



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco



Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Proyecto Genérico: Diseño y evaluación de formulaciones y servicios farmacéuticos mediante un sistema de aseguramiento de la calidad

Proyecto: “Desarrollo de Perlas de Alginato para Liberación Modificada de Fármacos para el Tratamiento de Diabetes”

Alumna: Vapnik Blancas Valeria

Matrícula: 2183068879

Asesoras

Dra. Perla García Guzmán 44171

Dra. Liliana Schifter Aceves 33389

Lugar de realización: Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
Laboratorio de Control de Calidad (N-107)

Fecha de inicio: 01 de agosto 2022

Fecha de término: 06 de julio 2023

Ciudad de México, a 17 de agosto del 2023

CONTENIDO

<i>Índice de tablas</i>	3
<i>Índice de figuras</i>	4
<i>Índice de ecuaciones</i>	5
<i>Abreviaturas</i>	6
<i>I. Introducción</i>	7
<i>II. Marco teórico</i>	9
Diabetes Mellitus	9
Tratamientos farmacológicos	
Sistemas de liberación modificada	10
Perlas de alginato	11
Gelificación iónica	11
Ventajas y limitaciones como sistema de administración	12
<i>III. Antecedentes</i>	13
<i>IV. Objetivos</i>	13
Objetivo General	13
Objetivos Específicos	14
<i>V. Planteamiento del problema y Justificación</i>	14
<i>VI. Materiales y Métodos</i>	15
Materiales	15
Equipos e instrumentos	15
Metodología	16
Diseño experimental	17
Preparación de curvas de calibración	17
Fabricación de perlas de alginato-GBCM	18
Pruebas de caracterización	20

VII. Resultados y Discusión	24
Curvas de Calibración	24
Caracterización de las perlas de alginato	26
Tamaño y morfología de partícula	27
Capacidad de carga de las perlas	28
Eficiencia de entrapamiento	29
Índice de hinchamiento y erosión.....	30
FTIR	32
DSC	33
Estudios de liberación <i>in vitro</i>	35
Estudios de cinética de liberación	37
VIII. Conclusiones	38
IX. Referencias bibliográficas.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Ventajas y limitaciones de los sistemas de liberación modificada de fármacos....	10
Tabla II: Ventajas y limitaciones de las perlas de alginato de sodio.....	12
Tabla III: Antecedentes sobre ensayos realizados a perlas de alginato-GBCM mediante gelificación iónica.....	13
Tabla IV: Materiales empleados para el desarrollo y caracterización de perlas de alginato-GBCM para liberación modificada.....	15
Tabla V: Matriz de diseño experimental factorial 2^2 y formulaciones para la obtención de perlas de alginato-GBCM.....	17
Tabla VI: Aleatorización para la fabricación de perlas.	19
Tabla VII: Ecuaciones empleadas por <i>DD Solver</i> para los modelos de estudio sobre la cinética de liberación.	24
Tabla VIII: Curvas de calibración de GBCM en diferentes medios.....	25
Tabla IX: Contenido de humedad (%) para cada formulación.....	26
Tabla X: Tamaño promedio de perla para cada formulación.	28
Tabla XI: Capacidad de carga en las perlas de alginato-GBCM.....	29
Tabla XII: Eficiencia de entrapamiento en las perlas de alginato-GBCM.....	29
Tabla XIII: Cinética de liberación acoplada a modelo de orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hixson-Crowell	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Estructura química de la glibenclamida.....	10
Fig. 2: Formación de la “caja de huevo”. Tomado de: Kawaguti y Sato, 2008.	12
Fig. 3: Diagrama de flujo general de la metodología.....	16
Fig. 4: Diagrama de flujo de elaboración de perlas de alginato-GBCM.....	20
Fig. 5: Curvas de calibración de GBCM en diferentes medios.....	26
Fig. 6: Aspecto de las perlas hidratadas tras la fabricación.	27
Fig. 7: Fotografías por microscopía óptica con un aumento de 5x para determinar la morfología de perlas de alginato-GBCM.	28
Fig. 8: Perfil de hinchamiento de perlas de alginato-GBCM en diferentes medios (buffer HCl pH 1.2, buffer de fosfatos pH 7.4 y buffer de fosfatos pH 9.5).	31
Fig. 9: Perfil de erosión de perlas de alginato-GBCM en diferentes medios (buffer HCl pH 1.2, buffer de fosfatos pH 7.4 y buffer de fosfatos pH 9.5).....	32
Fig. 10: FTIR perlas de alginato-GBCM.	33
Fig. 11: Termograma de DSC para perlas de alginato-GBCM.....	34
Fig. 12: Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de perlas de alginato-GBCM en buffer de fosfatos pH 9.5.	35
Fig. 13: Análisis del % de disolución en buffer de fosfatos pH 9.5 a las 12 h como variable de respuesta. a. Diagrama de Pareto estandarizado b. Gráfico de efectos principales.....	36
Fig. 14: Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de perlas de alginato-GBCM en buffer HCl pH 1.2.	36

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 <i>Capacidad de arga</i>	21
Ecuación 2 % <i>EE indirecta</i>	21
Ecuación 3 % <i>EE directa</i>	22
Ecuación 4 % <i>de hinchamiento</i>	22
Ecuación 5 % <i>de erosión</i>	22

ABREVIATURAS

Abreviatura/sigla	Significado
OMS	Organización Mundial de la Salud
USP	Farmacopea de los Estados Unidos
OPS	Organización Panamericana de la Salud
DMT1	Diabetes mellitus tipo I
DMT2	Diabetes mellitus tipo II
GBCM	Glibenclamida
mg	Miligramos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
EtOH	Etanol
API	Principio activo
h	Hora(s)
min	Minuto(s)
R ²	Coefficiente de determinación
AIC	Criterio de información de Akaike

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica en la cual hay una insuficiencia en la secreción de insulina o la hormona no es empleada adecuadamente en el organismo provocando un problema en la regulación de la concentración de glucosa, lo que conlleva a daño en el corazón, los vasos sanguíneos, ojos, riñones y los nervios (OMS, 2021).

Datos reportados por la OMS en 2021 indican que la estadística de personas con diabetes ha ido en aumento provocando que en 1980 los casos reportados fueron 108 millones mientras que la cifra en 2014 aumentó a 422 millones. De manera que la prevalencia aumenta rápidamente a nivel mundial. Sin embargo, no solamente estas cifras del alza de casos resultan de gran preocupación sino la mortalidad que provoca en la población ya sea por la mala alimentación, falta de ejercicio el consumo de tabaco o problemas relacionados al tratamiento. Por ello en la presente investigación se plantea generar un sistema de liberación modificada como una estrategia dirigida en la administración de glibenclamida.

Acorde a la USP 30 (2007) los sistemas de liberación modificadas son formas farmacéuticas en las cuales “se eligen las características de la liberación en el curso de tiempo y/o en la localización para lograr objetivos terapéuticos o de conveniencia que no ofrecen las formas farmacéuticas convencionales”. Por ello se empleará como sistema de liberación prolongada a base de perlas de alginato con la dosis adecuada de glibenclamida para el tratamiento de diabetes mellitus tipo II. Las cuales fueron desarrolladas mediante un diseño de experimentos factorial 2^2 en donde los factores de estudio fueron la concentración de alginato de sodio y cloruro de calcio. Se prepararon las perlas por el método de gelificación iónica. Se realizó la caracterización mediante la determinación del tamaño y morfología por microscopía óptica, mostrando una forma esférica con un tamaño entre 1419.198-1712.777 μm , los datos de FTIR y DSC de las formulaciones presentaron las señales características de las materias primas indicando que no se presenta una interferencia entre los materiales empleados. La capacidad de carga se encontró entre el 1.8 y 3.2% y, la eficiencia de entrapamiento permitió demostrar que entre el 80 al 95% del fármaco es encapsulado demostrando una alta eficiencia de entrapamiento respecto a otros trabajos publicados. Los estudios *in vitro* encontraron que la liberación del fármaco se presenta en mayor grado en buffer alcalino que favorece la solubilidad del fármaco y el hinchamiento de la perla al no presentar restricción por parte del alginato.

Finalmente, el análisis de la cinética de los datos acoplado a los diferentes modelos permitió sugerir que el mejor modelo cinético al que se acoplan los datos es el de Korsmeyer-Peppas que permitiría comprender el efecto de este tras administrarlo, con valores de R^2 entre 0.782 ± 0.324 a 0.978 ± 0.033 y una R^2 ajustada entre 0.563 ± 0.648 a 0.956 ± 0.065 en las 4 formulaciones. Además, el análisis comparando los modelos por medio de AIC de las 4 formulaciones sugiere que el modelo anteriormente mencionado presentaría un mejor acoplamiento de los datos. Finalmente, el análisis con el exponente de liberación (n) sugirió que F1 ($n=1.040$) y F2 ($n=1.481$) presentaron un Super caso II en donde se habla de una relajación y erosión extrema. Mientras que F3 ($n=0.519$) y F4 ($n=0.621$) presentaron un mecanismo no Fickniano que sugiere que la liberación de la GBCM dependerá del hinchamiento y difusión de la matriz.

II. MARCO TEÓRICO

DIABETES MELLITUS

De acuerdo con la OPS (s.f.) la diabetes mellitus, es una enfermedad metabólica crónica en la cual se tienen niveles muy elevados de la glucosa en sangre que a la larga conlleva a daños en el corazón, vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios.

La diabetes está clasificada como tipo I y II. La diabetes tipo I (DMT1) se caracteriza por la producción deficiente de insulina por lo que el tratamiento implica la administración diaria de insulina. Por otro lado, el tipo II (DMT2) es en donde se usa de manera ineficaz (OPS, s.f.) por lo que se cuenta con tratamiento farmacológico que permita mantener niveles óptimos de glucosa como biguanidas, sulfonilureas, glinidas y tazolidinedionas entre otros (Mayo Clinic, 2021).

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

GLIBENCLAMIDA

La glibenclamida o gliburida (GBCM) es una sulfonilurea activa (**Fig. 1**) empleada como tratamiento farmacológico para la DMT2. Es un fármaco que pertenece a la Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS). Este estimula las células β del páncreas ocasionando un aumento en la liberación de insulina preformada ocasionado por la unión de la porción receptora del complejo que está encargada de la regulación de entrada de potasio en la células β . Enfatizando en el mecanismo de acción tras la formación del complejo fármaco-receptor este inhibe la entrada de potasio lo que conlleva a la despolarización de membrana que favorece la entrada del calcio y la liberación de insulina, como resultado la concentración plasmática de glucosa disminuye (Rodríguez, 2013).

La GBCM se encuentra como un fármaco de administración oral, cuya dosis a administrar inicialmente es de 2.5 a 5 mg por día en una sola toma la cual se debe acompañar con alimentos o después de estos, posteriormente se necesita un ajuste acorde al perfil metabólico del paciente para tener una dosis de mantenimiento de 1.5 a 20 mg la cual puede ser

administrada en una o 2 tomas, sin embargo, no se deben exceder los 20 mg diarios (Rodríguez Carranza, 2013).

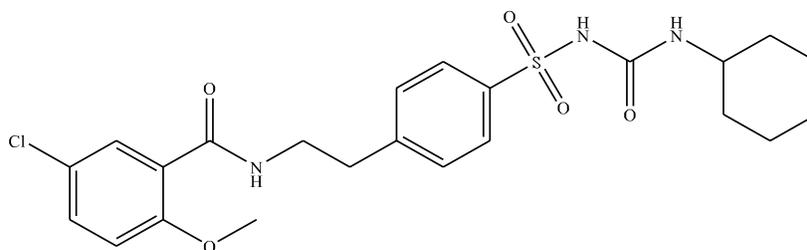


Fig. 1: Estructura química de la glibenclamida.

SISTEMAS DE LIBERACIÓN MODIFICADA

Los sistemas de liberación modificada son formas farmacéuticas diseñadas para que la liberación del fármaco mejore el tiempo y/o sitio de liberación. Existe la liberación prolongada, retardada, de acción repetitiva o lanzamiento dirigido (Allen L. y Ansel H., 2014).

Las ventajas y limitaciones de los sistemas de liberación modificada han sido descritas ampliamente en la literatura por diversos autores, por lo que en la **Tabla I** se resumen algunas de las propiedades descritas por Chang y Robinson, 1990, Collet y Moreton, 2002, Berrozpe y Ferrer, 1997.

TABLA I: Ventajas y limitaciones de los sistemas de liberación modificada de fármacos.

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Reducción de las fluctuaciones del nivel de fármaco en la sangre • Reducción en la dosis o la frecuencia de administración • Mejora la adherencia de los pacientes al tratamiento (relacionado a la comodidad) • Reducción de los efectos adversos • Posible mejora en la selectividad de la actividad farmacológica. • Efecto terapéutico prolongado 	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida de flexibilidad para ajustar la dosis • Riesgo de liberar una dosis alta de fármaco de forma inmediata por una falla del sistema • Riesgo de acumulación

PERLAS DE ALGINATO

Las perlas de alginato son un sistema de administración de fármacos formados por partículas esféricas de un tamaño entre 50 nm y 2 mm (Bidgar *et al.*, 2021) formadas por alginato que es un polímero biodegradable natural, además de presentar como ventajas una producción barata y no tóxica (Ortiz-Romero *et al.*, 2021) que en los últimos años ha resultado de gran interés ya que permite transportar el fármaco influyendo en la biocompatibilidad y biodegradabilidad (Charles-Navarro *et al.*, 2010).

Algunas de las propiedades que presenta el alginato es que es ligeramente soluble en agua fría, insoluble en alcohol, soluciones hidroalcohólicas, solventes orgánicos como cloroformo o éter, así como ácidos con pH menor a 3.0, en cuanto a la viscosidad en un disolvente soluble se forma una solución coloidal viscosa cuyo valor es de 20 a 400 centipoise al 1% a 200 °C y posee propiedades bioadhesivas (Bidgar *et al.* 2021).

Para la formación de las perlas se parte de una característica que presenta el alginato que es su capacidad de funcionar como gelificante cuando se tienen cationes divalentes (Charles-Navarro *et al.*, 2010), siendo uno de los métodos más empleados para la fabricación de perlas de alginato, ya que permite la producción de perlas de mayor dureza y tensión superficial gracias a su peso molecular (Ortiz-Romero *et al.*, 2021), sin embargo, no es el único método que se puede emplear, también se puede realizar por medio del método de gelificación de emulsiones, y reticulación por emulsión (Bidgar *et al.*, 2021).

GELIFICACIÓN IÓNICA

Para poder llevar a cabo la formación de las perlas mediante gelificación iónica es necesario que las unidades de ácido β -D-manurónico (M) y α -L-gulorónico (G) que forman regiones de bloques M y bloques G, así como bloques de secuencias alternas (MG) del alginato tengan afinidad con un catión divalente el cual deberá ser más fuerte para los isómeros G para que se presente una disposición esférica de los átomos, de manera que dos monómeros G forman una "caja de huevo" en donde Ca^{2+} se asienta y reticula 2 cadenas de polímero (**Fig. 2**) (Ortiz-Romero *et al.*, 2021).

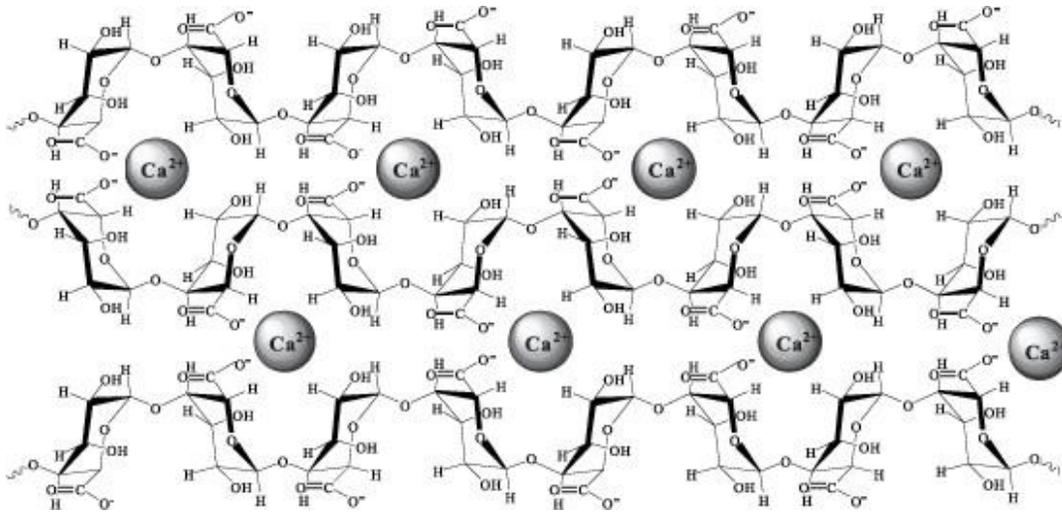


FIG. 2: Formación de la “caja de huevo”. Tomado de: Kawaguti Y Sato, 2008.

VENTAJAS Y LIMITACIONES COMO SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN

Bidgar *et al.* (2021) describen algunas de las ventajas y de las limitaciones que presentan las perlas de alginato de sodio como sistema de administración (**Tabla II**).

TABLA II: Ventajas y limitaciones de las perlas de alginato de sodio.

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> • Presenta propiedades farmacocinéticas ideales • Mejora la capacidad de llegar al sitio donde debe actuar • Permite una menor variación en dosis mínimas en la combinación de API's • Permite tener una administración de dosis más efectiva • Brinda protección al principio activo para dar una mejor compatibilidad • Permite dar una acción prolongada • Disminuye la frecuencia de dosificación • Mejora la constancia de consumo • Reduce los efectos secundarios 	<ul style="list-style-type: none"> • Su costo de producción puede ser elevado • El uso de polímeros sintéticos genera un impacto ambiental • La reproducibilidad durante la fabricación es mínima • Se producen sustancias de degradación de las unidades de repetición

III. ANTECEDENTES

En la **Tabla III** se reportan algunos de los estudios que se han dado en los últimos años en donde se desarrolló y evaluó la generación de perlas de alginato-GBCM mediante gelificación iónica como un sistema de liberación controlada con mejoras en la biodisponibilidad del fármaco.

TABLA III: Antecedentes sobre ensayos realizados a perlas de alginato -GBCM mediante gelificación iónica.

Antecedente	Referencia
• Formulación y evaluación de perlas empleando 8 tratamientos con diferente concentración de alginato de sodio, quitosano y CaCl ₂	• Mane Deshmukh y Barthate (2017)
• Realizó una recopilación de todo lo que se necesita conocer para formular perlas de alginato para liberación modificada	• Bidgar <i>et al.</i> (2021)
• Describe la forma para evaluar sistemas de liberación modificada de GBCM	• Venkateswarlu, K., (2017)
• Describe las estrategias que se han desarrollado para mejorar la biodisponibilidad de GBCM empleando sistemas innovadores (nanopartículas, perlas, micro partículas)	• Ahmed <i>et al.</i> (2022)

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y caracterizar un sistema de liberación modificada de glibenclamida a base de perlas de alginato para el tratamiento de diabetes tipo II.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar perlas de alginato de liberación modificada de glibenclamida mediante un diseño experimental factorial 2^2 evaluando la concentración de alginato y cloruro de calcio.
2. Fabricar perlas de alginato-GBCM mediante el método de gelificación iónica.
3. Caracterizar el sistema mediante la determinación del tamaño, morfología, FTIR, DSC, capacidad de carga, eficiencia de entrapamiento, índice de hinchamiento y erosión.
4. Realizar estudios de liberación *in vitro* para determinar el comportamiento de la GBCM en un sistema de liberación modificada a base de perlas de alginato.
5. Evaluar el mecanismo de liberación mediante modelos matemáticos: orden 0, 1° orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hixson-Crowell.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La DMT2 es una enfermedad metabólica crónica (OPS, s.f.) la cual tiene una tasa de morbilidad alta en México y todo el mundo (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2021). El tratamiento farmacológico implica la administración de fármacos como biguanidas, insulina, sulfonilureas, tiazolidinedionas y meglitinidas que son fármacos administrados con una alta dosis y con una frecuencia periódica debido a su vida media corta que conlleva a que se presenten mayor cantidad de efectos adversos que pueden ser tolerables, generar mayores riesgos de hospitalización o desarrollar otras complicaciones médicas por lo que se debe tener una revisión periódica de la dosificación para un posible ajuste que no comprometa más la salud del paciente (Goodarzi y Petrov, 2023). En los últimos años se han estudiado los sistemas de liberación modificada a base de perlas de biopolímeros los cuales permiten una reducción de los efectos adversos, mejora en la biodisponibilidad y reducción en la frecuencia de dosis al modificar los sitios y velocidad de liberación del fármaco (Nayak y Hasnain, 2020). Por ello se propone el desarrollo de un sistema de liberación modificada a base de perlas de alginato como estrategia para modificar la velocidad de liberación de la glibenclamida evaluando en estudios *in vitro* que permita una administración por tiempos prolongados.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Con base en la información bibliográfica recabada en los antecedentes se decidió proponer la formulación y preparación de las perlas de alginato para liberación modificada de GBCM para el tratamiento de DMT2.

MATERIALES

En la **Tabla IV** se muestran todos los materiales empleados para la fabricación de las formulaciones planteadas.

TABLA IV: Materiales empleados para el desarrollo y caracterización de perlas de alginato-GBCM para liberación modificada.

Nombre	Proveedor	Lote
Alginato de Sodio	Sigma-Aldrich	#MKBT7870V
Cloruro de Calcio	J. T. Baker	F45337
Agua desionizada	UAM-X	—
Glibenclamida	Sinbiotik	EGAA-B-13-0008
Alcohol etílico absoluto	Meyer	B0916444
	J. T. Baker	9000-62
Cloruro de Potasio	MERCK	206220N
Ácido clorhídrico	MERCK	209296E
Fosfato de potasio monobásico	TECSIQUIM, S.A. DE C.V.	PFM-27-PD
	Meyer	M0320281
Hidróxido de sodio	Meyer	L0218072

EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- Balanza analítica PIONEER™ SEMI-MICRO Modelo PX225D
- Sonicador BRANSON 2800
- Parrilla represa Modelo 1300-B
- Parrilla Molda Agitherm Mod. 53166

- Agitador magnético Corning Stirrer PC-353
- Jeringa de 3 mL con aguja 23G
- Micropipeta 10-1000 μ L
- Horno RIOSSA
- Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer 553 Fast Scan
- Potenciometro Conductronic pH120
- Filtros de membrana de PVDF de 0.45 μ m
- Termobalanza OHAUS MB200
- Microscopio ZEISS Axio Observer
- FTIR- Spectrum two
- Calorímetro NETZSCH DSC 214
- Disolutor Lab India DS 800

METODOLOGÍA

En la **Fig. 3** se observa el diagrama de flujo general para llevar a cabo la presente investigación.

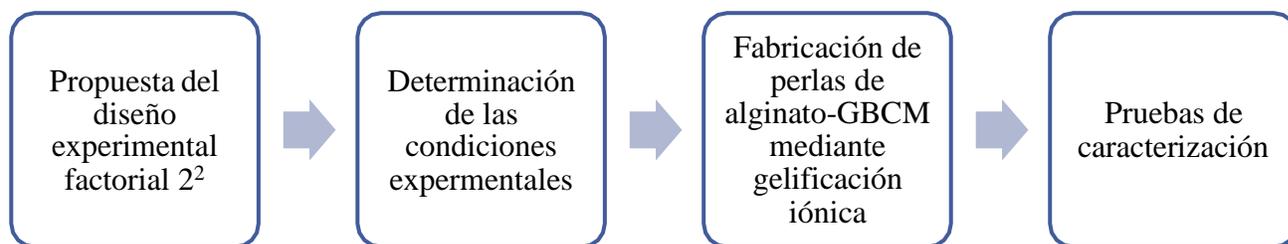


FIG. 3: Diagrama de flujo general de la metodología.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se planteó un diseño experimental factorial 2^2 en el cual se propusieron como factores de estudio la proporción de alginato (%) y CaCl_2 (%) en donde se contaba con un mínimo de alginato de 2% y un máximo de 3%, mientras que para el CaCl_2 su mínimo sería de 1.5% y su máximo de 3%.

En la **Tabla V** se observa la matriz de diseño que se construyó para la obtención de 4 formulaciones, además se describe la composición de cada formulación para las perlas de alginato-GBCM para un sistema de liberación modificada elaborada por triplicado.

TABLA V: Matriz de diseño experimental factorial 2^2 y formulaciones para la obtención de perlas de alginato-GBCM.

Formulación	% de Alginato de Sodio	% Cloruro de Calcio	Tratamiento	GBCM (mg)	Solución de alginato de sodio (%)	Solución de cloruro de calcio (%)
F1	-	-	(1)	100	2	3
F2	+	-	a	100	3	1.5
F3	-	+	b	100	2	1.5
F4	+	+	ab	100	3	3

PREPARACIÓN DE CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se prepararon 4 curvas de calibración con siete puntos, una con agua desionizada, buffer de HCl pH 1.2, buffer de fosfatos pH 7.4 y con buffer de fosfatos pH 9.5, cada una de estas fue realizada por triplicado empleando diferentes concentraciones de GBCM (0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 y 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

CURVA DE CALIBRACIÓN CON AGUA DESIONIZADA

Se preparó una solución stock de GBCM, de 0.1 mg mL^{-1} en EtOH la cual se sonicó durante 20 minutos. A partir de la solución anterior se prepararon las soluciones de trabajo tomando alícuotas para formar soluciones en un rango de 0.5 a 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en agua desionizada. Se realizó la medición en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm.

CURVA DE CALIBRACIÓN CON BUFFER DE ÁCIDO CLORHÍDRICO pH 1.2

Se preparó el buffer de ácido clorhídrico pH= 1.2 acorde a lo establecido por la USP 35-NF 30. Se preparó una solución stock de GBCM, de 0.1 mg mL^{-1} en EtOH la cual se sonicó durante 20 minutos. A partir de la solución anterior se prepararon las soluciones de trabajo, tomando alícuotas para formar soluciones en un rango de 0.5 a $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en buffer de HCl pH 1.2 Se realizó la medición en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm.

CURVA DE CALIBRACIÓN CON BUFFER DE FOSFATOS pH 7.4

Se preparó el buffer de fosfatos pH= 7.4 acorde a lo establecido por la USP 35-NF 30. Se preparó una solución stock de GBCM, de 0.1 mg mL^{-1} en EtOH la cual se sonicó durante 20 minutos. A partir de la solución anterior se prepararon las soluciones de trabajo, tomando alícuotas para formar soluciones en un rango de 0.5 a $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en buffer de fosfatos pH 7.4. Se realizó la medición en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm.

CURVA DE CALIBRACIÓN CON BUFFER DE FOSFATOS pH 9.5

Para la realización de la curva se preparó el buffer de fosfatos pH= 9.5 acorde a lo establecido por la FEUM en la monografía de Tabletas de GBCM. Se preparó una solución stock de GBCM, de 0.1 mg mL^{-1} en EtOH la cual se sonicó durante 20 minutos. A partir de la solución anterior se prepararon las soluciones de trabajo, tomando alícuotas para formar soluciones en un rango de 0.5 a $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ en buffer de fosfatos pH 9.5. Se realizó la medición en un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 230 nm.

FABRICACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO-GBCM

Se utilizó el método de gelificación iónica para la obtención de perlas (Charles-Navarro *et al.*, 2010). Se empleó el software *Statgraphics Centurion XVI* para la aleatorización de la elaboración de las perlas, en donde el orden que se siguió fue el mostrado en la **Tabla VI**.

TABLA VI: Aleatorización para la fabricación de perlas.

Bloque	Alginato de sodio (%)	CaCl ₂ (%)
B1	2	3
B2	3	1.5
B3	2	1.5
B4	3	3
B5	2	3
B6	3	1.5
B7	2	1.5
B8	3	3
B9	2	3
B10	3	1.5
B11	2	1.5
B12	3	3

Se prepararon de manera independiente una solución de 5 mg mL⁻¹ de GBCM en EtOH la cual se sonicó durante 20 minutos, la solución de alginato de sodio de acuerdo con la formulación al igual que 250 mL de solución de cloruro de calcio. La solución de GBCM se adicionó lentamente a la solución de alginato y se mezcló hasta obtener una solución homogénea libre de burbujas. Se colocó la solución de CaCl₂ en agitación magnética y mediante goteo empleando una aguja 23G se dejó caer la solución de alginato-GBCM. Al término de la solución se retiró de la agitación, se dejó en reposo durante 24 h, se decantó, se lavaron las perlas y se colocaron las perlas en charolas para secado a temperatura ambiente durante 72 h. Las perlas una vez secas se despegaron, se pesaron y se almacenaron (**Fig 4**).

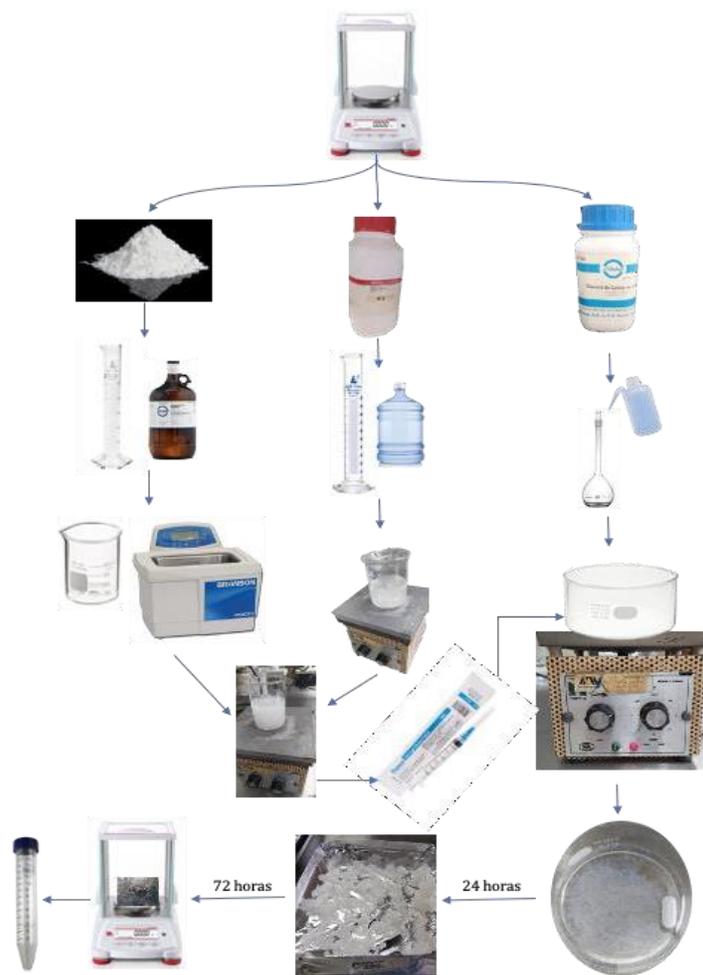


FIG. 4: Diagrama de flujo de elaboración de perlas de alginato-GBCM.

PRUEBAS DE CARACTERIZACIÓN

CONTENIDO DE HUMEDAD

Se determinó en la termobalanza empleando 0.50 g de perlas de cada bloque las cuales fueron sometidas a 100°C/10 min. Se calculó el promedio del contenido de humedad para cada formulación.

TAMAÑO Y MORFOLOGÍA DE PARTÍCULA

Para la determinación del tamaño se sigue la metodología descrita por Kumar Nayar *et al.* (2010) por medio de microscopía óptica, tomando 30 perlas secas de cada formulación. La apertura ocular fue previamente calibrada a micrómetros. Se capturó una fotografía a cada

conjunto de perlas y posteriormente se analizó con el programa *ImageJ* el tamaño de cada perla y se determinó el tamaño promedio.

CAPACIDAD DE CARGA EN LAS PERLAS

Se pesó el equivalente a 10 mg de GBCM de cada una de las formulaciones de perlas, se trituraron en el mortero y se colocaron en un vaso de precipitados en donde se adicionaron 75 mL de buffer de fosfatos pH 9.5. Se colocaron en agitación durante 24 h y transcurrido el tiempo se adicionaron 25 mL de EtOH, se dejaron en agitación durante 1 h y se centrifugaron a 500 rpm durante 1 h. Se tomó el sobrenadante, se filtró con un filtro de membrana de NY de 0.45 μm , se tomaron 400 μL y se diluyeron en 5 mL del medio, se leyó en el espectrofotómetro UV-vis a 230 nm (Modificación de Manna *et al.*, 2022).

Se empleó la **Ecuación 1** para la determinación de la capacidad de carga:

$$\text{ECUACIÓN 1 } \textit{Capacidad de Carga} = \left(\frac{\textit{Masa de GBCM en las perlas}}{\textit{Masa total de perlas}} \right) \times 100$$

EFICIENCIA DE ENTRAMPE

Se determinó la eficiencia de entrampe porcentual (%EE) mediante el método indirecto y directo.

Para el método indirecto se determinó la masa de GBCM no encapsulada por medio de la medición de GBCM en las aguas madres leyendo en el espectrofotómetro UV-vis a 230 nm (Gutiérrez *et al.*, 2022). El %EE indirecto se calculó por medio de la **Ecuación 2**:

$$\text{ECUACIÓN 2 } \% \textit{EE indirecta} = \frac{\textit{Masa teórica de GBCM} - \textit{Masa de GBCM no encapsulada}}{\textit{Masa teórica d GBCM}} \times 100$$

Para el método directo, se determinó empleando buffer de fosfatos pH 7.4 y 9.5. Se pesó el equivalente a 10 mg de GBCM, se trituraron en el mortero y se colocaron en un vaso de precipitados se adicionaron 70 mL de buffer de fosfatos, se colocaron en agitación durante 24 h. Transcurrido el tiempo se adicionó 5 mL de buffer y 25 mL de EtOH y se dejó en agitación durante 1 h. Se centrifugó a 500 rpm durante 1 h. Se tomó el sobrenadante y se filtró con un filtro de membrana de PVDF de 0.22 μm , se tomaron 400 μL de la muestra

filtrada y se diluyeron en 5 mL del medio, se leyó en el espectrofotómetro a 230 nm (Modificación de Manna *et al.*, 2022).

Mediante la **Ecuación 3** se calculó el %EE directa.

$$\text{ECUACIÓN 3 } \% \text{ EE directa} = \frac{\text{Masa de GBCM en las perlas}}{\text{Masa teórica de GBCM}} \times 100$$

ÍNDICE DE HINCHAMIENTO Y EROSIÓN

El índice de hinchamiento se determinó en 3 medios diferentes, buffer HCl pH 1.2 para simular el fluido gástrico, buffer de fosfatos pH 7.4 para simular el fluido intestinal y 9.5 para estudiar el hinchamiento en condiciones correspondientes al método farmacopeico.

Se realizaron experimentos independientes durante 0.5, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16 y 24 h, se pesaron 200 mg de perlas, se añadieron a un volumen de 50mL del medio correspondiente por el tiempo del ensayo. Transcurrido el tiempo se secaron ligeramente con papel filtro para eliminar el exceso de medio, se determinó el peso húmedo, se secaron a temperatura ambiente. y se volvieron a pesar. Una vez que se observaban completamente secas para poder determinar el peso seco. Para la determinación del índice de hinchamiento se empleó la **Ecuación 4** descrita por Mane Deshmukh y Barthate (2017) y para el de erosión la **Ecuación 5**.

ECUACIÓN 4

$$\% \text{ de hinchamiento} = \frac{\text{Peso húmedo de las perlas} - \text{Peso inicial de las perlas}}{\text{Peso inicial de las perlas}} \times 100$$

$$\text{ECUACIÓN 5 } \% \text{ de erosión} = \frac{\text{Peso de las perlas} - \text{Peso seco de las perlas}}{\text{Peso de las perlas}} \times 100$$

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Se analizaron muestras de GBCM, alginato de sodio y cada una de las formulaciones. Se tomaron alrededor de 5 mg de perlas las cuales se trituraron con mortero y pistilo. Las

muestras se leyeron en el FTIR *Spectrum two* a una longitud de 4000 a 400 cm^{-1} (Mane Deshmukh y Barthate, 2017).

ESTUDIO DE CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Se analizaron muestras de GBCM, alginato de sodio y alrededor de 10 mg de perlas trituradas de cada formulación a un rango de 25°C/10.0(K/min)/400°C con una atmósfera de N₂, 40.0 mL/min/ N₂, 60.0 mL/min y el equipo se calibró previamente con estándar de Indio (Modificación de Bidgar *et al.*, 2021).

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Se realizaron perfiles de disolución en un medio ácido (buffer HCl pH=1.2) y alcalino (buffer de fosfatos pH= 9.5 de acuerdo con el método farmacopeico) para simular las condiciones gástricas e intestinales.

Para obtener el perfil de disolución de las perlas de alginato se evaluó empleando el aparato USP 2 (paletas/Lab India DS 8000) por lo que se emplearon 900 mL de buffer HCl 1.2. El medio se mantuvo a una temperatura de 37±0.5 °C, a 50 rpm. Para la prueba se utilizó el equivalente a 5 mg de GBCM en las perlas de alginato. Se tomaron muestras de 5 mL a intervalos de tiempos predefinidos (30,45,60,90 y 120 min), las muestras se filtraron con un filtro de membrana de NY de 0.45 μm , y se leyeron en el espectrofotómetro a 230 nm (Manna *et al.*, 2022).

Por otro lado, cuando se utilizó buffer de fosfatos pH 9.5 se emplearon las mismas condiciones antes mencionadas, pero se modificaron los tiempos de muestreo a 0.5,1,3,5,6,8,10,12, 24 y 30 h. Las muestras fueron centrifugadas durante 35 min a 500 rpm, se filtraron con un filtro de membrana de NY de 0.45 μm , y se leyeron en el espectrofotómetro a 230 nm (Modificación de Mane Deshmukh y Barthate, 2017).

ESTUDIOS DE CINÉTICA DE LIBERACIÓN

Los datos obtenidos en el estudio *in vitro* se acoplaron a los modelos de orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hixson-Crowell empleando *DD Solver* (**Tabla VII**).

TABLA VII: Ecuaciones empleadas por *DD Solver* para los modelos de estudio sobre la cinética de liberación.

Modelo	Ecuación
Cinética de liberación de orden cero	$F = k_0 \cdot t$
Cinética de liberación de primer orden	$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 t})$
Higuchi	$F = k_H \cdot t^{0.5}$
Korsmeyer-Peppas	$F = k_{KP} \cdot t^n$
Hixson-Crowell	$F = 100 \cdot [1 - (k_{HC} \cdot 3)^3]$

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CURVAS DE CALIBRACIÓN

La **Tabla VIII** representa los datos promedio de las 3 mediciones realizadas para la obtención de las curvas de calibración de GBCM en agua desionizada, buffer de HCl pH1.2 y buffer de fosfatos pH 7.4 y 9.5.

TABLA VIII: Curvas de calibración de GBCM en diferentes medios.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia (nm)			
	Agua desionizada (n=3)	Buffer pH=1.2 (n=3)	Buffer pH=7.4 (n=3)	Buffer pH= 9.5 (n=3)
0.500	0.029 \pm 0.009	0.037 \pm 0.002	0.036 \pm 0.005	0.041 \pm 0.010
1.000	0.048 \pm 0.002	0.070 \pm 0.024	0.052 \pm 0.009	0.066 \pm 0.007
2.000	0.246 \pm 0.005	0.198 \pm 0.008	0.085 \pm 0.013	0.096 \pm 0.010
4.000	0.326 \pm 0.010	0.283 \pm 0.019	0.144 \pm 0.034	0.179 \pm 0.010
6.000	0.439 \pm 0.017	0.355 \pm 0.008	0.202 \pm 0.042	0.259 \pm 0.020
8.000	0.528 \pm 0.009	0.420 \pm 0.014	0.264 \pm 0.074	0.342 \pm 0.020
10.000	0.637 \pm 0.027	0.508 \pm 0.023	0.325 \pm 0.085	0.427 \pm 0.017
20.000	1.300 \pm 0.067	1.113 \pm 0.040	0.663 \pm 0.130	0.852 \pm 0.052
30.000	1.920 \pm 0.069	1.644 \pm 0.139	0.912 \pm 0.180	1.233 \pm 0.066

En la **Fig. 5** se muestra la curva de calibración obtenida a partir de los datos promedio de la **Tabla VIII**.

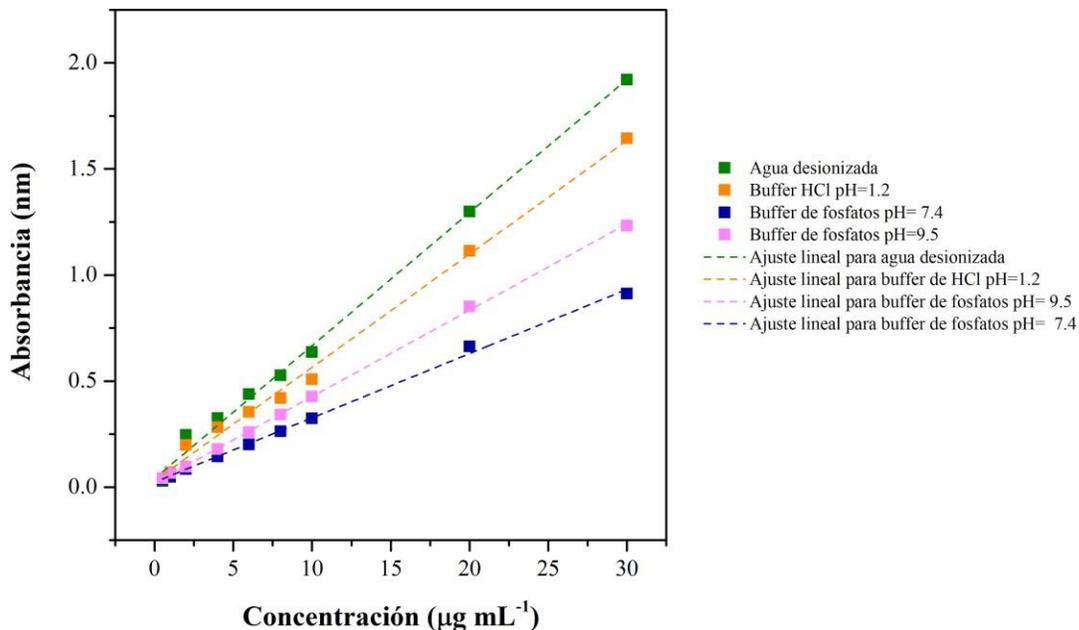


FIG. 5: Curvas de calibración de GBCM en diferentes medios.

CARACTERIZACIÓN DE LAS PERLAS DE ALGINATO

CONTENIDO DE HUMEDAD

El secado a temperatura ambiente permitió una disminución del contenido de humedad de manera progresiva. En la **Tabla IX** se observan los resultados obtenidos tras la cuantificación del % de humedad en cada una de las formulaciones una vez se observó un aspecto seco. F2 y F3 presentan el mismo contenido de humedad mientras que F4 fue la formulación que presentó menor % de humedad y F1 la mayor.

De acuerdo con la literatura, se esperaría que las formulaciones con una mayor concentración de alginato (F2 y F4) presentaran un mayor contenido de humedad ya que el alginato presenta la capacidad de retener agua para poder formar el hidrogel (Ebtessam *et al.*, 2020), sin embargo, no se observó ese comportamiento.

TABLA IX: Contenido de humedad (%) para cada formulación.

Formulación	% humedad (n=3)
F1	13.5 ± 6.353
F2	11.9 ± 1.253
F3	11.9 ± 2.352
F4	11.1 ± 1.015

TAMAÑO Y MORFOLOGÍA DE PARTÍCULA

En la **Fig. 6** se muestra el aspecto final de las perlas hidratadas obtenidas en cada bloque, en donde se observa que poseen una forma esférica, sin embargo, en algunas formulaciones existe la presencia de grandes cúmulos e hilos.

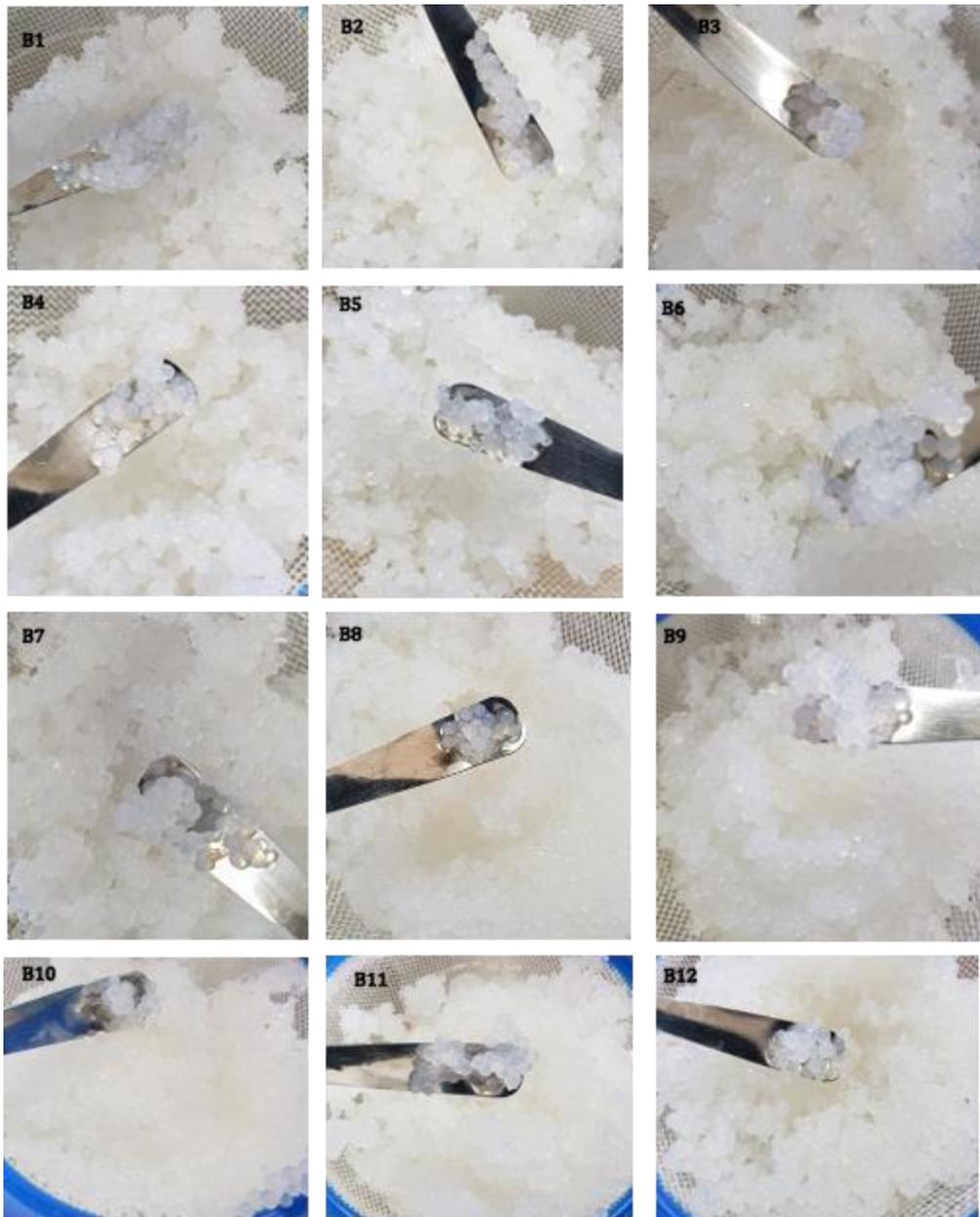


FIG. 6: Aspecto de las perlas hidratadas tras la fabricación.

En la **Tabla X** se observa el tamaño promedio de perla seca para cada formulación.

TABLA X: Tamaño promedio de perla para cada formulación.

Formulación	Tamaño promedio (μm)
F1	1419.198 \pm 532.142
F2	1543.107 \pm 812.484
F3	1712.777 \pm 693.834
F4	1657.004 \pm 629.429

En la **Fig. 7** se aprecia la morfología en las perlas secas, en ella se observa que poseen una superficie un tanto rugosa y F3 presenta la porosidad que formo la perla. Además, F2 y F4 que son las que presentan una alta concentración de alginato son las que presentan una morfología en esfera más uniforme lo que confirma lo descrito por Ortiz-Romero *et al.* (2021) en donde una mayor cantidad de alginato dará resultados más positivos a su morfología. Sin embargo, también es importante mencionar que la forma se debe a la capacidad de entrecruzamiento entre los bloques G del alginato con los cationes divalentes, si se presenta una baja concentración de ambos factores se presenta una morfología achatada ya que no se tiene un equilibrio entre ambos para la formación de la “caja de huevo” (Jui-Jung *et al.*, 2017).



FIG. 7: Fotografías por microscopía óptica con un aumento de 5x para determinar la morfología de perlas de alginato-GBCM.

CAPACIDAD DE CARGA DE LAS PERLAS

En la **Tabla XI** se muestran los resultados obtenidos para cada una de las formulaciones empleando buffer de fosfatos pH 7.4 y 9.5. Estos resultados permiten observar que la formulación 2 y 3 que comparten el mismo porcentaje de CaCl_2 (1.5%) tendrán una capacidad de carga mayor de GBCM independientemente de la concentración del polímero, por lo tanto,

se esperaría que el entrecruzamiento en estas formulaciones permita que el número de enlaces cruzados con el fármaco se presente de una mejor manera ya que aumenta la fuerza de la red de alginato tal y como lo describe Selimoglu, M. y Elibol, M. (2010). También se observa que la capacidad de carga para todas las formulaciones en diferente medio presenta valores bajos los cuales se pueden atribuir a la cantidad de API empleada en la fabricación la cual se adicionó (100 mg) para lograr la dosificación que usualmente suele administrarse la cual es una dosis baja de 2.5 a 5 mg al día (Rodríguez Carranza, 2015).

TABLA XI: Capacidad de carga en las perlas de alginato-GBCM.

Formulación	Capacidad de carga (%) (n=3)	
	pH=7.4	pH=9.5
F1	2.526±0.108	2.176 ± 0.340
F2	2.675±0.169	2.383± 0.613
F3	3.190±0.478	3.234 ± 0.460
F4	1.892 ±0.545	1.960 ± 0.102

EFICIENCIA DE ENTRAMPE

La **Tabla XII** permite observar los resultados para la eficiencia de captura mediante el método directo e indirecto. En el método indirecto se observan que los %EE están por encima del 90%, sin embargo, se observó que los resultados para el método directo se encuentran en un rango del 80 al 90%. Tras analizar por formulación se observó que aquellas que tienen una menor concentración de alginato tienen una mejor EE.

TABLA XII: Eficiencia de entrampe en las perlas de alginato-GBCM.

Formulación	EE promedio método directo (%) (n=3)		EE promedio método indirecto (%) (n=3)
	pH 7.4	pH 9.5	
F1	86.854 ± 3.096	80.147±9.571	94.795 ± 0.790
F2	94.967±6.484	89.440±22.147	98.478 ± 0.341
F3	90.842 ±16.563	90.053±14.777	98.784 ± 0.429
F4	83.003±23.638	89.134±3.781	98.082 ± 1.146

Además, los resultados obtenidos permiten confirmar que los valores obtenidos para el porcentaje de encapsulación se encuentran dentro del rango que describe Ahmed *et al.* (2022) el cual es de 69.57-87.31%, sin embargo, se observa que algunas formulaciones presentaron un %EE superior, lo que permite proponer que las condiciones con las que se llevó a cabo el diseño experimental factorial proporcionan una mejora.

ÍNDICE DE HINCHAMIENTO Y EROSIÓN

La **Fig. 8** permite observar el comportamiento de hinchamiento de las perlas evaluando en los diferentes buffers, aquí se observa que al realizar el análisis con buffer de fosfatos pH 7.4 se tiene un aumento desde los 30 min hasta las 9 h, sin embargo, después viene un decaimiento en el índice de hinchamiento en todas las formulaciones que indica que la matriz llegó a su máxima capacidad de hinchamiento. También, se puede observar que cuando las formulaciones tienen una alta concentración de alginato (3%) presentarán un índice de hinchamiento más alto en comparación a las que se empleó 2%. También se observó que F2 y F4 que emplearon una alta concentración de alginato, tiene una mayor capacidad de hinchamiento lo que indica que los poros formadores de la “caja de huevo” tengan la capacidad de aumentar más de tamaño al presentar un incremento en las fuerzas de los enlaces de la red, independientemente de su concentración la cual formará la matriz biopolimérica (Jui-Jung *et al.*, 2017; Pawar y Edgar, 2012; Nayak *et al.* 2012).

Por otro lado, en el perfil de hinchamiento con buffer HCl pH 1.2 se observó que después de los 30 min todas las formulaciones decaen y posteriormente vuelven a aumentar su índice, sin embargo, no presentan comportamientos semejantes al emplear la concentración más alta de alginato. Finalmente, en el caso del perfil con un pH 9.5 se observa un hinchamiento las primeras 2 h el cual después decae y solamente F2 presentó un crecimiento a las 14 h el cual decae para las 16 h.

Si se compara el buffer de fosfatos a los diferentes pH se podrá observar de manera clara que se presenta un comportamiento sensible a pH, mientras más alcalino sea el medio, su capacidad de hinchamiento será menor. Esto se podrá deber a que ocurre lo descrito por Nayak *et al.* (2012) en la estructura de la “caja de huevo”. De manera normal en la perla

ocurre el intercambio iónico entre los Ca^{2+} que se unen a los grupos carboxílicos del alginato formando la matriz, sin embargo, al estar en contacto con los iones fosfato del medio da como resultado la formación de fosfato de calcio que es el que provoca la turbidez del medio.

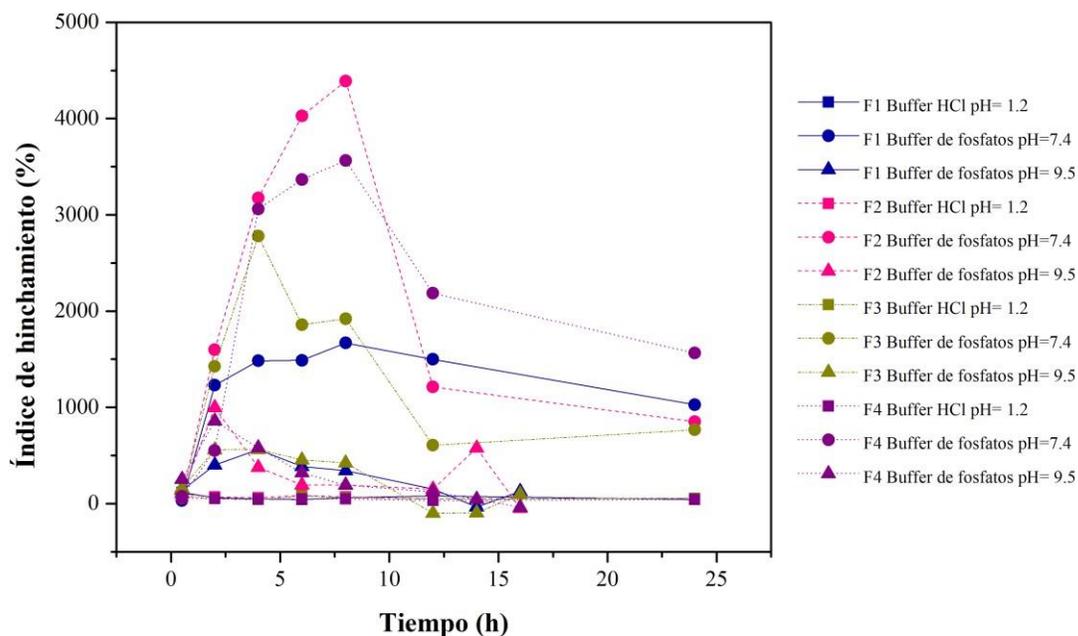


FIG. 8: Perfil de hinchamiento de perlas de alginato-GBCM en diferentes medios (buffer HCl pH 1.2, buffer de fosfatos pH 7.4 y buffer de fosfatos pH 9.5).

En el caso del índice de erosión se esperaba que los iones Ca^{2+} en la estructura de “caja de huevo” comenzaran a difundirse hacia el medio y comenzara a desintegrarse la perla. En la **Fig. 9** se observan los perfiles de erosión para las perlas evaluado en los diferentes buffers. En buffer de HCl pH=1.2 se observó que el índice de erosión de las 4 formulaciones es semejante entre sí al no presentar pendientes tan inclinadas y al llegar a las 8 h el aumento que se observó fue de manera lenta.

Cuando se empleó buffer de fosfatos pH 7.4 se observó que al aumentar el tiempo también aumentaba la erosión de la perla hasta llegar un punto donde el aumento de la erosión no se da en la misma velocidad.

Finalmente, en el caso de los experimentos empleando buffer de fosfatos pH=9.5 se mostró que todas las formulaciones presentan un aumento en su índice de erosión constante.

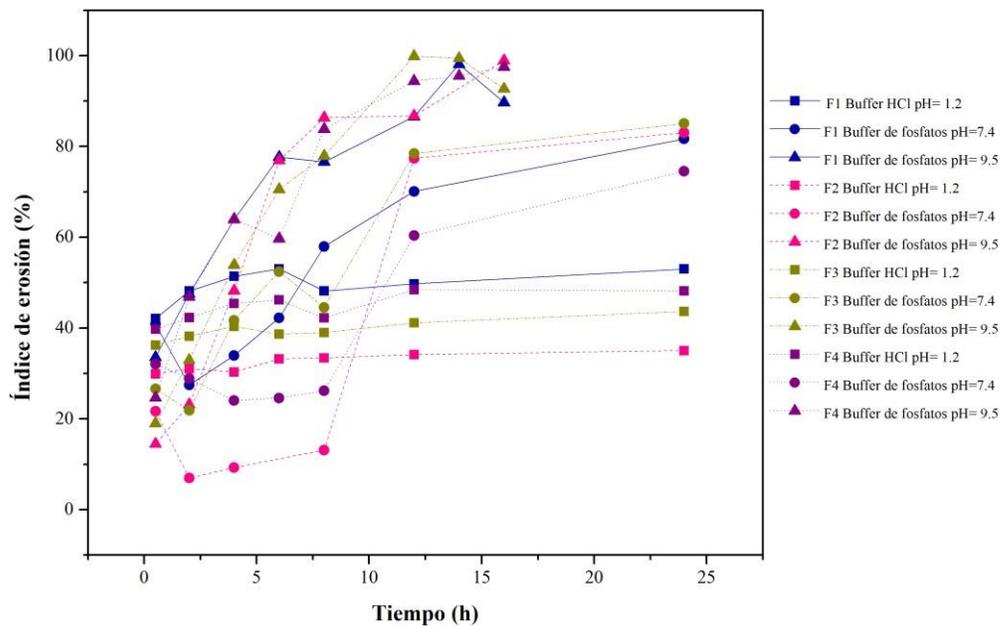


FIG. 9: Perfil de erosión de perlas de alginato-GBCM en diferentes medios (buffer HCl pH 1.2, buffer de fosfatos pH 7.4 y buffer de fosfatos pH 9.5).

Los resultados obtenidos para el índice de hinchamiento y erosión permiten sugerir que la capacidad de hinchamiento de la perla en pH ácido es muy baja para las 4 formulaciones mientras a pH alcalino la perla comenzará a hincharse y erosionarse debido a que la solución de alginato será diluida provocando una viscosidad baja gracias a su solubilidad (Jui-Jung *et al.*, 2017; Pawar y Edgar, 2012).

FTIR

La **Fig. 10** permite visualizar los diagramas obtenidos, en ellos se puede observar que se analizaron las materias primas, API y las 4 formulaciones desarrolladas.

En el caso del *alginato de sodio* se pueden observar cómo bandas características la del estiramiento O-H por encima de 3000 cm^{-1} , una ligera banda ancha alrededor de 2900 cm^{-1} para el grupo-CH₂, dos picos pertenecientes al estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos de la sal carboxílica cerca de los 1600 y 1450 cm^{-1} respectivamente. Finalmente, en

1100 y 1000 cm^{-1} se observan picos correspondientes a la vibración de los enlaces glucosídicos.

En el espectro de la *GBCM* se observan las bandas correspondientes al estiramiento del grupo carbonilo alrededor de 1700-1730 cm^{-1} , además de una pequeña banda para el estiramiento de O-H alrededor de 3250 cm^{-1} , se observa el estiramiento C-H con una banda muy pequeña alrededor de los 2900 cm^{-1} , alrededor de 1250 cm^{-1} se observa la banda correspondiente al estiramiento SO_2 , alrededor de 1050 cm^{-1} se encontraran las bandas correspondientes al estiramiento C-O-C y alrededor de 550-600 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente al estiramiento C-Cl.

En cuanto al análisis de las formulaciones desarrolladas, se observó que F2 y F4 presentan un patrón semejante de bandas que el alginato en una región por encima de los 3000 cm^{-1} , sin embargo, son de mayor amplitud al igual que las bandas en la región de 2300 cm^{-1} .

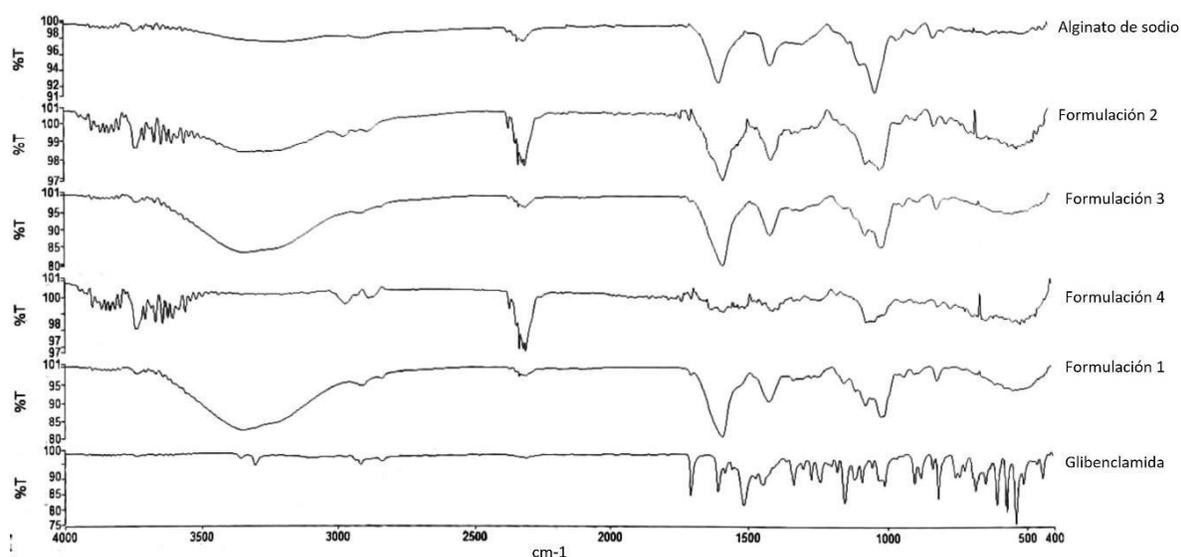


FIG. 10: FTIR perlas de alginato-GBCM.

DSC

En la **Fig. 11** se observa el termograma obtenido tras analizar las materias primas y las perlas de alginato-GBCM en sus diferentes formulaciones.

En el caso del *alginato de sodio* como materia prima se observó un pico ancho que presenta una transición endotérmica a 67.5°C y otro pico que representa una descomposición

exotérmica a 240°C el cual coincide con lo descrito en la literatura y en el estudio por Lupo Pasin *et al.* (2015).

Para la *GBCM* se observó una transición térmica (punto de fusión) a 175.9 °C que es un valor ligeramente superior al reportado en la FEUM el cual es de 169-174°C. También se observan picos que comienzan en 357.3°C que corresponden a una degradación.

Las 4 formulaciones presentan los picos característicos de las materias primas que no presentan interferencia alguna, sin embargo, se puede observar que todas las formulaciones presentan una disminución de altura en el pico que presenta el alginato a 62.7 C. En el caso de F1 y F2 se presenta este pico más alto en comparación con F3 y F4. El pico de descomposición del alginato se observa disminuido y desplazado a la derecha para todas las formulaciones. La disminución de altura y desplazamiento se puede atribuir a la formación de la estructura de “caja de huevo” que permite proponer el grado de entrecruzamiento que presentan. Además, la banda correspondiente al punto de fusión se la *GBCM* se presenta de una menor altura y más anchos que podría deberse al entrecruzamiento que presenta la matriz (Yari *et al.*, 2020).

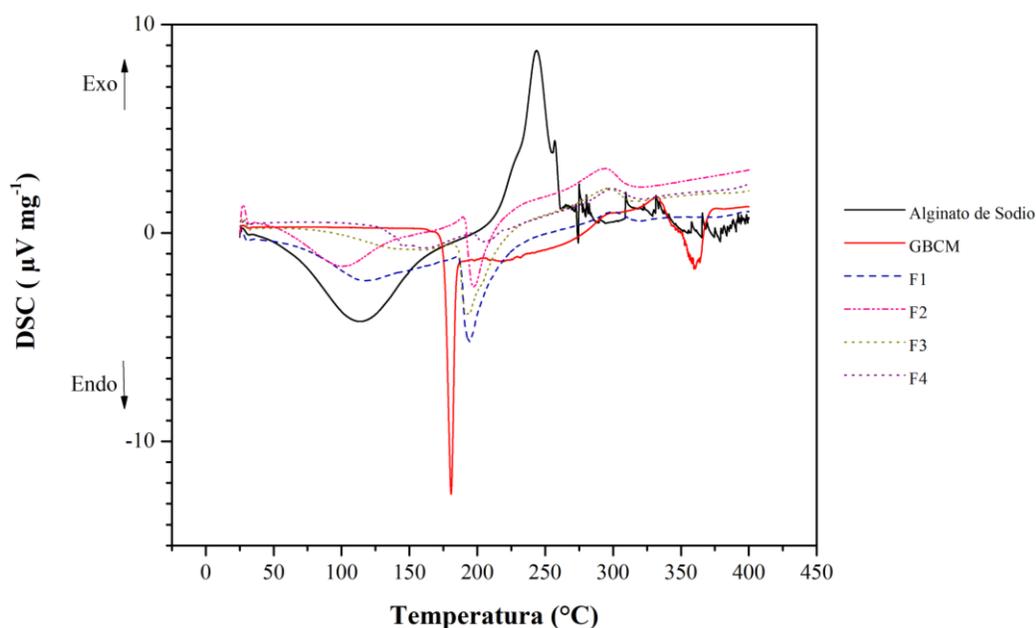


FIG. 11: Termograma de DSC para perlas de alginato-GBCM.

ESTUDIOS DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

En la **Fig. 12** se observan los perfiles de disolución obtenidos para las diferentes formulaciones. En ellos se observa que F1, F2 y F3 presentan una disolución durante 30 h con un porcentaje de disolución semejante entre F2 y F1. También se observó que F4 que presenta los niveles más altos para cada factor presenta una disolución solamente durante 24 h.

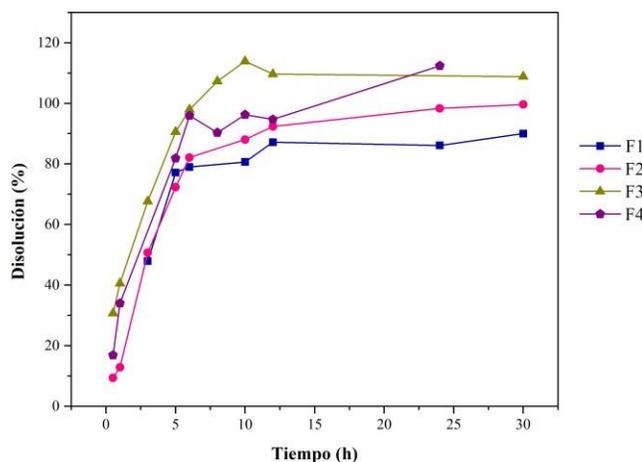


FIG. 12: Perfiles de liberación *in vitro* de perlas de alginato-GBCM en buffer de fosfatos pH 9.5.

Al analizar el % de disolución a las 12 h como variable de respuesta se encontró que los factores de manera individual no presentan un efecto estandarizado estadísticamente significativo sobre el porcentaje de disolución (**Fig. 13a**). También se observó que el efecto principal de ambos factores indica que el aumento en la concentración de estos disminuirá el % de disolución a las 12 h, esto se podrá deber a la integración de los iones fosfato del medio para deformar la estructura de la “caja de huevo” (**Fig. 13b**).

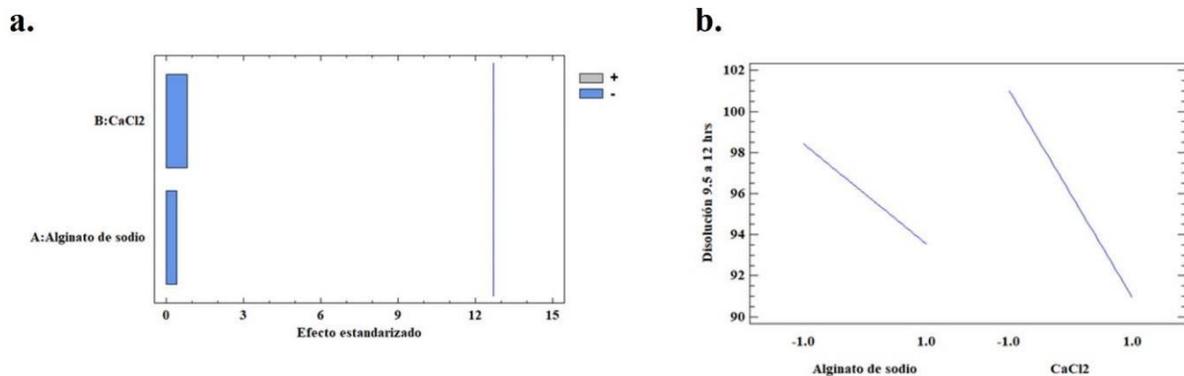


FIG. 13: Análisis del % de disolución en buffer de fosfatos pH 9.5 a las 12 h como variable de respuesta. **a.** Diagrama de Pareto estandarizado **b.** Gráfico de efectos principales

En las pruebas de disolución para simular el medio gástrico empleando buffer de HCl pH 1.2 (**Fig. 14**) se encontró que F1 se encuentra por debajo del límite cuantificable en la curva de calibración realizada lo que es un buen indicador. Por otro lado, se encontró que F2, F3 y F4 presentaron liberación del API en el tiempo del ensayo lo que sugiere que las perlas podrán tener una liberación gastrointestinal, sin embargo, es importante mencionar que la velocidad de liberación de la GBCM en el medio ácido es menor debido a que se tiene un hinchamiento restringido debido a la solubilidad del alginato en un pH bajo (Manna et al., 2022; Al-Kassas et al., 2007).

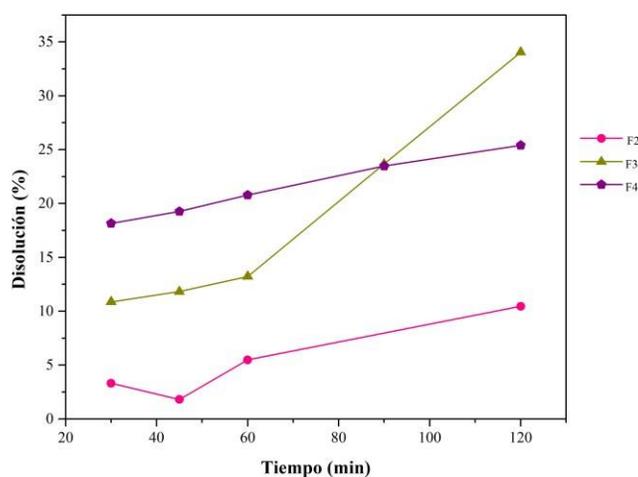


FIG. 14: Perfiles de liberación *in vitro* de perlas de alginato-GBCM en buffer HCl pH 1.2.

ESTUDIOS DE CINÉTICA DE LIBERACIÓN

La **Tabla XIII** permite observar los resultados de la cinética empleando diferentes modelos. En esta se puede observar que ninguna de las 4 formulaciones se ajusta a un modelo de orden 0, que el mejor modelo cinético al que se ajustaron las 4 formulaciones es al modelo de Korsmeyer-Peppas que permitiría comprender el efecto de este tras administrarlo, los valores de R^2 se encuentran entre 0.782 ± 0.324 a 0.978 ± 0.033 y una R^2 ajustada entre 0.563 ± 0.648 a 0.956 ± 0.065 en las 4 formulaciones. F1 y F4 presentaron los valores más altos de 0.90 para R^2 , ambas formulaciones presentan la concentración más alta del agente entrecruzante. El análisis con AIC en las 4 formulaciones comparando los modelos cinéticos analizados permite sugerir que el mejor modelo al que se acoplan los datos estudiados es el modelo de Korsmeyer-Peppas el cual plantea diversas hipótesis a partir de su valor de n el cual contempla solamente el 60% del fármaco disuelto. Cuando se tiene un valor de n igual 0 menor a 0.45 el mecanismo de liberación seguirá un perfil Fickniano, si se encuentra entre 0.45 y 0.89 indica un mecanismo no Fickniano, en caso de que sea igual a 0.89, dependiente de la relajación de las cadenas poliméricas en la matriz ya que pasa de un estado vídrioso a uno gomoso el cual cuenta con mayor movimiento cinético y si es mayor a 0.89 se habla de un caso de extrema relajación de las cadenas que podría considerarse que se acerca a una liberación de orden 0 (Shah y Deshpande, 2014). En el caso de F1 ($n=1.040$) y F2 ($n=1.481$) presentaron un Super caso II en donde se habla de una relajación extrema. Mientras que F3 ($n=0.519$) y F4 ($n=0.621$) presentaron un mecanismo no Fickniano por lo tanto se puede sugerir que la liberación de la GBCM dependerá del hinchamiento y difusión de la matriz (Suñé-Negre, 2002).

TABLA XIII: Cinética de liberación acoplada a modelo de orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas y Hixson-Crowell.

Modelo cinético	Estadístico	Formulación			
		F1	F2	F3	F4
Orden cero	R ²	-0.203±0.430	-0.403±0.683	-3.153±3.346	-1.021±0.754
	R ² ajustada	-0.203±0.430	-0.403±0.683	-3.153±3.346	-1.021±0.754
	AIC	96.254±2.894	96.034±3.652	104.443±3.279	89.644±1.890
Primer orden	R ²	0.745±0.172	0.689±0.162	0.700±0.145	0.907±0.077
	R ² ajustada	0.745±0.172	0.689±0.162	0.700±0.145	0.907±0.077
	AIC	79.234±5.363	80.711±4.828	79.323±5.540	59.740±9.863
Higuchi	R ²	0.573±0.202	0.617±0.203	-0.516±1.462	0.477±0.221
	R ² ajustada	0.573±0.202	0.617±0.203	-0.516±1.462	0.477±0.221
	AIC	85.486±3.929	82.900±3.647	93.489±3.960	77.329±2.820
Korsmeyer-Peppas	R ²	0.906±0.152	0.844±0.326	0.782±0.324	0.978±0.033
	R ² ajustada	0.858±0.228	0.688±0.652	0.563±0.648	0.956±0.065
	AIC	23.891±4.901	7.946±12.643	17.717±3.188	6.901±11.910
Hixson-Crowell	R ²	0.679±0.219	0.885±0.046	-0.182±1.300	0.669±0.191
	R ² ajustada	0.679±0.219	0.623±0.237	-0.182±1.300	0.669±0.191
	AIC	81.328±5.622	82.092±2.783	90.241±6.050	72.391±6.202

VIII. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el desarrollo de perlas de alginato cargadas con GBCM mediante un diseño factorial 2². La caracterización de las perlas permitió observar un *tamaño de perla* menor a los 2 mm y una *morfología* esférica para las formulaciones con una alta concentración de alginato mientras que las que presentaban una menor concentración presentaba una estructura rugosa menos uniforme. La capacidad de carga en todas las formulaciones fue menor al 4% debido a la baja dosis de administración, la *eficiencia de entrapamiento* se encontró en un rango 80 al 95% mostrando valores más altos a los reportados en la literatura. En cuanto a la

capacidad de hinchamiento y erosión se observó que a pH más alcalino el hinchamiento y erosión es mayor. El espectro *FTIR* y el termograma de *DSC* presentaron los picos característicos del alginato y de la GBCM lo que sugiere que no se presenta interferencia química o física de los materiales en las 4 formulaciones.

Los *estudios de liberación in vitro* mostraron un comportamiento pH dependiente de la perla en donde el proceso de hinchamiento-difusión-erosión de la perla está relacionado con las propiedades físicas y químicas del alginato. El análisis del % de disolución como variable de respuesta a las 12 h permitió observar que ambos factores no presentan un efecto estandarizado estadísticamente significativo, sin embargo, se observó que el aumento en la concentración de los factores de estudio conlleva a un menor porcentaje de disolución en buffer alcalino esto se debe al grado de deformación que presenta la estructura de “caja de huevo” a este tiempo.

El modelo de Korsmeyer- Peppas sugirió que la liberación de la GBCM en F1 y F2 presentaron un Super caso II en donde se habla de una relajación extrema. Mientras que F3 y F4 presentaron un mecanismo no Fickniano por lo tanto se puede sugerir que la liberación de la GBCM dependerá del hinchamiento y difusión de la matriz.

Finalmente, se propone continuar estudiando este sistema mediante otros ensayos que permitan una caracterización más amplia y realizar ensayos que permitan el uso de las perlas de alginato como tratamiento de la DMT2 en un futuro gracias a la modificación de su farmacocinética.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahmed, N.; Abo-zeid, Y.; Sakran. W. (2022) Strategies Adopted to Improve Bioavailability of Glibenclamide: Insights on Novel Delivery Systems. *J. Adv. Pharm. Res.* 2023, 7 (1), -35-49. <https://doi.org/10.21608/aprh.2022.168998.1199>
2. Al-Kassas R.S., Al-Gohary OM., Al-Faadhel MM. (2007) Controlling of systemic absorption of gliclazide through incorporation into alginate beads. *Int J Pharm.* Aug 16;341(1-2):230-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.03.047>.

3. Allen L, Ansel H. (2014) Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. (10^o ed. , pp. 299-314) Baltimore: Wolters Kluwer Health.
4. Berrozpe, J.D. y Ferrer E.E. Preparados orales de cesión modificada: cinética. En: Biofarmacia y Farmacocinética. Vol. II: Biofarmacia. Berrozpe, J.D., Martínez Lanao, J., Plá Delfina, J.M., Ed.; Editorial Síntesis S.A.: Madrid, 1997; Pág 317-347.
5. Bidgar, N., Pawar, R. H., Chakole, R., Burade, K. y Charde, M. (2021). An Overview: Sustained-Release Sodium Alginate Beads. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*, 21(3), 883–907.
6. Chang, R-K. y Robinson, J.R. Sustained drug release from tablets and particles through coating. En: Pharmaceutical dosage forms. Tablets. Vol. 3, 2da ed. Lieberman, H.A., Lachman, L. y Schwatz, J.B. Eds.; Marcel Dekker, Inc.: Nueva York., 1990; Pág. 199-302.
7. Charles-Navarro, D., Bocanegra-García, V., Palos, I., Rivera, G., Esquivel-Ferriño, P., & Gracia-Vásquez, S. *et al.* (2010). Encapsulation and release characteristics of glibenclamide loaded calcium-alginate beads. *Química Nova*, 33(7), 1435-1439. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422010000700002>
8. Collett, J. y Moreton, C. Modified-release peroral dosage forms. En: Pharmaceutics, the science of dosage form design. Aulton, M.E. Ed.; Churchill Livingstone Elsevier Science Limited. España.2002; Pág. 290-305.
9. Ebtessam A. Essa, Toka T. Elebyary, Magdy M. Abdelquader, Gamal M. El Maghraby, Amal A. Elkordy. (2020). Smart liquids for oral controlled drug release: An overview of alginate and non-alginate based systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 61. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102211>
10. Goodarzi, M.O., Petrov, M.S. (2023). Diabetes of the Exocrine Pancreas: Implications for Pharmacological Management. *Drugs* 83, 1077–1090. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01913-5>
11. Gutierrez L., Marcos X., García-Guzmán P., Monroy-Barreto M., Sumano H. (2022). Pharmaceutical characterization and pharmacokinetics of florfenicol-loaded alginate dried beads in rabbits. *World Rabbit Sci.*, 30: 153-162. <https://doi.org/10.4995/wrs.2022.16381>

12. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021, 12 de noviembre de 2021). COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 645/21: ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES. [Comunicado de prensa]. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf
13. Jui-Jung C., Yu-Ya H., Szu-Hsuan L., Tzu-Fang H., Wen-Ying H., Shu-Ling H., Yung-Sheng L. (2017) "Effects of pH on the Shape of Alginate Particles and Its Release Behavior", *International Journal of Polymer Science*, vol. 2017, Article ID 3902704, 9 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3902704>
14. Kawaguti H.Y.; Sato H.H. (2008).Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana, Isomaltulose production, a new sucrose substitute, using microbial glucosyl transferase," *Quim. Nov.*, vol. 31, no. 1, pp. 134–143. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000100025>
15. Kumar Nayak, A., Saquib Hasnain, M., Beg, S. y Intakhab Alam, M. (2010). Mucoadhesive beads of gliclazide: Design, development, and evaluation. *ScienceAsia*, 36(4), 319–325. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2010.36.319>
16. Lupo Pasin, B.& Maestro, A., Gutiérrez, J. y Gonzalez Azon, C. (2015). Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*. 49. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.02.023>.
17. Mane Deshmukh, P. P. y Barthate, A. N. (2017). Formulation and evaluation of microspheres of glibenclamide by ionotropic gelation method. *Indo Americal Journal of Pharmaceutical Research*, 7(9), 471–479.
18. Manna, S., Aziz, A., Das, S., & Bhowmik, M. (2022). Ionically Cross-linked Pectin-alginate Hydrogel Beads for Prolonged Release of Glibenclamide. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 12(4), 475–478. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2022.4.81>
19. Mayo Clinic, 2021. Diabetes de tipo 2 - Diagnóstico y tratamiento - Mayo Clinic. [online] [Mayoclinic.org. Disponible en: https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/type-2-diabetes/diagnosis-treatment/drc-](https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/type-2-diabetes/diagnosis-treatment/drc-)

- [20351199#:~:text=Metformina%20\(Fortamet%2C%20Glumetza%20y%20otros.de%20una%20manera%20m%C3%A1s%20eficaz. \[Recuperado el 18 de julio del 2022\].](#)
20. Nayak, A., Das, B. y Maji, R. (2012). Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: Development and in vitro characterization. *International journal of biological macromolecules*. 51. 1070-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.021>.
 21. Nayak, A.K. and Hasnain, M.S. (2020) 'Chapter 9 - Ionotropically gelled alginate particles in sustained drug release', in *Alginates in drug delivery*. London: Academic Press, pp. 203–230.
 22. Organización Mundial de la Salud (OMS), 2021. Diabetes. [online] Who.int. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> [Recuperado el 16 de julio del 2022].
 23. Organización Panamericana de la Salud, s.f. *Diabetes - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. [online] Paho.org. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/diabetes> [Recuperado el 18 de julio del 2022].
 24. Ortiz-Romero N., Ochoa-Martínez L. A., González-Herrera S. M., Rutiaga-Quñones O. M. , y Gallegos-Infante J. A.. (2021). Avances en las investigaciones sobre la encapsulación mediante gelación iónica: una revisión sistemática, *TecnoLógicas.*, vol. 24, n.º 52, p. e1962. <https://doi.org/10.22430/22565337.1962>
 25. Pawar S.N., Edgar K.J.(2012). Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials.* Abr;33(11):3279-305. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>.
 26. Rodríguez Carranza R. (2015). *Vademécum Académico de Medicamentos. Glibenclamida: antidiabéticos*. McGraw Hill. [online]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=90370898> [Recuperado el 30 de agosto del 2023].
 27. Rodríguez Carranza, R. (2013). *VADEMÉCUM ACADÉMICO DE MEDICAMENTOS* (6º ed., pp. 294-295;418-419). MCGRAW-HILL INTERAMERICANA.
 28. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 11º ed.* México; 2014.

29. Selimoglu, M. & Elibol, M. (2010). Alginate as an immobilization material for MAb production via encapsulated hybridoma cells. *Critical reviews in biotechnology*. 30. 145-59. <https://doi.org/10.3109/07388550903451652>.
30. Shah, J. C., & Deshpande, A. (2014). Kinetic modeling and comparison of invitro dissolution profiles. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 302-309.
31. Suñé-Negre, J. (2002). Nuevas aportaciones galénicas a las formas de administración.
32. The United States Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América: Formulario Nacional, Compendios de normas oficiales. USP 30*. Rockville. USA. 2007
33. United States Pharmacopeial Convention. *Farmacopea de los Estados Unidos de América: USP 35 : Formulario nacional : NF 30. Formulario Nacional, USP, USP 35 – NF*. Rockville, Md. : United States Pharmacopeial Convention, 2011.
34. Venkateswarlu, K., (2017). Evaluation of glibenclamide microspheres for sustained release. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 5(2),78-87.[Fecha de Consulta 30 de Junio de 2023]. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=496053942001>
35. Yari K., Akbari I., Yazdi SAV. (2020) Development and evaluation of sodium alginate-basil seeds mucilage beads as a suitable carrier for controlled release of metformin. *Int J Biol Macromol*. Sep 15;159:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.111>.



Dra. Perla García Guzmán
No. Económico: 44171



Dra. Liliana Schifter Aceves
No. económico 33389