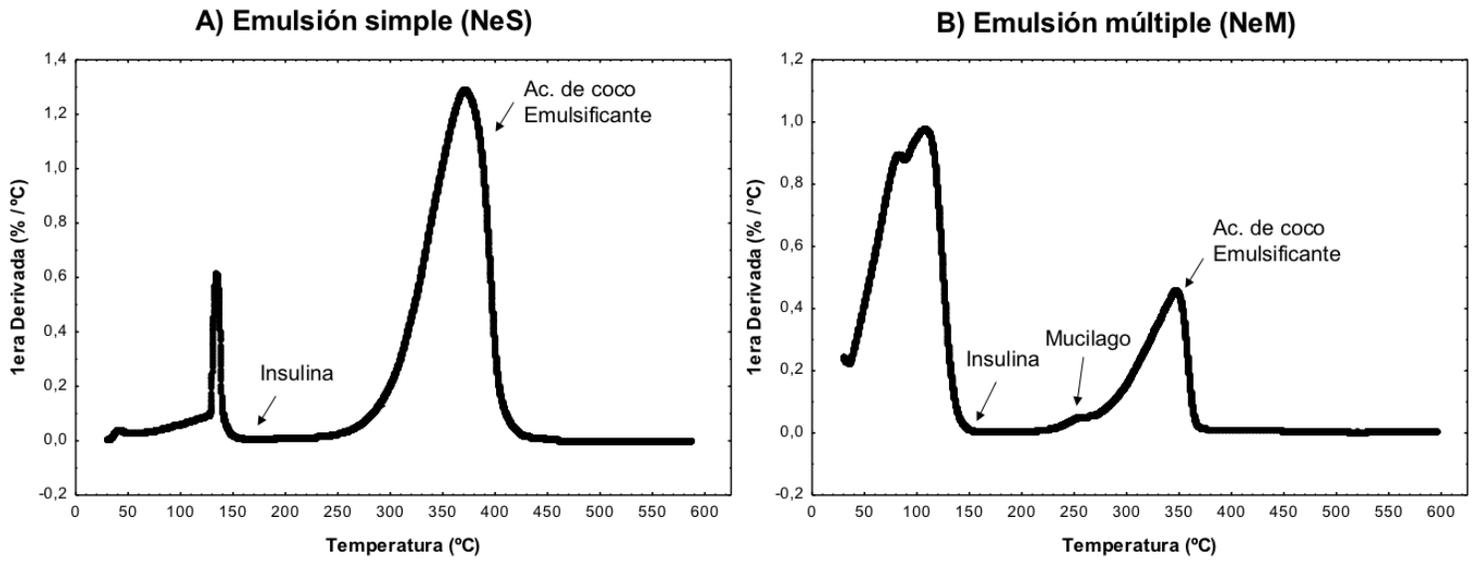


Figura 13. A) Emulsión simple (NeS). B) Emulsión múltiple (NeM). Resultados de Termogravimetría.

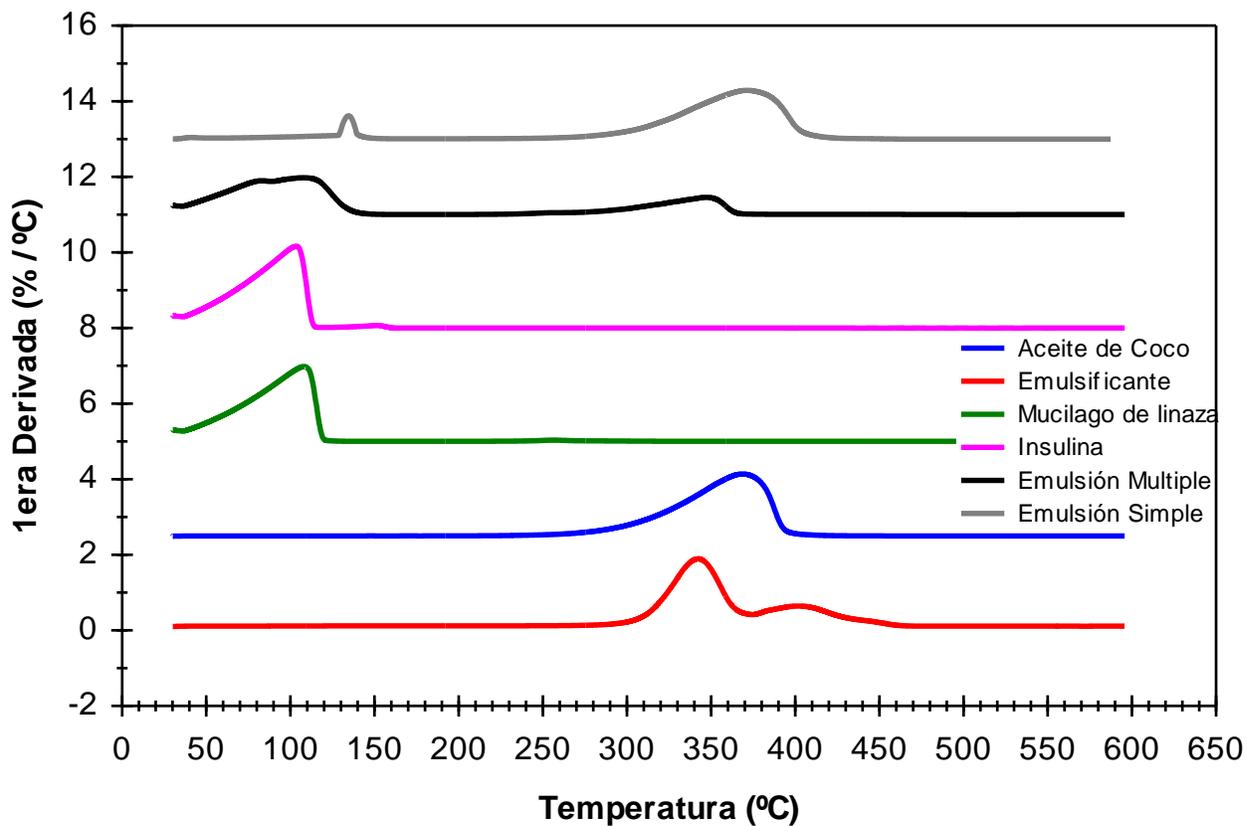


Figura 14. Identificación y comparación de los componentes de la emulsión simple (NeS) y emulsión múltiple (NeM).

En la figura 14 se logra apreciar que en la emulsión simple (NeS) solo existen dos picos prominentes que dan lugar a la insulina (159 °C), el aceite de coco y el emulsificante (350 °C) respectivamente. El aceite de coco y el emulsificante al ser de origen lipídico se logran apreciar a temperaturas similares por lo que en la gráfica solo se observa un pico a los 350 °C. En la emulsión múltiple (NeM) se observa que existen tres picos prominentes que dan lugar a la insulina (159 °C), el mucílago (257 °C), el aceite de coco y el emulsificante (350 °C). El agua se logra apreciar en el primer pico de ambas emulsiones, debido a que su temperatura de degradación es menor en comparación con componentes como las proteínas (ej. insulina), carbohidratos (ej. linaza) y lípidos (ej. aceite de coco y emulsificante PGPR).

10.3.- Análisis microestructural

En la figura 15 se pueden analizar las imágenes al microscopio de la emulsión múltiple (NeM); en donde a un objetivo de 10x se puede observar la homogeneidad de la emulsión al apreciarse una mayor cantidad de gotas del mismo tamaño o diámetro (357 nm). En la imagen a un objetivo de 40x se observan los diferentes tamaños de gota que contienen la emulsión, así mismo se puede observar que, aún que varían los tamaños (diámetro), predominan las gotas con tamaño aproximado de 357 nm.

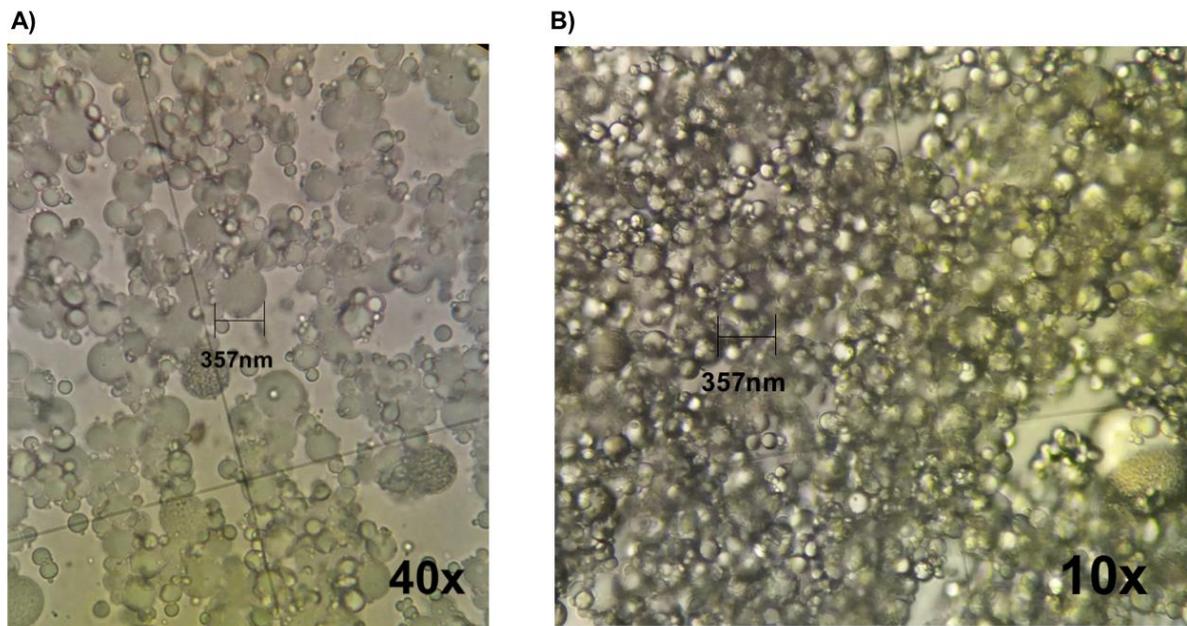


Figura 15. Imágenes al microscopio de la emulsión múltiple. A) a un objetivo de 40x. B) a un objetivo de 10x.

10.4.- Análisis *IN vivo*

Un análisis *in vivo* permite entender el comportamiento de determinada sustancia o compuesto en un organismo vivo. Da a conocer información a mayor detalle y permite ver la factibilidad de su uso en la población, todo esto con el fin de tener un precedente en base a un fundamento científico positivo que indique su posible empleo en el siguiente nivel experimental que sería un análisis en seres humanos con las características requeridas para dicho estudio (31). Para lo anterior se tiene que generar un modelo adecuado para probar los medicamentos o las sustancias bioactivas que se desean probar. Para el presente estudio se generó un modelo de diabetes tipo 1 que permitió evaluar *in vivo* las nanoemulsiones desarrolladas.

10.4.1.- Obtención del modelo de diabetes mellitus tipo 1

Dosis de STZ	Ratas control	Ratas experimentales	
		Emulsión simple	Emulsión múltiple
1 dosis	-	-	6
2 dosis	-	4	4
3 dosis	5	1	-
N=	5	5	10

Tabla 9. Resultados del número de dosis de Estreptozotocina (STZ) al total de ratas, a través de canalización de la arteria caudal.



Figura 16. Inducción de diabetes en rata con STZ por canalización en arteria caudal



Figura 17. Toma de muestra de sangre para la medición de glucosa sanguínea.

En la tabla 9 se presentan el número de dosis de Estreptozotocina (STZ) que se necesitaron para la obtención del modelo de diabetes tipo 1 (figura 17), se puede observar que algunas ratas necesitaron más de una dosis, esto debido a que la respuesta al fármaco puede llegar a variar en cada una de ellas, por ser un organismo vivo único y autónomo. Se observaron signos característicos de la enfermedad como sed intensa y pelaje con coloración amarilla.

	Ratas
Peso (g) del día de llegada	186 ± 16
N=	20
Peso (g) al momento del sacrificio	249 ± 44
N=	20
Glucosa (mg/dl) el día de la inducción	82 ± 12
N=	20
Glucosa (mg/dl) el día de la experimentación	377 ± 114
N=	20

Tabla 10. Resultados de peso (g) al momento de llegada al bioterio, peso (g) al momento del sacrificio, glucosa (mg/dl) del día de la inducción y glucosa (mg/dl) del día de la experimentación del total de las ratas.

En la tabla 10 se muestran los resultados del peso del día de llegada al bioterio y del peso del día del sacrificio del total de las ratas. Se puede apreciar que el total de la muestra presentó un aumento de peso gradual después de la administración de la droga (STZ), sin embargo este resultado parece estar contrapuesto con los resultados de otros estudios como los de Gutiérrez y col. (2000) y Kim y col. (2015). En los reportes de investigaciones similares indican que el efecto esperado para una dosificación de STZ sería que el peso disminuyera a causa de la diabetes, incluso con dieta controlada (aproximadamente 40 g/día de alimento). El dato de reducción en peso solo es un indicativo de presencia de diabetes. Sin embargo la variable con mayor importancia en el estudio es la glucosa sanguínea, y como se observa (tabla 10) todas las ratas presentaron niveles mayores a 180 mg/dl de glucosa sanguínea al momento de iniciar la experimentación. En la figura 18 se observa la manera en que se midió la glucosa sanguínea en el total de la muestra, siendo así, muestreos antes de la inducción de la diabetes (tiempo cero), antes y después (15, 45, 90 y 140 minutos) de la inyección de la insulina y la administración de la emulsión.

	Ratas control	Ratas experimentales		
		Emulsión simple	Emulsión múltiple	
			Dosis 1	Dosis 2
Inicio de la experimentación N=	5	5	10	8
Final de la experimentación N=	5	5	8	7
N=	5	5	7	

Tabla 11. Resultados del total de muestra al final de la experimentación.

El resultado del total de las ratas al final de la experimentación fue de una N=17, como se puede observar en la tabla 11 durante la administración de la emulsión múltiple tres ratas murieron debido a un mala manipulación durante la administración de la emulsión y por el estado de gravedad de la enfermedad.

10.4.2.- Análisis del efecto de dos tipos de nanoemulsiones.

El comportamiento de una inyección intramuscular de 30 UI de insulina glargina (figura 19), en una muestra de 5 ratas, se puede observar que al minuto 45 comienzan a disminuir los niveles de glucosa, seguido de una disminución gradual a los 90 y 140 minutos, esto nos indica que entre el minuto 15 y el minuto 45 es cuando se empiezan a observar efectos positivos (disminución de glucosa) de una inyección de 30 UI de insulina glargina en ratas diabéticas.

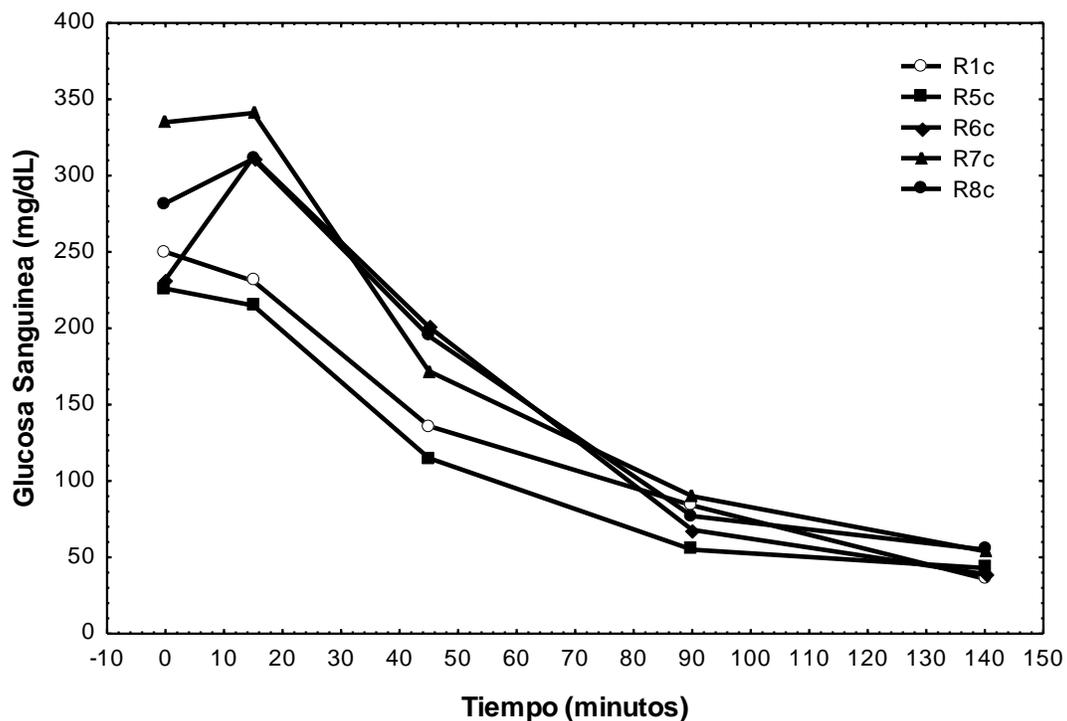


Figura 18. Glucosa sanguínea en ratas diabéticas con inyección intramuscular de 30 UI de insulina glargina, a los 0, 15, 45, 90 y 140 minutos después de su administración.

En estudios previos sobre encapsulación (Michel et. al., 1991), uso de liposomas (Patel y Ryman, 1976) y emulsificación (Matsuzawa et. al., 1995) se encontró que utilizaban entre 100 UI/kg y 20 UI/rata de insulina por muestra, por lo que se optó en utilizar 30 UI de insulina glargina para ver si se podía obtener efectos en la menor cantidad de tiempo posible, así como se desconocía si durante el proceso de homogenización a presión, las altas temperaturas desnaturalizarían el componente proteico, impidiendo así su

función; gracias a los análisis termogravimétricos previos (figuras 13, 14 y 15) se logró identificar la presencia de la insulina en la emulsión (NeS y NeM) previo a su administración oral.



Figura 19. Inyección intramuscular de insulina glargina en ratas control.

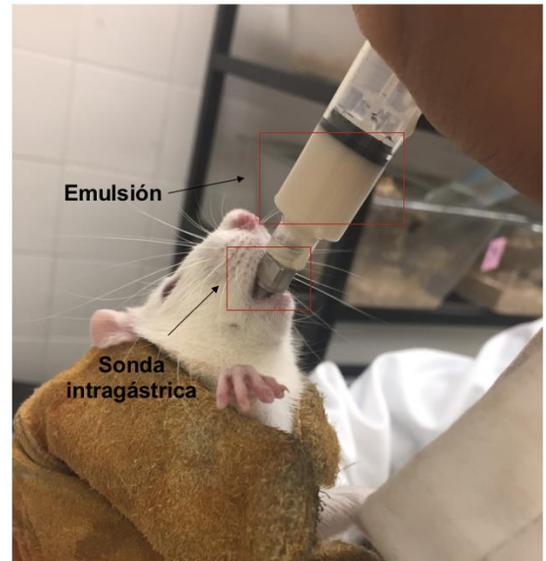


Figura 20. Administración de emulsión (NeS y NeM) en ratas experimentales.

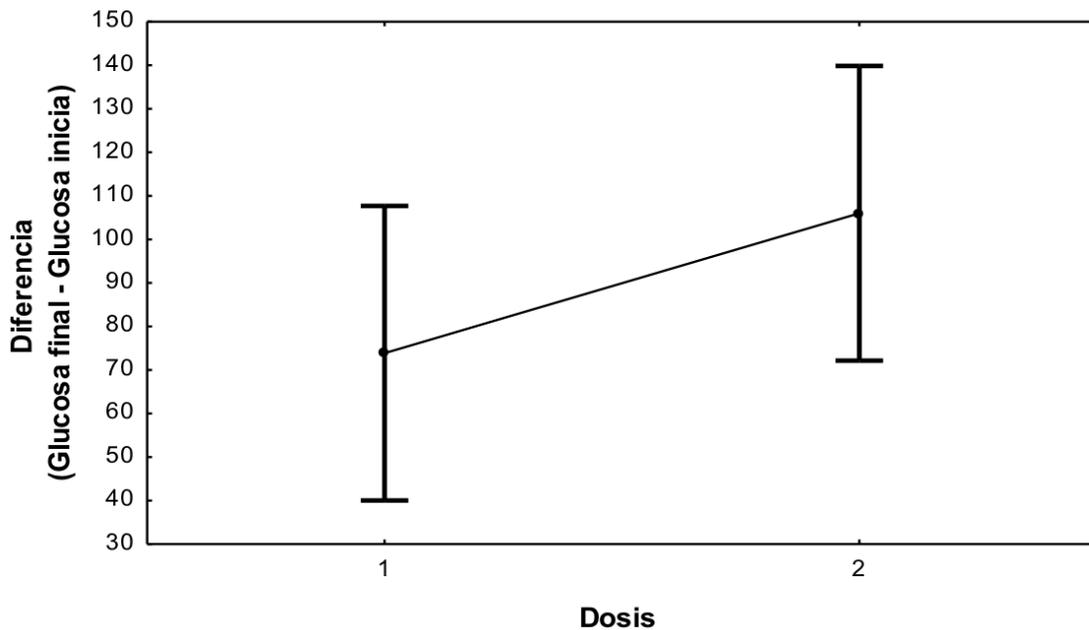


Figura 21. Resultados de la diferencia entre glucosa final (140 minutos) – glucosa inicial (0 minutos) de ratas diabéticas con dosis 1 y 2 de emulsión múltiple (NeM).

	Media	Desviación Estandar	N
Dosis 1	74	101	7
Dosis 2	106	77	7

Tabla 12. Media, desviación estándar y valor de N de las dosis de la emulsión múltiple.

Aunque estadísticamente no existe diferencia significativa ($p=0.51$) entre las dosis, en la figura 21 y tabla 12 (diferencia entre glucosa final menos la glucosa inicial) se puede observar que en una primer dosis de NeM en comparación con una segunda dosis de la misma cantidad (5 ml) existe una mayor disminución de glucosa sanguínea, esto puede deberse a que la segunda dosis se administró una semana después que la primera, cuando la enfermedad ya estaba más avanzada y los niveles de glucosa más elevados; en el tratamiento con insulina las dosis administradas por lo general se fijan en base a la gravedad de la enfermedad, en este caso la cantidad de insulina administrada en la nanoemulsión fue la misma (30 UI) en ambas dosis, por lo que en la segunda dosis posiblemente se necesitara una dosis más alta de insulina debido a lo avanzado de la enfermedad.

En las ratas con disminución de glucosa después de la toma de la muestra (NeM) suponen que la insulina logró traspasar los efectos de la digestión gracias a que el mucílago de la linaza tolera un pH ácido (pH de 2), protegiendo la insulina de la acidez presente en el estómago, y se desnaturaliza a un pH neutro o básico (pH de 7), permitiendo la liberación de la insulina encapsulada por el aceite de coco, en el intestino, así mismo, el aceite de coco favoreció la absorción de la insulina al contener TGCM que son fácilmente absorbidos y digeridos en el intestino (Escott, et. al., 2013).

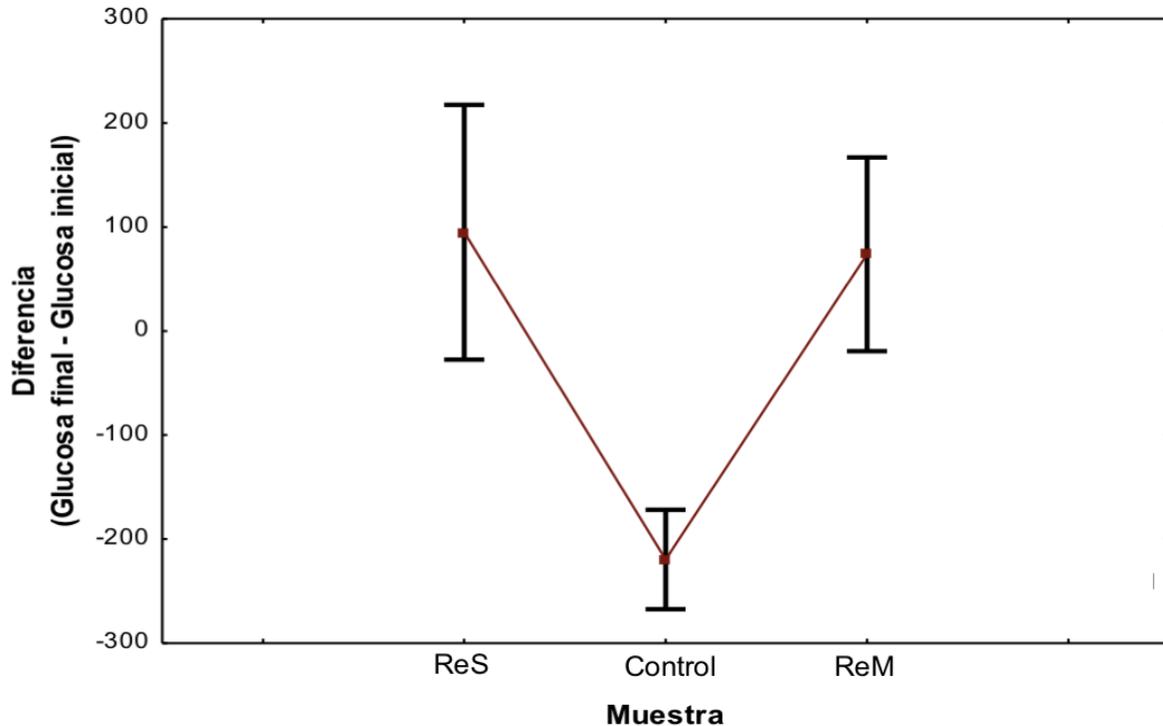


Figura 22. Resultados de la diferencia entre glucosa final (140 minutos) – glucosa Inicial (0 minutos) en ratas diabéticas control, con emulsión simple (ReS) y con emulsión múltiple (ReM).

	Media	Desviación Estandar	N
ReS	95	77	4
Control	-220	38	5
ReM	74	101	7

Tabla 13. Media, desviación estándar y valor de N de grupos ReS, control y ReM.

En los resultados (figura 22 y tabla 13) de la administración en ratas diabéticas ReS y ReM en comparación con las ratas diabéticas control (inyección de 30 UI de insulina glargina) se observó que no existe efecto en la disminución de glucosa sanguínea en ratas con emulsión múltiple y emulsión simple, debido a que $p = <0.001$ entre el grupo control y los grupos experimentales (ReS y ReM) en el análisis de la prueba de comparaciones múltiples de Turke's. Sin embargo, si existe diferencia, aunque no significativa, en la disminución de los niveles de glucosa entre ReS y ReM. Algunos de

los factores que durante la experimentación pudieron afectar son; en la emulsión simple (NeS) puede deberse a la ausencia del mucílago de la linaza en la preparación, que es administrado en la emulsión múltiple para cumplir la función de protección en su paso por la acidez presente en el estómago, lo que refiere que gran parte de la insulina fuera desnaturalizada en su paso por el sistema gastrointestinal. En la emulsión múltiple (NeM) es posible que la dosis de insulina no fuera la suficiente debido a que, al momento de la administración de la emulsión, los pesos (g) de las ratas eran variados y superiores a su peso inicial debido al efecto de la droga (STZ) sobre su peso; tal vez los tiempos sugeridos para las tomas de muestras sanguíneas no fueron suficientes, ya que solo se tomaron 4 muestras después de la nanoemulsión (NeM) siendo la última a los 140 minutos después de la administración oral; las cantidades o dosis de STZ para la inducción de diabetes pudieran interferir en el efecto de la insulina, se administró en algunas ratas dosis dobles o triples de STZ debido a que no se lograba un efecto glucémico elevado en ellas.

Otros de los posibles factores para que no se llevara a cabo un efecto, es que el mucílago no lograra proteger a la insulina de la acción enzimática (enzimas proteolíticas) presente en el estómago debido a una destrucción de su capa protectora (mucílago de la linaza); la linaza al contener, en su mayoría, carbohidratos es susceptible a sufrir digestión en la cavidad oral, estómago y en su mayoría en intestino delgado (27); o que la insulina al liberarse y absorberse en el intestino delgado, con ayuda del aceite de coco, no lograra separarse del componente que los unía, el emulsificante PGPR, impidiendo así el cumplimiento de sus funciones en el organismo; las proteínas al utilizarse en la preparación de emulsiones genera que el sistema se vuelva altamente complejo, debido a la coalescencia entre las sustancias, ocasiona por el aumento de energía al fusionar las fases, a menos que se establezca una barrera de energía que evite la coalescencia como la adición de moléculas que son parcialmente solubles en ambas fases (ej. emulsificante) aunque en ocasiones la sustancia utilizada puede generar una fuerte unión con el componente proteico (51).

XI. CONCLUSIÓN

Se logró la obtención de una nanoemulsión de tipo W/O/W (NeM) a base de mucílago de linaza, aceite de coco, emulsificante e insulina glargina, en donde se observó que una concentración de emulsificante PGPR al 3% disminuía el tamaño de las partículas y la polidispersión generando una emulsión más homogénea. Durante el desarrollo de la emulsión múltiple (NeM), con la aplicación de mucílago de la linaza se observó que dicho compuesto insinuaba cumplir las funciones de un emulsificante de tipo hidrofílico, al obtener una emulsión homogénea con una polidispersión de 0.519 y un tamaño de partículas de 357 nm. Así mismo, durante el análisis de termogravimetría se logró identificar los componentes individuales de cada emulsión (NeS y NeM) en donde el mucílago se identificó a una temperatura de degradación de 257 °C, el aceite de coco a una temperatura de 350 °C, el emulsificante (PGPR) a una temperatura de 350 °C, y la insulina (glargina) a una temperatura de 159 °C, por lo que las altas temperaturas del proceso de homogenización por presión no eliminaron sus componentes individuales.

En el modelo de diabetes tipo 1 en ratas Wistar, se logró la inducción del 100% de la muestra al momento de la experimentación, con niveles de glucosa sanguínea mayores a los 180 mg/dl, mediante la administración de 60 mg/kg de Estreptozotocina (STZ).

Durante la experimentación se observó que en el grupo control (ratas con inyección intramuscular de 30 UI de insulina glargina) los niveles de glucosa sanguínea disminuían a los 45 minutos después de la inyección insulínica. En la administración de la emulsión simple (NeS) y emulsión múltiple (NeM) no se lograron resultados estadísticamente significativos, sin embargo existe una mayor disminución de glucosa con la administración de NeM así como una mayor disminución de glucosa en una primera dosis de la misma. Algunos factores que podrían estar involucrados en el déficit de la respuesta esperada es el aumento gradual del peso corporal de las ratas después de la administración de la droga, que la dosis de insulina no fuera la suficiente, que el mucílago no lograra proteger la insulina de la acción enzimática del estómago o que la insulina no lograra separarse del emulsificante después de ser absorbida en el intestino.

XII. CONSIDERACIONES Y RECOMENDACIONES

Debido al tiempo con el que se contó en el presente trabajo de investigación, y al presupuesto final, no se logró el cumplimiento del objetivo sobre la evaluación de los niveles de insulina en sangre de las ratas diabéticas, por lo que se recomienda continuar con el trabajo.

Durante la inducción del modelo de diabetes se debe cuidar con mayor rigurosidad la droga (STZ), mantenerla en congelación y cubierta en su totalidad, así como al momento de pesar la dosis y en el momento de su preparación antes de su administración; cuidar que la droga este el menos tiempo en contacto con la luz y a temperatura ambiente. Así como tener criterios de inclusión más rigurosos para tener una muestra lo más homogénea posible.

Se recomienda utilizar una dosis más alta de insulina en la preparación de la nanoemulsión y analizar los niveles de insulina en sangre así como determinar un perfil farmacéutico.

XIII. REFERENCIAS

1. Kaufer-Horwitz M, Pérez-Lizaur AB, Arroyo P. Nutriología Médica. 4th ed. México: Editorial Médica Panamericana S. A. de C. V.; 2015. 668 y 672.
2. Toledo Enriquez D, González Santos AI, Toledano Hernández A, Iglesias Benitez A, Gentile Martínez-Casado J, González Aguilera DJ. Controlador Predictivo para la Infusión Subcutánea de Insulina en un Páncreas Artificial Predictive Controller for the Subcutaneous Infusion of Insulin in an. *Rev Cuba Ciencias Informaticas*. 2015;9(2):81–99.
3. Fernández Fernández I. Actualización en antidiabéticos orales. *Rev del Sist Nac Salud [Internet]*. 2001;25:34–45. Available from: www.msc.es/farmacia/infmedic
4. Chien YW. Human Insulin: Basic Sciences to Therapeutic Uses. 1996;22(8):753–89.
5. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin History , Biochemistry , Physiology and Pharmacology Biosynthesis of Insulin. *Suppl Japi [Internet]*. 2007;55(JULY):19–25. Available from: www.japi.org
6. Silva C, Ribeiro A, Ferreira D. Administração oral de peptídios e proteínas : III . Aplicação à insulina. 2003;39.
7. Warrand J, Michaud P, Picton L, Muller G, Courtois B, Ralainirina R, et al. Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L . seeds mucilage. *Int J Biol Macromol [Internet]*. 2005;35:121–5. Available from: www.elsevier.com/locate/ijbiomac
8. Organización Mundial de la Salud. Informe Mundial sobre Diabetes [Internet]. 2016. p. 1–4. Available from: www.who.int/diabetes/global-report
9. Shamah Levy T, Cuevas Nasu L, Rivera Dommarco J, Hernández Ávila M. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino . México; 2016. p. 46–54.
10. Rojas R, Jiménez A, Barquera S, Campos Nonato I, Guriérrez JP, Hernández Barrera L. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados por entidad federativa: Diabetes [Internet]. San Luís Potosí; 2013. Available from: encuestas.insp.mx
11. International Diabetes Federation [Internet]. 2015. Available from:

- <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/que-es-la-diabetes>
12. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades no transmisibles [Internet]. 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
 13. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010. Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. México: Diario Oficial de la Federación; 2010.
 14. Huus K, Havelund S, Olsen HB, Frokjaer S. Thermal Dissociation and Unfolding of Insulin. *Am Chem Soc.* 2005;44(33):11171–7.
 15. R. Ferrier D. Bioquímica. 6th ed. A. Harvey R, editor. España: Wolters Kluwer Health; 2014. 173-219, 307-313 p.
 16. González Ortiz M, Martínez Abundis E. Las insulinas. *Rev Investig en Salud* [Internet]. 2001;3(99):62–5. Available from: www.redalyc.org
 17. McClements DJ. Food Emulsions Principles, Practices, and Techniques Second Edition. 2nd ed. M. Clydesdale F, editor. CRC Press; 2005.
 18. G. Brennan J. Manual del procesado de los alimentos. 1st ed. G. Brennan J, editor. España: Acribia S. A.; 2008. 527-530 p.
 19. Márquez AL, Palazolo GG, Wagner JR. Water in oil (w / o) and double (w / o / w) emulsions prepared with spans : microstructure , stability , and rheology. 2007;352:1119–28.
 20. Atkins P, Jones L. Principios de Química: Los caminos del descubrimiento. 5th ed. Freeman WH, editor. New York: Editoria Medica Panamericana S. A. C. F.; 2010. 770 p.
 21. Malviya R, Srivastava P, Kulkarni GT. Applications of Mucilages in Drug Delivery - A Review Department of Pharmaceutical Technology , Meerut Institute of Engineering and Technology , Maratha Mandal College of Pharmacy , Belgaum , Karnataka. *Adv Biol Res.* 2011;5(1):1–7.
 22. Chen H, Xu S, Wang Z. Gelation properties of flaxseed gum. *J Food Eng* [Internet]. 2006;77:295–303. Available from: www.sciencedirect.com/locate/jfoodeng
 23. Basu S, Bandyopadhyay AK. Characterization of mucoadhesive nasal gels containing midazolam hydrochloride prepared from *Linum usitatissimum* L . mucilage. *Brazilian J Pharm Sci.* 2011;47(4):817–23.

24. Chung MWY, Lei B, Li-Chan ECY. Food Chemistry Isolation and structural characterization of the major protein fraction from NorMan flaxseed (*Linum usitatissimum* L .). Food Chem [Internet]. 2005;90:271–9. Available from: www.elsevier.com/locate/foodehem
25. Natera A, García MC, Muñoz J, Alfaro MC. Rheological properties and physical stability of ecological emulsions stabilized by a surfactant derived from cocoa oil and high pressure homogenization. 2015;66(September).
26. M. Torres González, O. Angulo Guerrero, R. M. Oliart Ros LAMJ. Efecto de la refinación física sobre la calidad química y sensorial del aceite de coco. Grasas y Aceites. 2009;60(1):96–101.
27. Kathleen Mahan L, Escott-Stump S, L. Raymond J. Krause Dietoterapia. 13th ed. Artozqui Morrás E, editor. Barcelona, España: Elsevier España, S. L.; 2013. 13, 14, 15, 16, 41, 48 p.
28. Kumar PKP, Krishna AGG. Physicochemical characteristics of commercial coconut oils produced in India. Lipid Sci Tradit Foods. 2015;66(1):1–11.
29. Montenegro S, Gayol M del C, Tarrés MC. Aspectos éticos de la investigación con animales. Rev Med Rosario. 2011;77:69–74.
30. Tobergte DR, Curtis S. Código De Nuremberg. J Chem Inf Model. 2013;53(9):1689–99.
31. Helsinki D De. Declaracion de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Asoc Médica Mund [Internet]. 2008;1–8. Available from: <http://www.reumatologia.org.ar/userfiles/file/investigacion-farmaco-clinica/inv clinica faltante.doc>
32. Cardozo de Martínez CA, Mrad de Osorio A, Martínez C. C, Rodríguez Yunta E, Lolas Stepke F. EL ANIMAL COMO SUJETO EXPERIMENTAL ASPECTOS TÉCNICOS Y ÉTICOS. Primera. Chile: CIEB; 2007. 21-22 p.
33. Oppenheim RC, Stewart NF, Gordon L, Patel HM. The Production and Evaluation of Orally Administered Insulin Nanoparticles. Drug Dev Ind Pharm. 1982;8(4):531–46.
34. Damgé C, Michel C, Aprahamian M, Couvreur P, Devissaguet JP.

- NANOCAPSULES AS CARRIERS FOR ORAL PEPTIDE DELIVERY. *J Control Release*. 1990;13:233–9.
35. J. Schilling R, K. Mitra A. Intestinal Mucosal Trasport of Insulin. *Int J Pharm*. 1990;62(1):53–64.
 36. Scott-Moncrief JC, Shao Z, K. Mitra A. Enhancement of Intestinal Insulin Absorption by Bile Salt-Fatty Acid Mixed Micell in Dogs. *Pharm Sci*. 1994;83(10):1465–9.
 37. Matsuzawa A, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin using water-in-oil-in-water emulsion from an enteral loop rats. *Biol Pharm Bull*. 1995;18(12):1718–23.
 38. Siu HHO, Siao CHIH HH, X MINGHAUSHEU. Preparation of Microemulsions Using Polyglycerol Fatty Acid Esters as Surfactant for the Delivery of Protein Drugs. *Pharm Sci*. 1996;85(2):0–5.
 39. Takeuchi H, H. Y, T. N, Hino T, Y. K. Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Pharm Res*. 1996;13(6):896–901.
 40. Schramm LL. *Emulsions , Foams , and Suspensions*. Canadá: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2005. 18-20 p.
 41. Zuo B, Sun Y, Li H, Liu X, Zhai Y, Sun J. Preparation and in vitro / in vivo evaluation of fenofibrate nanocrystals. *Int J Pharm [Internet]*. 2013;455(1–2):267–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.07.021>
 42. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México: Diario Oficial de la Federación; 1999.
 43. Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas. México: Diario Oficial de la Federación; 1998.
 44. Favaloro A. Pautas éticas internacionales para la investigación biomédica en seres humanos. Preparadas por CIOMS en colaboración con la OMS [Internet]. *Index Infectológico*. 2008. p. 1–119. Available from: <http://www.gramonbago.com.uy/imgnoticias/16791.pdf#page=11>

45. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental. Salud ambiental. Residuos peligrosos biológico-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo. México: Diario Oficial de la Federación; 2002.
46. NOM-114-STPS-1994. Sistema para la Identificación y Comunicación de Riesgos para Sustancias Químicas en los Centros de Trabajo. México: Diario Oficial de la Federación; 1994.
47. Norma Oficial Mexicana NOM-017-STPS-2008, Equipo de protección personal. Selección, uso y manejo en los centros de trabajo. México: Diario Oficial de la Federación; 2008.
48. Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos. México: Diario Oficial de la Federación; 2005.
49. C. Chire G, W. Harterl R. EFECTOS DE DIFERENTES EMULSIFICANTES EN EL ATEMPERADO DE CHOCOLATE OSCURO. Cienc Invest. 2010;13(1):14–8.
50. E. Friberg S, Larsson K, Sjoblom J. Food Emulsions. 4th ed. E. Friberg S, Larsson K, Sjoblom J, editors. New York, NY: Marcel Dekker, Inc.; 2004. 300-400 p.
51. Cabra V, Arreguín R, Farres A. Emulsifying properties of proteins. Soc Quim México. 2008;2(2):80–9.

XIV. ANEXOS

Anexo 1.- Carta de no conflictos de interés

San Luis Potosí, S.L.P. a 7 de diciembre del 2016.

A Quien Corresponda:

Por medio de la presente nos permitimos informar que los involucrados en el proyecto: "Evaluación de la liberación de insulina de un sistema de microencapsulados pH sensible a base de mucilago de linaza en modelos animal Wistar". **No tenemos conflicto de interés** en el desarrollo de este proyecto, desde su concepción teórica hasta la divulgación de los resultados encontrados. Acorde a ética se dará el debido crédito a cada uno de los participantes apareciendo en el primer artículo en el siguiente orden: PLN. Alejandra Rodríguez Fernández segundo autor la Dra. Paola Algara Suárez, como tercer autor MC. Concepción López Padilla y como cuarto autor y "corresponding" el Dr. Jaime Reyes Hernández.

Todos tendrán obligaciones éticas con respecto a la publicación de los resultados de la investigación y serán responsables de la integridad y exactitud de los informes, además de aceptar en común acuerdo las normas éticas de entrega de la información, para lo cual será necesario la publicación de los resultados negativos, inconclusos o positivos.

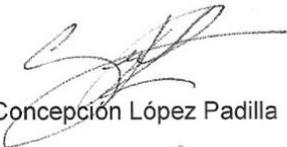
En caso de existir futuras publicaciones será de acuerdo a la contribución que realice cada uno de los involucrados para ir de primer autor, con el consentimiento previo del autor principal.

En el alcance proyecto no se tiene contemplados desarrollo de patentes, sin embargo en caso de obtener alguna la proporcionalidad quedaría de la siguiente manera. PLN. Alejandra Rodríguez Fernández (20%), Dra. Paola Algara Suárez (20%), MC. Concepción López Padilla (20%), Dr. Jaime Reyes Hernández (30%), U.A.S.L.P. (10%).

El financiamiento de la investigación, las publicaciones u otros productos derivados como manuales, folletos, carteles o trabajos de difusión serán solventados por el responsable del proyecto.

Se acepta estar de acuerdo en lo estipulado en el presente documento:


PLN. Alejandra Rodríguez Fernández


MC. Concepción López Padilla


Dr. Jaime Reyes Hernández


Dra. Paola Algara Suárez

Anexo 2.- Dictámen por parte del comité de ética



EVALUACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN DE LA UASLP.

Título del proyecto: "Evaluación de la liberación de insulina de un sistema de microencapsulados pH sensible a base de mucilago de linaza en modelos animal Wistar".

Responsable: Alejandra Rodríguez Fernández.

Fecha: 1 marzo 2017.

Criterios	Presente	Ausente	No Aplica	Observaciones
1. Se incluye el título del proyecto.	x			
2. Se mencionan autores, coautores y colaboradores.	x			
3. El protocolo de investigación incluye los elementos mínimos señalados en el anexo 2.	x			
4. Presenta el apartado de consideraciones éticas y legales.	x			
5. Muestra coherencia de los elementos éticos presentados con especificidad y fundamentación al tipo de estudio.	x			
6. Menciona la normatividad nacional e internacional sobre los elementos éticos a desarrollar en el proyecto, desde su estructuración hasta la publicación de resultados.	x			
7. Señala la coherencia de los elementos metodológicos a desarrollar con los aspectos de consideración ética.	x			
8. Presenta carta de consentimiento informado de acuerdo a la especificidad metodológica y riesgo del estudio.	x			
9. Se explicita el apoyo financiero con relación al compromiso de la publicación de los resultados.	x			
10. Presenta la declaración y especificación de la ausencia de conflictos de interés de los miembros del equipo para el desarrollo del proyecto.	x			
11. Aclara los mecanismos de transferencia de los productos de la investigación. (Patente)			x	
12. Especifica los procedimientos para garantizar el derecho de autor en la investigación. (Carta de no conflicto de intereses)	x			



Av. Niño Artillero 130
Zona Universitaria • CP 78240
San Luis Potosí, S.L.P., México
tels. (444) 826 2300
Ext. Recepción 5010 y 5011
Administración 5063
Posgrado 5071
www.uaslp.mx



Dictamen:

Se otorga registro CEIFE-2017-201.

Se le solicita enviar un reporte sobre el avance del proyecto al correo de este comité ceife.uaslp@gmail.com en un plazo de seis meses.

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "D. J. S.", is positioned above the printed text of the committee.

COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
FACULTAD DE ENFERMERÍA Y NUTRICIÓN



Monumento al ratón de laboratorio

Instituto de Citología y Genética (Novosibirsk, Rusia)

Artista: Andrew Kharkevich

Escultor: Alexai Agrikolyansky

“Simboliza la gratitud hacia el animal que la humanidad ha utilizado para estudiar la genética, los mecanismos moleculares y físicos de las enfermedades, así como para el desarrollo de nuevos fármacos.”

Profesor Nikolai Kalchanov