

Vehiculización de insulina en partículas liofilizadas de colágeno I en cápsulas duras para administración oral.

Esteban Betancurt Franco¹, Maria Paula Riveros Mora ² y Ronald Andrés Jimenez Cruz^{3*}

¹ ebetancurt@unbosque.edu.co

² mpriverosm@unbosque.edu.co

³ rajimenez@unbosque.edu.co

* Universidad el Bosque, Facultad de Ciencias, Programa de Química Farmacéutica, Semillero ABC, Grupo de Investigación de Química Aplicada INQA, Bogotá, Colombia

Abstract: La diabetes es una enfermedad crónica que eleva los niveles de azúcar en sangre por una producción insuficiente o ineficaz de insulina; esta aqueja aproximadamente a 460 millones de personas a nivel mundial. A lo largo del tiempo, se han buscado alternativas que generen nuevos sistemas de entrega de insulina que disminuyan los efectos adversos con los métodos de administración ya existentes y mejorar la adherencia al tratamiento. El propósito de este estudio es presentar una alternativa de administración para la insulina, a través de su vehiculización en partículas de colágeno I liofilizadas para administración oral. Las partículas se generaron a partir de una dispersión w/o de colágeno I al 2.5%; teniendo en la fase acuosa glutaraldehído y colágeno I, mientras que en su fase oleosa parafina líquida y span 80. Estas se lavaron, liofilizaron y cargaron con insulina para posteriormente determinar su morfología, tamaño, aspectos reológicos, perfil de liberación, eficiencia de carga y citotoxicidad. Se encontró que tanto las partículas cargadas como no cargadas tienen buenas propiedades de flujo. El perfil de liberación y la eficiencia de carga de las partículas es satisfactorio y no demuestran ser citotóxicos.

Keywords: Colágeno I; insulina; diabetes; via oral; partículas.

1. Introducción

La diabetes es una enfermedad endocrina caracterizada por la falta de síntesis de insulina. Se clasifica principalmente en dos tipos, siendo la diabetes tipo 1 aquella en la que se produce la eliminación de las células beta del islote pancreático. Esta condición conduce al desarrollo de cetoacidosis, obligando a los pacientes a depender de la administración de insulina para su tratamiento [1].

La diabetes tipo 2 se vincula con la resistencia a la insulina y un deterioro en la secreción compensatoria de esta hormona. Estos factores tienen un impacto negativo en la salud de los pacientes, exacerbando los desafíos en el manejo de la enfermedad.[1]

Se estima que en la actualidad hay alrededor de 460 millones de personas entre los 20 y 79 años padeciendo de diabetes, lo que representa al 9.3% de la población mundial en este rango de edades [2]. Para 2030 se prevé que este número aumente a 570 millones y para 2045 a 700 millones [2-3]. Según la cuenta de alto costo, en Colombia, para el año 2023 se presentaron 1.860.370 casos de diabetes, presentando una mayor prevalencia en la ciudad de Bogotá y en la región centro del país [4]. La Asociación Americana de Educadores en Diabetes propone un tratamiento para esta enfermedad basado en una dieta saludable, realización de actividad física y toma de medicamentos para tratar la diabetes como las

biguanidas, sulfonilureas, los inhibidores del cotransportador de sodio y glucosa (SGLT2) y inhibidores de la dipeptidil peptidasa (4DPP-4) [5]. El tratamiento para la diabetes varía según el tipo que se tenga y las características individuales de cada paciente. Sin embargo, en ambos tipos de diabetes, la insulina juega un papel fundamental.[5]. Esta viene en diferentes presentaciones, como lo son: lápices de inyección, jeringas y bombas de infusión continua [5]. Sin embargo, estas pueden llegar a presentar ciertos tipos de reacciones adversas por la naturaleza de su aplicación, entre estas se pueden encontrar: lipodistrofias, enrojecimiento, hinchazón, irritación el sitio de inyección, engrosamiento o depresión de la piel [6]. De igual forma, la aplicación de la insulina puede resultar incómoda para el paciente o generar disconformidad a nivel estético en el caso de las bombas de infusión [6]. Las técnicas de aplicación de la insulina también representan un problema; en un estudio realizado en la Fundación del Cantón de Cuenca, Venezuela, se encontró que los pacientes no ambientan correctamente el medicamento antes de la administración, no desinfectan la zona de inyección, entre otros [7].

En la búsqueda de métodos menos invasivos y más efectivos para administrar medicamentos, el colágeno emerge como una alternativa prometedora. Sus propiedades hemostáticas, biodegradables, biocompatibles y de baja antigenicidad lo convierten en un material ideal para la formulación de nuevos fármacos. [8].

El colágeno presenta propiedades mucoadhesivas y compatibilidades bioquímicas como su resistencia a las degradaciones proteolíticas lo que permite que sea usado como vehículo para la administración de fármacos en forma de nanoesferas, microesferas o nanopartículas [9]. Como vehículo, el colágeno liofilizado presenta ciertas ventajas, ya que, es capaz de actuar como un sólido absorbente que retarda y prolonga la liberación de insulina, la liofilización asegura que sea una estructura porosa y garantiza que el producto se conserve frente a los cambios térmicos [8]

En la actualidad se conocen alrededor de 28 tipos de colágenos; entre estos se encuentra el colágeno tipo I, que puede llegar a alcanzar longitudes de hasta 300 nm con anchos de 1 a 5 nm, está constituido por tres cadenas alfa (dos de estas son idénticas). Su estructura está en forma de GXY, en donde G será aquel aminoácido constante (glicina), mientras que X y Y serán prolina e hidroxiprolina respectivamente [8].

La insulina encapsulada en el colágeno I administrada oralmente tiene como objetivo el paso directo a la circulación portal, así como lo hace la insulina endógena secretada por el páncreas [10]. Al hacer uso de la vía oral para la administración de insulina, se puede impactar positivamente en la calidad de vida del paciente, ya que no es una vía invasiva. En el semillero de investigación, un estudio de A. Merchán [11] ya ha sentado las bases para el uso del colágeno en la entrega de medicamentos. En este trabajo, se desarrolló un sistema de administración oral de insulina basado en un vehículo heterodisperso de colágeno. La insulina se adsorbió en el colágeno para mejorar su estabilidad y se evaluaron las propiedades farmacotécnicas del sistema. Los resultados fueron alentadores: se obtuvieron sólidos con flujo adecuado y perfiles de liberación de insulina consistentes con modelos cinéticos de orden cero, lo que abre la puerta a una administración oral de insulina más efectiva y conveniente.

El propósito del presente estudio fue desarrollar un sistema de entrega de insulina oral a través del uso de partículas de colágeno I liofilizado como vehículo, para generar una alternativa de administración de esta hormona, con el fin de mejorar la adherencia a la medicación. De igual forma se buscó evaluar aspectos farmacotécnicos para determinar la factibilidad de realizar esta formulación a nivel de laboratorio.

2. Resultados

2.1 Morfología, tamaño y distribución de tamaño de las partículas

Se elaboraron partículas de colágeno I siguiendo la metodología de R.A Jiménez [12]. Se utilizó una dispersión de colágeno al 2.5% y se homogeneizó con un agitador de hélice. Las partículas se observaron al microscopio antes y después de la liofilización (figuras 1 y 2). Su morfología y tamaño se caracterizaron en un estereoscopio. (figura 3)



Figura 1. Partículas de colágeno I sin liofilizar



Figura 2. Partículas de colágeno I liofilizadas

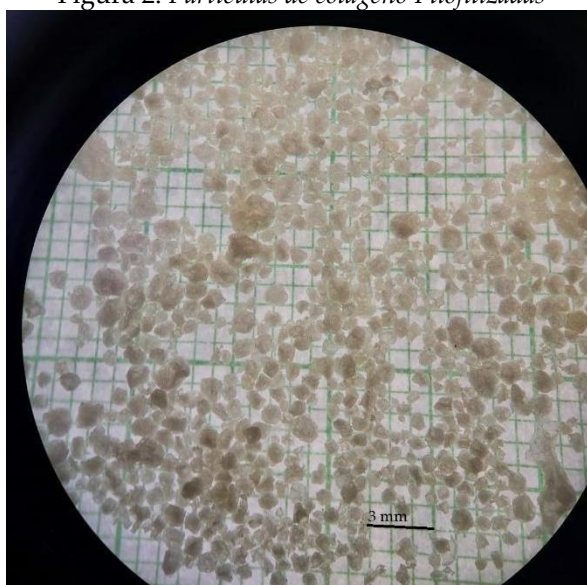


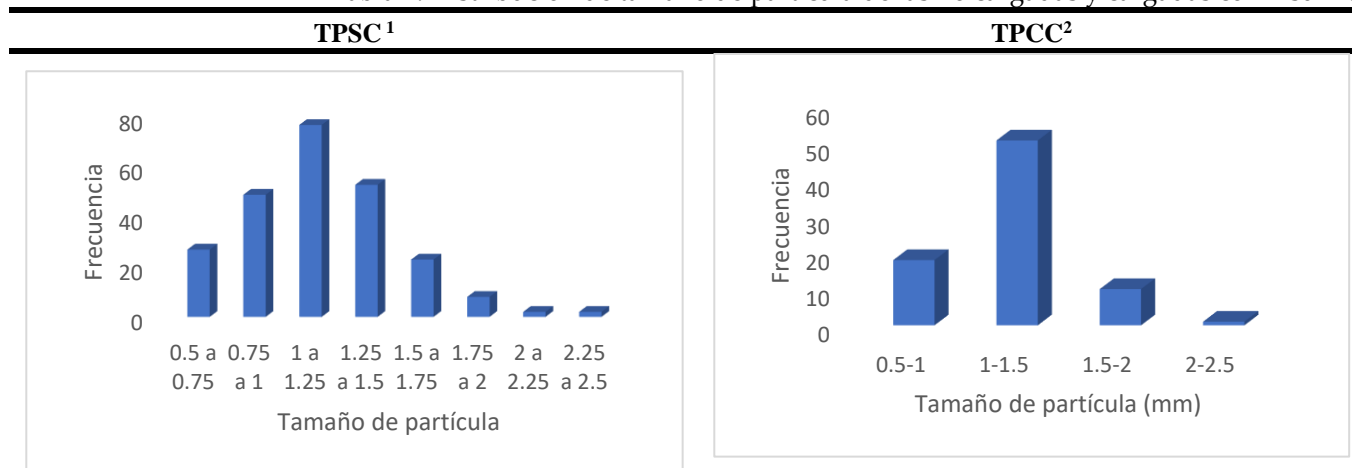
Figura 3. Partículas de colágeno I liofilizadas vistas en el estereoscopio



Figura 4. Partículas de colágeno con carga de insulina

El estudio de la morfología y tamaño de las partículas fue caracterizado haciendo uso de un estereoscopio. El análisis de la morfología de las partículas dio como resultado que la mayoría de estas son redondeadas y un poco irregulares. Con respecto al tamaño, se encontró que las partículas sin carga se encuentran en la mayoría en un rango entre 1-1.25 mm; esta tendencia se muestra también en las partículas cargadas, donde la mayoría de las partículas se encuentran en el rango de 1-1.25 mm. (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de tamaño de partícula de las no cargadas y cargadas con insulina



¹Tamaño de partícula de las partículas de colágeno sin carga de insulina ²Tamaño de partícula de las partículas de colágeno con carga de insulina

La tabla 2 muestra la media, moda y mediana de las partículas con y sin carga. En promedio, las partículas con carga de insulina tienen un diámetro ligeramente mayor que

las sin carga. La moda también es mayor para las partículas con carga. La mediana, en cambio, es similar para ambos tipos de partículas.

Tabla 2. Datos estadísticos del tamaño de partícula de las partículas sin carga y con carga

	Media (mm)	Moda (mm)	Mediana (mm)
Partículas sin carga	1.164	0.672	1.138
Partículas con carga	1.200	0.963	1.164

El índice de polidispersidad (PDI) indica que tan uniformes son las partículas en términos de tamaño. Un PDI bajo puede interpretarse como que la distribución de tamaños es estrecha. Este valor proporciona información sobre la uniformidad o variabilidad en el tamaño de las partículas. Para este cálculo se hallaron los D90, D50 y D10 de 241 partículas sin cargar. Este parámetro dio un resultado de 0.7330, mientras que el PDI de las partículas con carga fue de 0.6038. Lo que indica que, en términos de distribución de tamaño de partícula, las cargadas con insulina son más uniformes que las no cargadas.

2.2 Caracterización reológica

La evaluación de los aspectos reológicos se evaluó haciendo uso de métodos ampliamente conocidos como el ángulo de reposo, índice de Carr e índice de Hausner. para clasificar el flujo de las partículas se hizo uso de los índices de referencia de la tabla 3 [13]. Se puede observar en la Tabla 4 que, en el caso de las partículas sin carga, el ángulo de reposo dio como resultado un valor de 13.49°, lo que indica una baja resistencia al movimiento. Los valores de los índices de Carr, que en este caso fue de 23.53, y Hausner que fue de 1.25, muestran que el flujo se puede clasificar como “bastante bueno”, teniendo en cuenta los índices de referencia establecidos en la Tabla 3. Para el caso de las partículas cargadas con insulina, el ángulo de reposo tuvo un valor mayor que el de las partículas no cargadas, con un resultado de 17.57°, mientras que los valores obtenidos de índice de Carr y Hausner fueron menores comparados con los de las partículas sin carga, con resultados de 4.04 y 1.04 respectivamente.

Tabla 3. Índices de referencia para clasificar el flujo de las partículas obtenidas [13]

Ángulo de reposo	Índice de Carr	Índice de Hausner	Clasificación
25	10	1.11	Excelente
31	15	1.18	Bueno
36	20	1.25	Bastante bueno
41	25	1.34	Aceptable
54	31	1.45	Mediocre
56	37	1.59	Muy mediocre

156 **Tabla 4.** Resultados de los parámetros reológicos evaluados en partículas sin cargar

Parámetro	Resultado	Desviación estándar
Ángulo de reposo	13.49°	1.21
Índice de Carr (%)	23.53	1.71
Índice de Hausner	1.25	0.098

157
158 **Tabla 5.** Resultados de los parámetros reológicos evaluados en partículas cargadas con insulina

Parámetro	Resultado	Desviación estándar
Ángulo de reposo	17.57	1.21
Índice de Carr (%)	4.04	1.71
Índice de Hausner	1.04	0.098

159
160
161 **2.3 Peso promedio**

162 Se pesaron individualmente las cápsulas vacías y las que contenían partículas con y sin carga
163 de insulina. Las cápsulas con carga de insulina pesaron más que las vacías y que las que
164 contenían partículas sin carga, como era de esperarse debido a la presencia de la insulina.
165

166 **Tabla 6.** Pesos obtenidos del contenido de las cápsulas con partículas con y sin carga

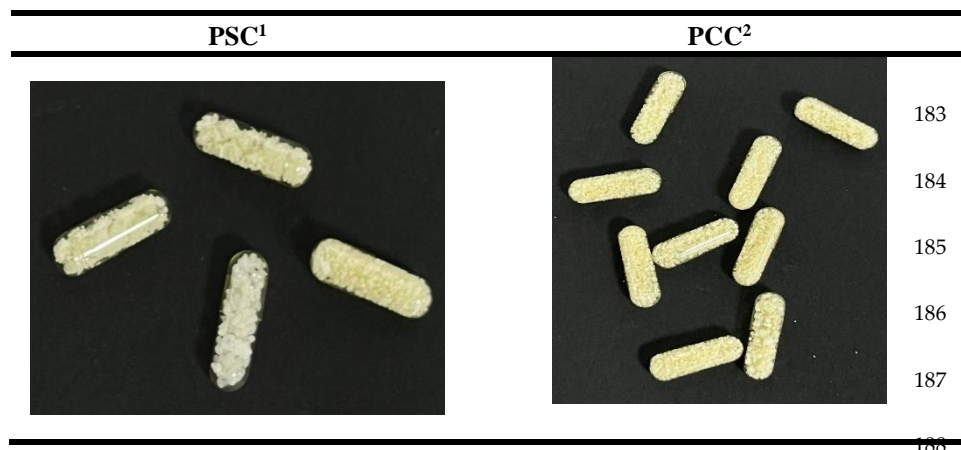
Peso cápsula vacía (g)	Peso cápsula llena con partícula de colágeno sin carga (g)	Peso cápsula vacía (g)	Peso cápsula llena con partícula de colágeno cargada con insulina (g)
0.0778	0,0880	0.0771	0.1225
0.0751	0.0908	0.0775	0.1068
0.0749	0.1031	0.0771	0.1067
0.0766	0.0802	0.0773	0.1069
0.0774	0.0844	0.0779	0.1056
0.0756	0.0826	0.0751	0.1058
0.0771	0.0915	0.0745	0.1055
0.0797	0.0835	0.0754	0.1127
0.0752	0.1072	0.0759	0.1108
0.0743	0.0916	0.0756	0.1162
Promedio	0.08403	0.07639	0.10995

167
168
169
170
171
172
173
174
175
176

Tabla 7. Resultados de ANOVA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	0.001932	35.10	0.00001316
Dentro de los grupos	0.0009910		
Total	0.002924		

Tabla 8. Cápsulas con partículas de colágeno sin carga y con carga de insulina



¹Cápsulas con partículas de colágeno sin carga de insulina ²Cápsulas con partículas de colágeno con carga de insulina

2.4 Perfil de liberación

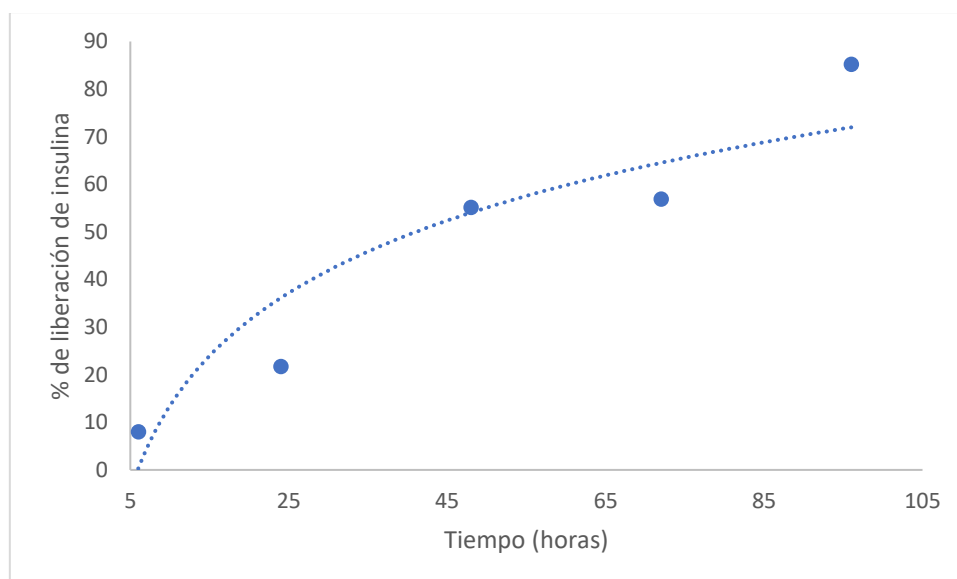
Se puede observar en el caso de las partículas sin carga de insulina (Tabla 9) que los valores de liberación son bajos o nulos, mientras que, como se ve en la Tabla 11, los resultados obtenidos para las partículas cargadas muestran que, en promedio, más del 85% de la insulina cargada fue liberada en las 96 horas del ensayo. Se observa de igual forma que aproximadamente en 48 horas es liberado >50% de la insulina. Aproximadamente el 15% de la insulina cargada no se libera en un transcurso de 96 horas.

Tabla 9. Resultados del perfil de liberación de las cápsulas con partículas sin carga de insulina

Tiempo (horas)	Réplica 1(%)	Réplica 2(%)	Réplica 3(%)	Promedio (%)	Desviación estándar
0	0.0	0.5	1.0	0.5	0.50
6	1.0	1.0	1.0	1.0	0
24	0.0	0.0	0.0	0.0	0
48	2.0	0.0	0.0	0.7	1.15
72	1.0	0.5	0.5	0.7	0.29
96	1.0	1.0	0.0	0.7	0.58

Tabla 10 Resultados del perfil de liberación de las cápsulas con partículas con carga de insulina

Tiempo (horas)	Réplica 1(%)	Réplica 2(%)	Réplica 3(%)	Promedio (%)	Desviación estándar
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0
6	2.0	15.0	7.0	8.0	6.58
24	20.0	28.0	17.0	21.7	5.68
48	44.8	57.9	62.5	55.1	9.18
72	50.9	49.8	70.0	56.9	11.37
96	75.5	88.0	92.0	85.2	8.61

**Figura 5.** Gráfica de perfil de liberación de cápsulas con partículas cargadas

2.5 Estudio de citotoxicidad

El estudio de citotoxicidad de las partículas fue llevado a cabo usando una línea celular de fibroblastos murinos L929, este muestra el porcentaje de células viables luego de que se expongan los cultivos al medio de extracción, tanto a las partículas sin carga como a las partículas con carga. Si se obtiene una reducción de la viabilidad celular mayor al 30% se considera que su efecto es citotóxico. Los resultados para el estudio de citotoxicidad se ven ilustrados en la Tabla 11, estos se hicieron por quintuplicado y muestran que tan citotóxicas son las partículas sin carga y con carga de insulina, se puede observar que ninguno de los valores supera el 30%. Se observa que el porcentaje de citotoxicidad se incrementa luego de que se da la carga de las partículas con insulina.

Tabla 11. Resultados de estudio de citotoxicidad

Formulación	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Promedio
Control positivo a citotoxicidad (DMSO 10%)	105.5	90.0	99.0	100.0	105.0	99.9 ± 6.25
Control negativo a citotoxicidad (silicona sólida USP)	2.5	1.5	1.5	2.0	3.0	2.1±0.65
Partículas vacías	10.5	15.5	12.5	20.5	20.5	15.9 ± 3.74
Partículas cargadas	24.0	25.0	20.0	18.5	14.0	20.3 ± 4.44

2.6. Eficiencia de carga

La cantidad de insulina cargada se evaluó indirectamente mediante la cuantificación de las partículas cargadas con ácido bicinconínico, un método ideal para medir proteínas como la insulina [12]. El ensayo BCA para la cuantificación de insulina se basa en la reacción específica entre el grupo bicinconínico (BCA) y los residuos de cisteína presentes en la estructura de la insulina. La insulina contiene dos residuos de cisteína, lo que permite que se una a dos iones de cobre (II) para formar un complejo estable. La reacción posterior con un agente reductor, como el DTT (ditiotreitól), convierte el cobre (II) en cobre (I), que luego se une al BCA para formar un complejo púrpura. La absorbancia de este complejo púrpura se mide a 562 nm, y la concentración de insulina se determina comparando la absorbancia de la muestra con una curva estándar de insulina conocida [12]. La Tabla 12 muestra la eficiencia de carga de las partículas, tanto con carga como con insulina. La eficiencia se determinó por triplicado y se obtuvo un promedio del 73.3%. El resultado obtenido en las partículas sin carga es esperado, ya que no se esperaba detectar insulina en ellas.

Tabla 12. Resultados la eficiencia de carga de las partículas

Partículas	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
Sin carga	0	1	2	1
Con carga de insulina	50	80	90	73.3

3. Discusión

El colágeno es una proteína que está presente a nivel estructural mayoritariamente en los vertebrados y mamíferos, esta proteína es un biomaterial polimérico de origen natural. A nivel estructural posee un dominio que se constituye a su vez por una hélice formada por tres cadenas peptídicas que permiten la formación de homotrímeros o heterotrímeros [13]. En la actualidad se han identificado 28 tipos de colágeno, entre estos, el colágeno I, este heterotrímero es insoluble en solventes orgánicos mientras que su fracción soluble en agua es bastante pequeña [13]. Es por esto que el colágeno I liofilizado se utilizó como vehículo para la insulina ya que protegerá a esta proteína de una degradación que se presenta en una administración por vía oral [13-14]. Con base en esto, en el estudio realizado por A. Merchán, se llegó a la conclusión de que los sistemas heterodispersos para la entrega de insulina por vía oral realizados, tienen una característica en común y es que en medio ácido, estos sistemas tienen un mayor porcentaje de liberación, por lo que se recomendó estudiar el uso de un protector para tener más control sobre el sitio donde se va a dar la liberación de la insulina con el fin de asegurar su viabilidad terapéutica. Es por esto que en esta investigación se propone desarrollar un sistema de entrega oral de insulina a partir de partículas de colágeno I vehiculizadas en cápsulas duras de gelatina, con el objetivo de caracterizar sus propiedades farmacotécnicas y de reología.

El método de elaboración de partículas se fundamenta en tesis previamente desarrolladas, como "Aloe vera-eluting collagen I microgels: physicochemical characterization and in vitro biological performance" y "Controlled release of an extract of *Calendula officinalis* flowers from a system based on the incorporation of gelatin-collagen microparticles into collagen I scaffolds: design and in vitro performance". Estos procedimientos han demostrado la capacidad para obtener partículas de manera satisfactoria. Se ha observado que la concentración del polímero utilizado, en este caso colágeno I al 2.5%, puede influir en la formación de las partículas. Además, el método de homogeneización empleado, específicamente el agitador en hélice juega un papel crucial. Se ha notado que, al utilizar este método de homogeneización a esta concentración de

colágeno, la gelación se favorece, así como la formación de las partículas. La velocidad de agitación también afecta el tamaño de las partículas obtenidas. Un método de homogeneización de alta energía, como el agitador en hélice, genera una dispersión de la fase interna de la emulsión en gotas de tamaños de hasta una micra, lo que conduce a la formación de microgeles tras la reticulación de glutaraldehído (GTA) a baja temperatura [15].

Con esto en mente, la interacción química por la cual se desarrollaron las partículas de colágeno I es la que ocurre entre los aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina del colágeno y GTA) que hace que se forme una base de Schiff [16]; estos son compuestos orgánicos que se dan por las reacciones de las aminas primarias de los aminoácidos con el aldehído del GTA y se caracteriza por presentar un enlace doble C = N comportandose como una base Lewis [16]. Las investigaciones sobre las bases de Schiff han sido de gran relevancia para dar con nuevos compuestos que son estables y versátiles en su estructura [16].

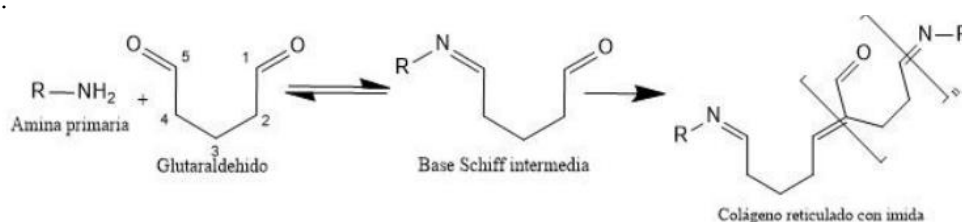


Figura 6. Mecanismo de entrecruzamiento del glutaraldehído. Ilustración tomada de Malavika Nair, et al [17].

La forma y tamaño de las partículas liofilizadas son factores determinantes al respecto de la carga del fármaco y liberación del fármaco [19]. Las partículas desarrolladas muestran una forma esférica y una superficie un poco irregular, el tamaño de estas, mayoritariamente se encuentra en un rango de 1 a 1.25 milímetros, según el análisis realizado en el software Image J; esto es debido a factores como la velocidad de homogeneización y el entrecruzamiento del colágeno gracias al uso del glutaraldehído [15]. La velocidad de homogeneización en el agitador de hélice usada para el desarrollo de este trabajo fue de 200 rpm. Estos factores fueron determinantes al momento de obtener las partículas y a las variaciones realizadas a las condiciones de trabajo, se pudo determinar que la mejor forma de obtener las partículas era usando una velocidad de agitación de 200 rpm y una concentración de glutaraldehído de 0.050%. Esto se corrobora ya que, en las investigaciones mencionadas anteriormente, se usan condiciones similares y se obtienen las partículas satisfactoriamente.

Los parámetros reológicos evaluados, mostraron que las partículas sin carga obtenidas tienen propiedades de flujo buenas, es decir, se mueven con facilidad. El resultado obtenido para el ángulo de reposo fue bajo, lo que es indicativo que las partículas tienden a tener una buena capacidad de flujo [15].

El índice de Hausner y Carr obtenido tuvo un valor bajo, lo que indica que las partículas no tienen tendencia a la aglomeración y tienen una baja compresibilidad, al igual que corrobora que estas tienen una buena fluidez [16].

Con respecto a las partículas de colágeno I cargadas con insulina, se encuentra que las propiedades de flujo son similares a las que se obtuvieron en el caso de las partículas no cargadas, incluso parámetros como el índice de Carr mejoran, lo que quiere decir que la carga con insulina no impacta negativamente en las propiedades de flujo de las partículas, esto ya que, al absorber la insulina, las partículas de colágeno no alteran su estructura redondeada puesto que el fármaco se absorbe en ellas.

Estos aspectos evaluados son de gran relevancia en la industria farmacéutica ya que proporcionan información sobre la capacidad de las partículas para fluir y comprimirse, lo cual es de suma importancia en la optimización de los procesos de producción, ya que sirven como previsión del comportamiento de alimentación y descarga en las líneas de producción, puesto que se conoce como será el comportamiento de las partículas en

términos de fluidez en las operaciones unitarias que puedan llegar a emplearse [19]. Esta información es crucial para evitar problemas como los bloqueos en las máquinas o formación de obstrucciones. También, con los resultados obtenidos se puede dar una idea de como hacer el diseño de formulaciones farmacéuticas usando estas partículas, ya que la fluidez y la compatibilidad son parámetros críticos para lograr una dosificación precisa y consistente de la insulina. De igual manera se muestra que las partículas obtenidas no tienen tendencia a formar aglomerados que pueden llegar a afectar la calidad del producto final [22].

Teniendo en cuenta que los aspectos evaluados durante el desarrollo de la investigación fueron positivos, se pudo proceder a encapsular las partículas en cápsulas de gelatina dura. Esto se hizo con el fin de darle una protección a estas y así la insulina no se empezara a liberar en un medio ácido, siguiendo las recomendaciones de la investigación de A. Merchán [11]. A estas cápsulas con partículas cargadas y no cargadas se les determinaron ciertos atributos, como lo es el peso promedio, donde se observa que, las cápsulas sin carga de insulina tienen un peso promedio menor a las cargadas. Para determinar si existía o no una diferencia estadísticamente significativa entre el peso de las partículas sin carga y con carga, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). En este análisis se evidencia que, existe una diferencia significativa entre los promedios de los dos grupos analizados, esto quiere decir que es poco probable que la diferencia entre los promedios se deba al azar [23.] Por otro lado, este análisis también indica que existe una mayor variabilidad entre los promedios de los dos grupos que entre los datos de cada grupo, esto quiere decir que, las partículas con y sin carga si presentan una diferencia en su peso.

La variabilidad de peso, corroborada con el análisis estadístico se debe a que las partículas de colágeno I presentan una característica, la cual es que su capacidad de hinchamiento dependiera principalmente de la relajación de sus cadenas. [12]

De igual forma se observa que los datos de las cápsulas pesadas son consistentes, con variaciones de peso mínimas como se observa en los resultados obtenidos; teniendo conocimiento de estos datos se puede dar cuenta de cuánta cantidad de partículas con insulina está presente en cada cápsula, lo que es de gran importancia ya que esto se considera un parámetro crítico en las formulaciones farmacéuticas, ya que tiene un impacto en la seguridad, eficiencia y calidad [24]. Este valor es clave para asegurar aspectos como las dosis precisas, ya que un peso inconsistente puede llegar a dar una dosificación incorrecta de insulina, lo que puede resultar en efectos negativos en el paciente [25].

Con dicho ensayo realizado en este estudio, se evidencia que las partículas obtenidas tienen la capacidad de mantener un peso promedio consistente dentro de las cápsulas, lo que en la industria puede llegar a representar una reducción de costos que se asocian a reprocesos o rechazos de lotes debido a incumplimiento de especificaciones. [25].

Por su parte, el perfil de liberación de las partículas cargadas tuvo un comportamiento relativamente constante a lo largo del tiempo, se observa que la liberación es sostenida en las primeras 50 horas y luego tiene una pendiente pronunciada hasta las últimas 96 horas, lo que significa que la liberación de insulina es más rápida en este momento.

En este ensayo también se evidencia que la liberación de la insulina se da de forma prolongada, lo que es indicativo que esta puede ser bien aprovechada en el intestino. Se puede inferir que este comportamiento de liberación pueda ser porque la mayor parte de la insulina se absorbe en el lugar más interno de las partículas de colágeno, ya que, en el estudio realizado por A. Merchán se dice que el colágeno es capaz de actuar como un sólido que es capaz de retardar y prolongar la liberación de la insulina [merchan]. Por esto se tiene una pendiente más pronunciada hacia la finalización del estudio, que es cuando el núcleo de la partícula libera la insulina.

Con respecto a la eficiencia de carga, estos resultados pueden indicar que la insulina se está cargando principalmente el centro de las partículas (hipótesis que se corrobora con el perfil de liberación) y por esto, entre más grande sea la partícula, mayor cantidad de

insulina va a almacenar. Se puede inferir que, en el caso de las partículas de menor tamaño, al haber una mayor área superficial, la liberación se dará más rápido.

El estudio de citotoxicidad se realiza con el fin de determinar si las partículas van o no a generar un daño a las células del cuerpo cuando se administren al paciente, se esperaría que el resultado de este estudio tuviera un valor bajo, puesto que esto indica que las partículas no van a generar un daño a nivel celular en el usuario. Como se puede ver los resultados de citotoxicidad muestran valores de 15.9% y 20.3% para las partículas sin carga y con carga de insulina respectivamente.

Según la ISO-10993-5:2009, norma utilizada para evaluar la citotoxicidad en ensayos *in vitro* con el fin de determinar si un producto biológico puede causar un daño celular en un paciente, se considera que un material o sustancia es citotóxico cuando el resultado de este estudio arroja un valor mayor al 30%. En el caso de las partículas generadas en este trabajo de investigación, no se consideran citotóxicas según la normatividad consultada. Los niveles de citotoxicidad encontrados en las partículas se pueden deber a la presencia de pequeñas cantidades de trazas que están presentes desde el proceso de elaboración de las mismas, como lo puede ser la parafina líquida, sustancia que fue utilizada para la elaboración de las partículas y que, según estudios, puede generar carcinogenicidad o teratogenicidad [26]. Este resultado también confirma que la metodología propuesta en este trabajo de investigación para la obtención y el lavado de las partículas no deja una concentración de sustancias tóxicas que sea significativa o alarmante, ya que, si estas sustancias se presentaran en una concentración mayor, el valor de citotoxicidad tuviera un valor más alto.

Teniendo en cuenta los resultados globales obtenidos en este estudio se lograron obtener partículas de colágeno I liofilizadas cargadas con insulina a las cuales se les realizaron estudios farmacotécnicos y de liberación con el fin de evaluar la factibilidad de su desarrollo, obteniendo de esta manera, que es posible realizar esta vehiculización siguiendo la metodología propuesta, sin embargo, se recomienda evaluar la integridad de la insulina al momento de obtener el producto final, de igual forma se recomienda, hacer estudios *in vivo* para tener un mayor alcance y determinar la posibilidad de llevar esta formulación al mercado.

Adicionalmente en investigaciones futuras, es importante considerar que la principal limitante de esta metodología reside en la baja estabilidad de las partículas formadas. Esto se debe a que el colágeno, al ser una proteína con una estructura supramolecular fibrilar y no globular, se vuelve susceptible a la desestabilización al eliminar el agua de la partícula (mediante gradiente de etanol, secado por convección o liofilización).

4. Materiales y métodos

4.1 Materiales y equipos

El colágeno I con una concentración de 2.5% fue suministrado por el banco de tejidos de la Universidad Nacional de Colombia. La insulina glargina fue suministrada por el semillero ABC de la Universidad el Bosque (Bogotá, Colombia). El glutaraldehído usado fue de Sigma-Aldrich, Inc (St Louis, MO, USA) al igual que el span 80, la parafina líquida fue suministrada por SC Químicos (Bogotá, Colombia). Las cápsulas duras de gelatina transparentes utilizadas fueron conseguidas en Químicos Campota (Bogotá, Colombia).

Los equipos utilizados fueron: agitador de hélice marca Caframo (Ontario, Canadá) modelo BDC2002, la centrífuga Rotofix 32 A de Hettich Lab (Alemania) modelo 1206-01, el liofilizador (Lyovapor L-200/L-200 pro) modelo BUCHI 11L200PH2422111002, balanza analítica de Ohaus (USA), modelo PX224/E.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparación de las partículas de colágeno I

Las partículas de colágeno tipo I se hicieron siguiendo la metodología descrita por R.A Jiménez, 2022. Se tomó colágeno I a concentración 2,5% junto con el GTA para conformar la fase acuosa y la parafina líquida con span 80 para la fase oleosa. Se llevó a agitación de hélice a 200 rpm y se mantenía el sistema a 4°C por aproximadamente 40 minutos hasta ver la formación de las partículas. Después de esto, se dejaban en refrigeración por 24 horas a 4°C para lograr la maduración de las partículas. Una vez se tenían las partículas se llevó a centrifugación por 10 minutos a 5000 rpm, se retiró el sobrenadante y se realizó 1 lavado con etanol:agua 50:50 y luego 6 lavados más con agua destilada, hasta retirar la parafina líquida. Después de cada lavado se llevaba a la centrífuga para separar el sobrenadante. Ya lavadas las partículas, se congelaron a -80°C para llevar a liofilizador por 48 horas.

4.2.2 Caracterización reológica

4.2.2.1 Ángulo de reposo.

Se tomó un peso significativo de partículas de colágeno I en una probeta y se vació su contenido a 5 cm de altura para posteriormente medir la base y el alto y determinar el ángulo de reposo. Se hizo por triplicado. Este procedimiento se realizó con las partículas sin cargar y luego con las partículas cargadas.

$$\tan \alpha = \frac{h}{r}$$

Ecuación 1. Ángulo de reposo.

4.2.2.2 Índice de Carr e índice de Hausner.

Se pesó una cantidad significativa de partículas de colágeno I en una probeta. Posteriormente, se registró el volumen aparente ocupado por el peso tomado. Luego, la probeta fue golpeada diez veces contra una superficie plana con el fin de compactar el contenido, permitiendo así observar el volumen resultante ocupado por las partículas. Este procedimiento se realizó por triplicado con las cápsulas sin cargar y luego con las cápsulas cargadas.

$$\text{Índice de Carr} = \frac{\text{densidad compactada} - \text{densidad aparente}}{\text{densidad compactada}}$$

Ecuación 2. Índice de Carr.

$$\text{Índice de Hausner} = \frac{\text{Volumen inicial}}{\text{Volumen aparente}}$$

Ecuación 3. Índice de Hausner.

4.2.3 Caracterización de tamaño de partícula de las partículas.

Las partículas de colágeno I sin carga y con carga de insulina fueron puestas sobre un vidrio de reloj para ser observadas en un estereoscopio y obtener imágenes; estas fueron analizadas haciendo uso del software Image J versión 1.54i , con el fin de determinar el tamaño de las partículas obtenidas.

4.2.4 Caracterización de la distribución del tamaño de partícula.

Se hizo la medición del diámetro de 241 partículas de colágeno I y así poder tener una muestra significativa de la población, con forme a esto se hallan los valores de D90, D50 y

465 D10. Para esto, se organizaron de menor a mayor los valores de diámetro y se tomó como
466 D90 el dato límite en donde el 90% de los datos se encuentra incluido. El mismo
467 procedimiento se hizo para hallar los valores de D50 y D10, solo que se tomaron los
468 datos del 50% y del 10% respectivamente. Una vez se obtuvieron estos valores, se hizo uso
469 de la ecuación 4 para hallar el valor del índice de polidispersidad.

$$470 \quad IP = \frac{D90 - D10}{D50}$$

471 Ecuación 4. Índice de polidispersidad.

472 4.2.5 Carga de la insulina en las partículas liofilizadas de colágeno I.

473 Para la carga de las partículas de colágeno I con insulina, se tomaron las partículas y
474 fueron puestas en un tubo eppendorf; poco a poco se fueron añadiendo gotas de insulina
475 para que las partículas la absorbieran. Para asegurarse que estas hayan absorbido la
476 cantidad de insulina añadida se esperó hasta que se notara que el líquido sobrepasara por
477 encima de las mismas, indicando que habían llegado a su capacidad máxima.

478 4.2.6. Curva de calibración de insulina.

479 Para llevar a cabo la curva de calibración de insulina, se realizaron diluciones seriadas de
480 insulina de concentraciones conocidas para posteriormente añadir ácido bicinónico
481 (BCA) e incubar a 37°C durante una hora. Este método de cuantificación de proteínas por
482 BCA se basa en el uso de este reactivo para la cuantificación de insulina por la quelación
483 que se generara entre el BCA con los iones de cobre (Cu²⁺) en presencia de los grupos
484 amino que estan presentes en la cadena peptídica de la insulina generando un complejo
485 de coloración purpura; posterior a esto se realizó la incubación para incrementar la
486 sensibilidad del ensayo se cargó la mezcla en los pozos de la microplaca, y se coloca en el
487 lector el cual mide la absorbancia a 562 nm, ya que es la longitud de onda donde el
488 complejo obtenido absorbe más luz además de asegurar una mayor especificidad al
489 disminuir las posibles interferencias de otras sustancias en la muestra que puedan
490 absorber luz en diferentes regiones del espectro [27]. Finalmente, se registra la absorbancia
491 de las muestras para cada punto de la curva y se grafica en función de la concentración de
492 insulina conocida, se ajusta la línea de regresión a los puntos de las curvas y con esta se
493 determinan las concentraciones.

494 Para evidenciar detalles de la curva de calibración, revisar anexo 1.

495 4.2.7. Peso promedio de cápsulas.

496 Se tomaron 20 cápsulas y se pesaron en una balanza analítica vacías; se tomaron 10
497 cápsulas de estas para llenarlas con las partículas de colágeno I sin carga de insulina y
498 luego se tomaron las otras 10 cápsulas y se llenaron con las partículas de colágeno I
499 cargadas de insulina, posterior a esto se pesaron las 20 capsulas individualmente y se
500 registró el peso para poder calcular el peso promedio.

501 4.2.8 Perfil de liberación.

502 Para el estudio de liberación *in vitro* de las partículas de colágeno se tomaron cápsulas con
503 las partículas cargadas en tubos eppendorf de 1 mL con medio de liberación, en este caso
504 un buffer de fosfatos a pH 7.4. Los sobrenadantes que se obtuvieron en el agitador orbital
505 (100 rpm a 37°C) se cuantificaron por UV-vis a 0, 6, 24, 48, 72 y 96 horas.

506 4.2.9 Ensayo de citotoxicidad

Este ensayo se realizó siguiendo los lineamientos de la norma ISO 10993-5, haciendo uso del ensayo MTT, este se fundamenta en reconocer la viabilidad celular al medir la actividad metabólica de las células al evaluar la capacidad de reducción mitocondrial al transformar la sal de tetrazolio MTT a cristales de formazán por parte de las células vivas [28]. El semillero ABC suministro la línea celular de fibroblastos L929, derivada del tejido adiposo subcutáneo de un ratón macho C3H/An de 100 días de edad [29], a la cual se les retiró el medio de cultivo y se les añadió tripsina para poder disociar las células L929 adherentes de la superficie del cultivo [30]. Posteriormente se suspendieron y se centrifugaron a 15000 rpm por 3 minutos. Luego se resuspendieron en 6 mL de medio de cultivo y se tomaron 100 μ L de azul de tripano y 100 μ L de cultivo, estos se mezclaron y se llevaron a una cámara de conteo. Después se añadieron 100 μ L de medio de cultivo y 100 μ L de suspensión celular en una placa de 96 pozos utilizando una pipeta multicanal. De igual forma se realizaron dos controles, uno positivo y otro negativo.

Se tomó un peso significativo de partículas de colágeno y se le agregó 1 mL de medio de cultivo y se llevó a incubación por 24 horas a 37°C con un 5% de dióxido de carbono. Una vez finalizada la incubación cada placa se evaluó bajo el microscopio para asegurar que el crecimiento celular fuera mayoritariamente uniforme.

Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se cambió por 100 μ L de medio con la muestra y los controles, volviendo a la incubadora con las mismas condiciones. En el transcurso del tercer día, se analizó la placa bajo el microscopio para identificar posibles errores y evaluar las propiedades de crecimiento celular.

Para la finalización del ensayo se separó el medio de cultivo de las placas para añadir 50 μ L de la solución de MTT a cada pozo. Luego se incubó por dos horas a 37°C y se decantó la solución para añadir 100 μ L de isopropanol. Finalmente se balanceó la placa para transferirla a un lector de microplacas con una absorbancia de 650 nm para poder disminuir la señal de interferencias potenciando de esta manera la señal del formazán

4.2.10 Ensayo de eficiencia de carga.

El ensayo de eficiencia de carga de las partículas se determinó haciendo uso de la siguiente ecuación.

$$\%EE = \frac{\text{Cantidad de insulina en la partícula}}{\text{Cantidad de insulina utilizada en la carga de las partículas}}$$

Ecuación 5. Fórmula para la eficiencia de carga.

5. Conclusiones

En el desarrollo de este trabajo se generaron partículas de colágeno I como un sistema de entrega oral de insulina vehiculizadas en cápsulas duras de gelatina. Los parámetros evaluados resultan de gran importancia en el desarrollo de nuevos sistemas para entrega de insulina haciendo uso de la vía oral, ya que, farmacotécnicamente se demostró que las partículas tienen buenas propiedades de flujo, eficiencia de carga, liberación, citotoxicidad, de peso y tamaño promedio. Todo esto teniendo en cuenta factores importantes en el momento de la formulación tales como la concentración de glutaraldehído y la velocidad de agitación, aspectos de gran relevancia para que la formación de las partículas se dé satisfactoriamente. Estas partículas pueden ser una alternativa para obtener una novedosa forma de administración de la insulina que ayude al paciente a disminuir los problemas asociados a la administración de insulina que se tiene actualmente en el mercado.

Se recomienda, para futuros estudios, evaluar cual es la mejor forma de realizar un lavado a estas partículas para disminuir los niveles de citotoxicidad relacionados a trazas de reactivos utilizados en la preparación de las partículas, todo esto sin afectar la integridad de las mismas.

6. Agradecimientos

En principio dar gracias a nuestra familia, por ser nuestro apoyo durante todo este proceso de formación profesional y desarrollo de este proyecto. A nuestros padres, Sandra Mora, Nidia Franco y Carlos Betancurt por hacernos las personas que somos hoy en día y ser el apoyo cuando necesitábamos en los momentos más difíciles de este proceso. Este logro es para ustedes.

Damos nuestro más profundo agradecimiento a nuestro tutor Ronald Andrés Jiménez Cruz, por todo su conocimiento, paciencia, guía y apoyo constante a lo largo de la realización de este proyecto. Su dedicación y experiencia hicieron posible poder culminar este trabajo de manera satisfactoria. Queremos reconocer el tiempo que dedicó a apoyarnos en el desarrollo de la investigación, su compromiso con nuestro crecimiento académico, profesional y personal ha dejado una marca imborrable en esta experiencia. De igual manera agradecemos a la Universidad el Bosque por brindarnos la oportunidad de trabajar bajo la dirección del Profesor Ronald.

Referencias

1. Masharani, U., & German, M. S. (2019). Hormonas pancreáticas y diabetes mellitus. In D. G. Gardner & D. Shoback (Eds.), *Greenspan. Endocrinología básica y clínica*, 10e. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1167520739> Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A., Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, 2007; Volume 3, pp. 154–196.
2. Russo MP, Grande-Ratti MF, Burgos MA, Molaro AA, Bonella MB. Prevalence of diabetes, epidemiological characteristics and vascular complications. *Arch Cardiol Mex.* 2023;93(1):30-36. English. doi: 10.24875/ACM.21000410. PMID: 36757785; PMCID: PMC10161833
3. International Diabetes Federation. (2019). *IDF Diabetes Atlas*, 9th edn. Brussels, Belgium. In *Atlas de la Diabetes de la FID*. http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Proceedings of the Name of the Conference*, Location of Conference, Country, Date of Conference (Day Month Year).
4. Día mundial de la diabetes 2023 - Cuenta de Alto Costo. (n.d.). Retrieved March 13, 2024, from <https://cuentadealtocosto.org/general/dia-mundial-de-la-diabetes-2023/>
5. Pilar Hevia V., E. (2016). EDUCACIÓN EN DIABETES. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(2), 271–276. <https://doi.org/10.1016/J.RMCLC.2016.04.016>
6. Fajreldines A, & Pellizzari M. (n.d.). *Eventos adversos a insulina en ancianos de UCI y prescripción inapropiada de medicamentos*. <https://doi.org/10.4321/S1699-714X2022000300006>
7. Vintimilla, J., Pérez, P., del Rocío, C., Santander, M., Quezada, R., Cecilia, F., Montesdeoca, D., Encalada, S., Gavilanez, C., Barros, C., & Cazar, H. (2019). *Técnica de aplicación de insulina y su relación con lipodistrofia en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 1*. <http://orcid.org/0000-0002-6737-5304>
8. Gil-Cifuentes L, Jiménez RA, Fontanilla MR. Evaluation of collagen type I scaffolds including gelatin-collagen microparticles and Aloe vera in a model of full-thickness skin wound. *Drug Deliv Transl Res.* 2019 Feb;9(1):25-36. doi: 10.1007/s13346-018-00595-x. PMID: 30387049.
9. Andonegi M, Carranza T, Etxabide A, de la Caba K, Guerrero P. 3D-Printed Mucoadhesive Collagen Scaffolds as a Local Tetrahydrocurcumin Delivery System. *Pharmaceutics.* 2021 Oct 15;13(10):1697. doi: 10.3390/pharmaceutics13101697. PMID: 34683989; PMCID: PMC8540040.
10. Herrador Ortiz, Z., & Llanos Méndez, A. (2010). Eficacia de la insulina de administración oral/bucal en el tratamiento de la diabetes mellitus. *Atencion Primaria*, 42(6), 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2009.06.017>
11. Adriana, M., (2022). Aporte al desarrollo de un sistema de entrega de insulina para la administración por vía oral de insulina
12. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)

- 604 13. Millán, D., Jiménez, R.A., Nieto, L.E. et al. Preclinical evaluation of collagen type I scaffolds, including gelatin-collagen
605 microparticles and loaded with a hydroglycolic *Calendula officinalis* extract in a lagomorph model of full-thickness skin
606 wound. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 6, 57–66 (2016). <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0265-8>
- 607 14. Valenzuela Rivero, P. (2017). Nuevos sistemas de liberación de péptidos y proteínas. (Trabajo Fin de Grado Inédito).
608 Universidad de Sevilla, Sevilla.
- 609 15. Jiménez, R. A., Millán, D., Sosnik, A., & Fontanilla, M. R. (2022). Aloe vera–eluting collagen I microgels: physicochemical
610 characterization and in vitro biological performance. *Materials Today Chemistry*, 23, 100722.
611 <https://doi.org/10.1016/J.MTCHEM.2021.100722>
- 612 16. Andonegi, M., Carranza, T., Etxabide, A., de la Caba, K., & Guerrero, P. (2021). 3D-printed mucoadhesive collagen scaffolds
613 as a local tetrahydrocurcumin delivery system. *Pharmaceutics*, 13(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101697>
- 614 17. Farmacopea de los Estados Unidos de América 37/ Formulario Nacional 32 (USP/NF). United States Pharmacopeial
615 Convention. MD, USA: Rockville, 2014, Vol.1, p.374
- 616 18. Revenga Parra, M. (2009). *Síntesis y caracterización de ligandos hidroxilados de base de schiff. aplicación al desarrollo de sensores y*
617 *biosensores*. 229.
- 618 19. Tulcán Mejía, E. M., Galindo Cruz, J. F., & Perez Figueredo, C. R. (2021). Síntesis De Una Base De Schiff A Partir De
619 Dopamina Y Cinamaldehído. *Ciencia En Desarrollo*, 12(2), 119–128. <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n2.2021.8500>
- 620 20. Nair, M.; Best, S.M.; Cameron, R.E. Crosslinking Collagen Constructs: Achieving Cellular Selectivity Through
621 Modifications of Physical and Chemical Properties. *Appl. Sci.* 2020, 10, 6911. <https://doi.org/10.3390/app10196911>
- 622 21. Treviranus, I. (2014). Particle Size and Shape Analysis. 2759.
- 623 22. Shah RB, Tawakkul MA, Khan MA. Comparative evaluation of flow for pharmaceutical powders and granules. *AAPS*
624 *PharmSciTech.* 2008;9(1):250-8. doi: 10.1208/s12249-008-9046-8. Epub 2008 Feb 15. PMID: 18446489; PMCID: PMC2976911.
- 625 23. Algina, J., & Olejnik, S. (2003). Conducting power analyses for ANOVA and ANCOVA in between-subjects designs.
626 *Evaluation & the Health Professions*, 26(3), 288-314.
- 627 24. Schlick-Hasper, E., Bethke, J., Vogler, N., & Goedecke, T. (2022). Flow properties of powdery or granular filling substances
628 of dangerous goods packagings—Comparison of the measurement of the angle of repose and the determination of the
629 Hausner ratio. *Packaging Technology and Science*, 35(10), 765–782. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pts.2678>
- 630 25. Fritsch, K. (2021). Metrology of weighing in the pharmaceutical industry. *Measurement: Sensors*, 18(September), 0–3.
631 <https://doi.org/10.1016/j.measen.2021.100262>
- 632 26. Wang Shulan, Zhu Shuofen, Gao Zhuqi, Li Jieping. Studies on the toxic effects of liquid paraffin Carcinogenesis,
633 Teratogenesis and Mutagenesis. 1996 ;8(1):43-46.
- 634 27. Bashyam R, Zelenay P. A class of non-precious metal composite catalysts for fuel cells. *Nature.* 2006 Sep 7;443(7107):63-6.
635 doi: 10.1038/nature05118. PMID: 16957726.
- 636 28. Yoly Carolina Rodríguez Rojas. (2021). Evaluación De La Citotoxicidad De Puntos De Carbono (Cd) En Las Lineas Celulares
637 Tumorales U-87 Y Mcf-7. Universidad de Rosario, Cd, 1–38.
638 [https://repositorio.escuelaing.edu.co/bitstream/handle/001/1519/Rodriguez](https://repositorio.escuelaing.edu.co/bitstream/handle/001/1519/Rodriguez_Rojas%2C_Yoly_Carolina-2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
639 [Rojas%2C_Yoly_Carolina-](https://repositorio.escuelaing.edu.co/bitstream/handle/001/1519/Rodriguez_Rojas%2C_Yoly_Carolina-2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
640 [2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://repositorio.escuelaing.edu.co/bitstream/handle/001/1519/Rodriguez_Rojas%2C_Yoly_Carolina-2021.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- 641 29. Ma Z, Hu Y, Jiang G, Hou J, Liu R, Lu Y, Liu C. Spontaneous generation of germline characteristics in mouse fibrosarcoma
642 cells. *Sci Rep.* 2012;2:743. doi: 10.1038/srep00743. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23077727; PMCID: PMC3473365.
- 643 30. Matinfar A, Dezfulian M, Haghighipour N, Kurdtabar M, Pourbabaei AA. Replacement of Trypsin by Proteases for Medical
644 Applications. *Iran J Pharm Res.* 2022 Aug 22;21(1):e126328. doi: 10.5812/ijpr-126328. PMID: 36942066; PMCID:
645 PMC10024315.

652 Anexos

654 Tabla 13. Curva de calibración de insulina

Concentración insulina (ug/mL)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	SD
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.056	0.050	0.054	0.053	0.003
10	0.123	0.108	0.098	0.110	0.013
20	0.216	0.223	0.246	0.228	0.016
50	0.340	0.400	0.325	0.355	0.040

100	0.667	0.650	0.698	0.672	0.024
200	1.350	1.450	1.642	1.481	0.148

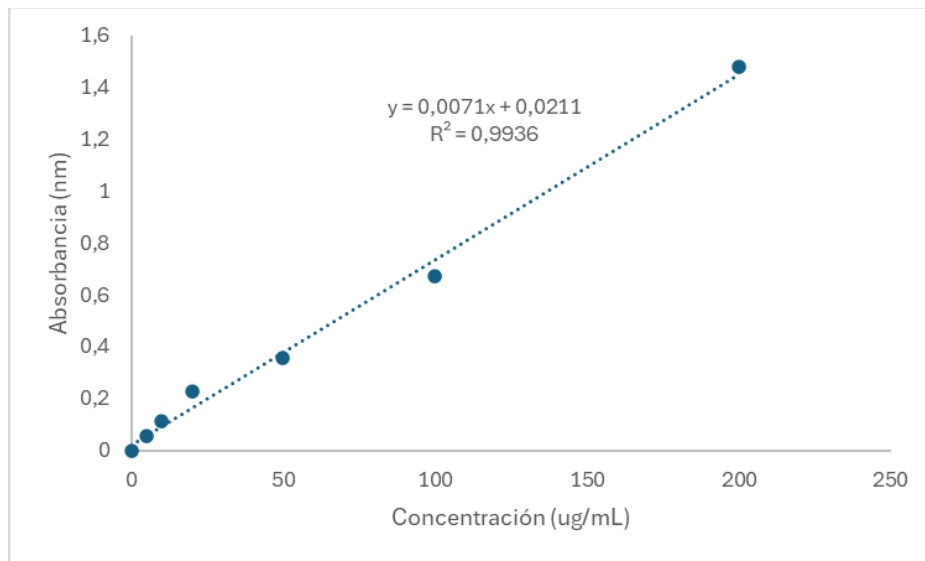


Figura 7. Curva de calibración de insulina

655

656

657

658