

Evaluación *in vivo* del efecto terapéutico de nanopartículas cargadas con insulina en un modelo experimental en ratas *Wistar*

Juan Isaac Chávez Corona
Andrea Gisela Tinajero Lozada
Angel Daniel Miguel Ortiz
Sheila Irais Peña Corona
Gerardo Leyva Gómez
María Josefa Bernad Bernad
Carolina Flores Ávila
David Quintanar Guerrero

Universidad Nacional Autónoma de México¹, juan.isaac.chavez@gmail.com
Universidad Nacional Autónoma de México², tinajeroandrea317@gmail.com
Universidad Nacional Autónoma de México³, daniel.migu@outlook.com
Universidad Nacional Autónoma de México⁴, sheila.ipc@live.com
Universidad Nacional Autónoma de México⁵, leyva@quimica.unam.mx
Universidad Nacional Autónoma de México⁶, bernadf@comunidad.unam.mx
Universidad Nacional Autónoma de México⁷, caroflores@quimica.unam.mx
Universidad Nacional Autónoma de México⁸, quintana@unam.mx

DOI: <https://doi.org/10.21158/...>

Fecha de recepción: 29 de julio de 2025

Fecha de aprobación: 17 de septiembre de 2025

Como citar este artículo: J.I. Chávez Corona *et al.* "Evaluación *in vivo* del efecto terapéutico de nanopartículas cargadas con insulina en un modelo experimental en ratas *Wistar*", Rev. Ont., vol. 13, p. , 2025. Disponible en: <https://doi.org/10.21158/...>

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1233-6313>

²Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-9703-8546>

³Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-4063-3261>

⁴Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2982-1315>

⁵Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7940-1100>

⁶Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5236-5656>

⁷Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8485-1213>

⁸Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica. Universidad Nacional Autónoma de México, México. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0881-0943>



Resumen

El desarrollo de sistemas de liberación controlada basados en nanopartículas poliméricas constituye una estrategia clave para la administración de compuestos de interés farmacéutico, como la insulina. El quitosano, un polímero derivado de la quitina, por su biocompatibilidad y versatilidad, representa una plataforma prometedora; sin embargo, los métodos tradicionales de síntesis generan una alta dispersión en las propiedades fisicoquímicas, lo que limita su aplicación terapéutica. En este estudio se prepararon nanopartículas de quitosano de bajo peso molecular mediante modificaciones al método de gelación iónica, para el cual se utilizó como agente entrecruzante el tripolifosfato de sodio (TPP) y Eudragit® L100-55 como recubrimiento entérico, con la finalidad de optimizar su desempeño y la entrega de insulina humana recombinante vía oral. Las nanopartículas presentaron un tamaño promedio de $299,86 \pm 21,33$ nm, un índice de polidispersión (PDI) de $0,28 \pm 0,05$ y un potencial zeta de $-24,93 \pm 1,10$ mV, con morfología ovoide uniforme, confirmada por TEM. Se evidenció que el sistema tuvo una disminución importante en los niveles de glucosa sérica en un ensayo piloto *in vivo* en ratas *Wistar*.

Palabras clave: diabetes; quitosano; nanopartículas; estabilidad; insulina; gelación iónica; entrega de fármacos.



In vivo evaluation of the therapeutic effect of insulin-loaded nanoparticles in an experimental Wistar rat model

Abstract

The development of controlled-release systems based on polymeric nanoparticles is a key strategy for the administration of pharmaceutical compounds, such as insulin. Chitosan, a polymer derived from chitin, represents a promising platform due to its biocompatibility and versatility; however, traditional synthesis methods result in high dispersion in physicochemical properties, limiting its therapeutic applications. In this study, low-molecular-weight chitosan nanoparticles were prepared using the ionic gelation method, with sodium tripolyphosphate (TPP) as the cross-linking agent and Eudragit® L100-55 as the enteric coating, with the aim of optimizing their performance and delivery of recombinant human insulin via oral administration. The nanoparticles had an average size of 299.86 ± 21.33 nanometers, a polydispersity index (PDI) of 0.28 ± 0.05 , and a zeta potential of -24.93 ± 1.10 mV, with a uniform ovoid morphology confirmed by TEM. The system was shown to significantly reduce serum glucose levels in an in vivo pilot trial in Wistar rats.

Keywords: Diabetes; chitosan; nanoparticles; stability; insulin; ion cross-linking; drug carrier.

1. Introducción

La diabetes mellitus (DM) es considerada una enfermedad metabólica crónico-degenerativa que actualmente afecta a una gran parte de la población mundial. En 2024, más de 589 millones de adultos, es decir, 1 de cada 9 personas en el mundo, fueron diagnosticados con este padecimiento. La Federación Internacional de Diabetes pronostica un incremento del 46 % para el 2050, lo que agravará su impacto sanitario. Actualmente, la diabetes se posiciona como la octava causa de muerte en todo el mundo, consolidándose como uno de los principales retos de salud pública del siglo XXI [1].

La DM se caracteriza por un estado persistente de hiperglucemia, debida a un déficit de producción de insulina (tipo 1) o a la insensibilidad a la insulina (tipo 2) [2, 3]. Aproximadamente el 9 % de los diagnósticos corresponde a la DM tipo 1, mientras que la DM tipo 2 representa el 90 % restante. Es debido a la alta prevalencia que en la industria farmacéutica se han desarrollado múltiples tratamientos y terapias efectivas orientadas al control glucémico [1].

La administración convencional de insulina subcutánea constituye el tratamiento fundamental de la diabetes. Sin embargo, su administración puede provocar reacciones cutáneas como causa de falla en la adherencia terapéutica [3]. El diseño de sistemas poliméricos inteligentes orientados al reparto de fármacos y biotecnológicos se ha consolidado como una estrategia prometedora para el reposicionamiento y la liberación controlada de agentes terapéuticos según el fin clínico.

Las nanopartículas poliméricas son una estrategia innovadora que permite la coencapsulación de múltiples moléculas bioactivas y su reparto específico, lo que incrementa su biodisponibilidad y reduce los efectos adversos [4, 5]. Existe una diversa gama de métodos de síntesis según los fármacos por encapsular, la naturaleza del polímero, el mecanismo de liberación y las propiedades fisicoquímicas.

Dentro de estos sistemas, el quitosano, un biopolímero lineal obtenido mediante el proceso de desacetilación alcalina de la quitina, ha despertado gran interés por sus propiedades biocompatibles, no tóxicas, biodegradables y antimicrobianas [6]. La linealidad de las cadenas de D-glucosamina y N-acetilglucosamina, así como la prevalencia de grupos hidroxilo (-OH), amino (NH₂) y éter (C - O - C) permiten interacciones electrostáticas e iónicas intra e intermoleculares para la formación de nanopartículas [7].

Entre los métodos sintéticos de nanopartículas a base de quitosano, el protocolo de gelación ionotrópica (GI) destaca por su alta rentabilidad. La GI se basa en las interacciones electrostáticas entre dos especies iónicas: un polímero lineal y un agente entrecruzante como el tripolifosfato de sodio (TPP). Durante el proceso, es posible la incorporación de un compuesto farmacéutico en la mezcla reactiva para su administración [4].

Las nanopartículas de quitosano/TPP presentan ciertas propiedades autoadhesivas en el tracto gastrointestinal (TGI), además de su alta solubilidad en medios ácidos. El recubrimiento con biopolímeros entéricos como Eudragit® L100-55 (soluble a pH 6,5) ayuda a la entrega y liberación controladas de los fármacos encapsulados en ciertas porciones intestinales, en lugar del estómago. Por lo tanto, en el presente estudio proponemos la fabricación y optimización de un sistema de entrega de insulina por vía oral mediante un nanocomplejo de quitosano-TPP y Eudragit® L100-55. Además, la evaluación del control glucémico *in vivo* en ratas Wistar sanas [8, 9].

2. Metodología

2.1. Fabricación de nanopartículas

La síntesis de las nanopartículas de quitosano se realizó mediante modificaciones al método de gelación ionotrópica descrito por [10]. Se empleó quitosano en su forma de bajo peso molecular, con un grado de desacetilación estimado en 75 %, en combinación con el agente reticulante TPP. Para obtener nanopartículas con diámetros inferiores a 400 nm, se prepararon disoluciones de quitosano a una concentración de 0,1 % y 0,05 % en ácido acético al 1 %, complementadas con 50 µL de Tween 80. De manera paralela, se elaboró una disolución de TPP a una concentración de 0,1 % en agua ultrapura, con un volumen total de 20 mL, destinada al proceso de reticulación.

Previo a la GI, ambas disoluciones fueron filtradas a través de membranas de 0,22 µm. Posteriormente, se ajustó el pH de la disolución de quitosano al intervalo 5,0-5,5 mediante la adición controlada de hidróxido de sodio al 20 %, lo que permitió la protonación de los grupos amino, que sirvieron como sitios aceptores de puentes de hidrógeno. Para la formación de los núcleos nanoparticulados, la disolución de quitosano se agitó suavemente a 500 rpm a temperatura ambiente, mientras que el TPP se incorporó por goteo a un flujo de 0,85 mL/min, en proporciones de 5:1 y 3:1 respecto de la disolución polimérica.

El recubrimiento de las nanopartículas núcleo se efectuó empleando un sistema de recubrimiento entérico con Eudragit® L100-55 al 0,1 % preparado en solución tampón fosfato pH 7,4, siguiendo el método reportado por [11]. La adición de las nanopartículas de núcleo a la disolución de Eudragit® L100-55 se realizó en una proporción 1:3, manteniendo un flujo de infusión de 0,85 mL/min.

Finalmente, el proceso de purificación se efectuó mediante centrifugación a 8000 rpm, a 22 °C durante intervalos de 5 y 9 minutos. El sobrenadante fue decantado y el pellet resultante se resuspendió en agua ultrapura, aplicando agitación en vórtex durante un minuto, seguida de sonicación utilizando un homogeneizador ultrasónico Huxi® JY92-IIDN, operado al 10 % de potencia, con periodos de sonicación de 10 segundos, alternados con 10 segundos de reposo, durante un minuto total.

2.2. Caracterización y optimización de las propiedades fisicoquímicas

Durante el desarrollo de la formulación, se evaluaron múltiples variables y su impacto en las características morfológicas y fisicoquímicas de las nanopartículas, con el objetivo de optimizar el control del tamaño, del índice de polidispersión (PDI) y del potencial Z, cruciales para la liberación de insulina. Las variables analizadas incluyen el tiempo de centrifugación, la presencia de tensoactivo y la proporción y concentración de Eudragit® en el sistema de recubrimiento entérico. Para las nanopartículas de núcleo recubiertas con Eudragit® se determinaron el diámetro promedio, el PDI y el potencial zeta empleando el equipo Malvern Zetasizer Nano Series, mediante mediciones continuas de dispersión dinámica de luz (DLS).

2.3. Análisis estadístico y optimización de parámetros

Como análisis estadístico, se utilizó el programa STATGRAPHICS® y se aplicó un análisis de varianza (ANOVA), estableciendo un valor de $p < 0,05$ como nivel de significancia. Se consideraron para el análisis los efectos principales y las interacciones entre los factores evaluados. Asimismo, se aplicaron dos diseños factoriales completos del tipo 2^2 para el análisis de variables de respuesta, como las dimensiones, el potencial Z y el PDI.

2.4. Determinación morfológica

Se realizó la caracterización morfológica de nanopartículas de núcleo con y sin recubrimiento con Eudragit® L 100-55, mediante la deposición de una pequeña gota de la muestra sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono. Las muestras fueron secadas a temperatura ambiente, para su posterior observación en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEM-ARM200F.

2.5. Validación del método analítico

Siguiendo la guía de validación de métodos analíticos, emitida por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C., así como la Directriz ICH Q2(R2)[12] sobre validación de procedimientos analíticos, se evaluó el desempeño del método, con la finalidad de confirmar que las condiciones empleadas en la fabricación de nanopartículas de quitosano son óptimas para su aplicación intencional.

Se construyó una curva de calibración destinada a determinar la linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y reproducibilidad del procedimiento, garantizando la selectividad del analito y la proporcionalidad de los resultados con respecto a su concentración dentro de un rango definido. Se generaron seis curvas de calibración independientes, que establecen la relación entre concentración de insulina (UI/mL) y su absorbancia a 268 nm. A partir de la



media de la regresión lineal de las curvas, se obtuvo una ecuación representativa para estimar el porcentaje de eficiencia de encapsulamiento de insulina (%EE) en un rango de 0,8 a 3,0 UI/mL.

2.6. Evaluación in vivo

Se llevó a cabo un estudio piloto utilizando ratas macho de la cepa Wistar (n= 8), con una edad de 4 meses y un peso aproximado de 400 g (SICUAE.DC-2024/1-1). Se dividieron dos grupos experimentales: grupo control (n=4) y el grupo con el tratamiento (n=4), al que se le administró la formulación de nanopartículas recubiertas con Eudragit® L100-55 por vía oral con cánula gástrica de acero inoxidable calibre 1,6 mm. En ambos grupos se administró una carga oral de glucosa a una dosis de 2g/kg. Se midió en sangre los niveles de glucosa mediante punción en el extremo de la cola, utilizando un glucómetro a tiempos de 0, 15, 45, 60, 90 y 120 minutos, respectivamente.

3. Resultados

3.1. Fabricación de nanopartículas

Se prepararon nanopartículas de quitosano a diferentes concentraciones y proporciones de Eudragit ® L100-55, velocidades de agitación y presencia de tensoactivos. El quitosano es altamente soluble en medios ácidos, se sabe que favorece la formación de interacciones intermoleculares, tanto de enlaces de hidrógeno entre cadenas de quitosano como iónicas, debido a la protonación de los grupos amino. Por encima de pH 6, el quitosano insoluble forma agregados microparticulados que precipitan. Estos agregados también pueden formarse por eventos de floculación en la suspensión, por tamaños de partícula superiores a 1000 nm, etc.

3.2. Caracterización y optimización de las propiedades fisicoquímicas

Se analizaron las características fisicoquímicas de los núcleos de nanopartículas con y sin recubrimiento de Eudragit® L100-55, como tamaño, índice de polidispersión y potencial Z, analizando el impacto de variables conocidas sobre las características fisicoquímicas, utilizando un análisis de varianza (ANOVA). Se evaluaron variables técnicas del proceso de fabricación, como el tiempo de centrifugación y la presencia o ausencia de tensoactivos (Tween 80). En el caso del tiempo de centrifugación, se consideraron tiempos de 5, 7 y 9 minutos; a 9 minutos, a 8000 rpm, fue el tiempo con las menores dimensiones. Sin embargo, existe una distinción entre la formulación con tensoactivo (P80) a 8000 rpm y 9 minutos de centrifugación respecto a sus dimensiones de $277,8 \pm 10,923$ y PDI de $0,459 \pm 0,014$, en contraste con las demás variables resumidas en la tabla 1 sobre las características de las nanopartículas con y sin inclusión de tensoactivo a diferentes tiempos de centrifugación, junto con su análisis estadístico.

Tabla 1. Características de las nanopartículas con y sin inclusión de tensoactivo a diferentes tiempos de centrifugación

Nanopartículas cargadas con insulina		N	Media	DESVESTA
Nanopartículas	Características			
Qitosano 8000 rpm 5 min	Tamaño promedio (nm)	3	404,75	50 443
	PDI	3	0,557	0,098
Qitosano + P80 8000 rpm 5 min	Tamaño promedio (nm)	3	401 667	13 214
	PDI	3	0,505	0,068
Qitosano 8000 rpm 7 min	Tamaño promedio (nm)	3	284 767	13 679
	PDI	3	0,458	0,064
Qitosano + P80 8000 rpm 7 min	Tamaño promedio (nm)	3	369 867	29 074
	PDI	3	0,463	0,035
Qitosano 8000 rpm 9 min	Tamaño promedio (nm)	3	277 433	2411
	PDI	3	0,43	0,024
Qitosano + P80 8000 rpm 9 min	Tamaño promedio (nm)	3	277,8	10 923
	PDI	3	0,459	0,014

Fuente. Elaboración propia.

Continuando con la optimización fisicoquímica, se evaluaron formulaciones sin insulina con Eudragit® a diferentes concentraciones en relación con el PBS, a 0,05 % y 0,1 %, con el propósito de determinar la proporción con el menor tamaño de nanopartícula, que se resume en la tabla 2 sobre los resultados de los valores fisicoquímicos de las nanopartículas sin insulina a diferentes proporciones y concentraciones de Eudragit L-100.

A una concentración de 0,1 % en una proporción de 3:1, se encontraron los tamaños, PDIs y potenciales Z óptimos para la formulación del recubrimiento final de las nanopartículas de núcleo (tabla 2). Asegurando la protección y adhesión en el epitelio intestinal, promoviendo así la absorción sistémica de insulina.

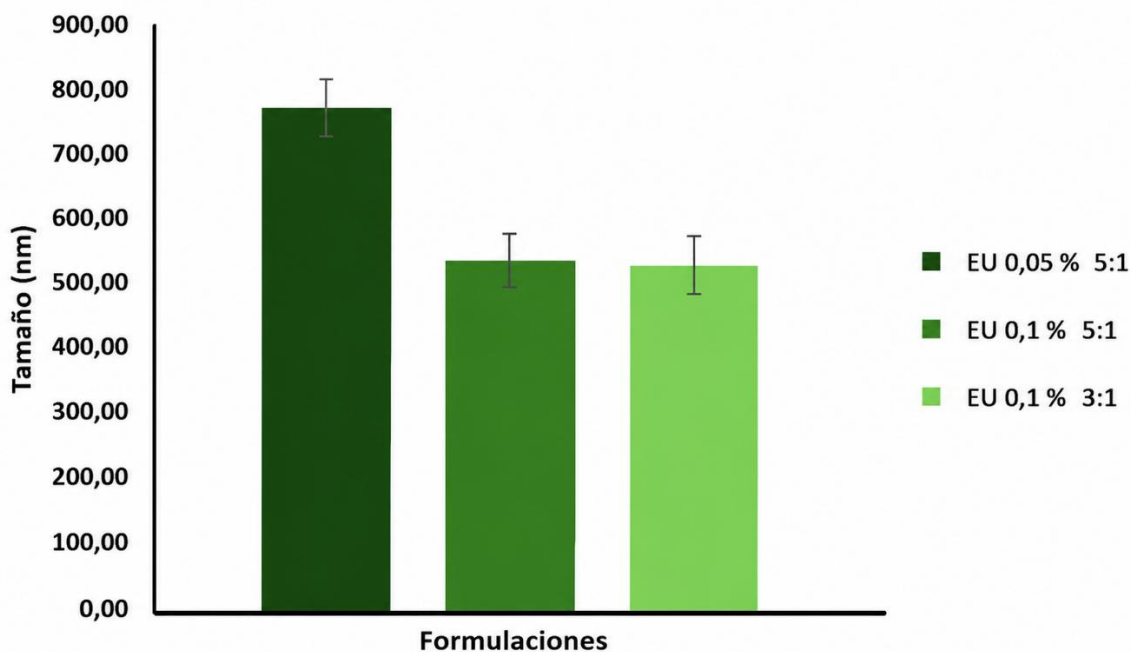
Tabla 2. Resultados de los valores fisicoquímicos de las nanopartículas sin insulina a diferentes proporciones y concentraciones de Eudragit L-100

Concentración	Lote	EUD/NP 5:1			EUD/NP 3:1		
		Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z	Tamaño	PDI	Potencial Z
EUD + PBS 0,05 %	1	1032 ± 16,09	0,275 ± 0,02	-43,83 ± 0,63	*El pellet no se solubizó después de centrifugar		
	2	724 ± 20,67	0,23 ± 0,005	-39,86 ± 0,49			
	3	539 ± 7915	0,17 ± 0,02	-39,86 ± 0,92			
Promedio		765±14,89	0,22±0.01	-41,18±0,68			
EUD + PBS 0,1 %	1	547,46±12,52	0,18±0.004	-33,10±0,87	651,93± 64,84	0,24± 0,024	-36,83± 0,80
	2	607,76± 4,73	0,22± 0,01	-39,80±1,57	504,30± 6,31	0,22± 0,006	-36,76± 0,51
	3	449,26± 4,02	0,18± 0,01	-37,06±0,32	426,03± 5,80	0,15± 0,01	-40,26± 0,814
Promedio		534,82±7,09	0,19±0.008	-36,65±0,92	527,42± 25,65	0,20 ± 0,01	-13,39 ± 0,70

Fuente. Elaboración propia.

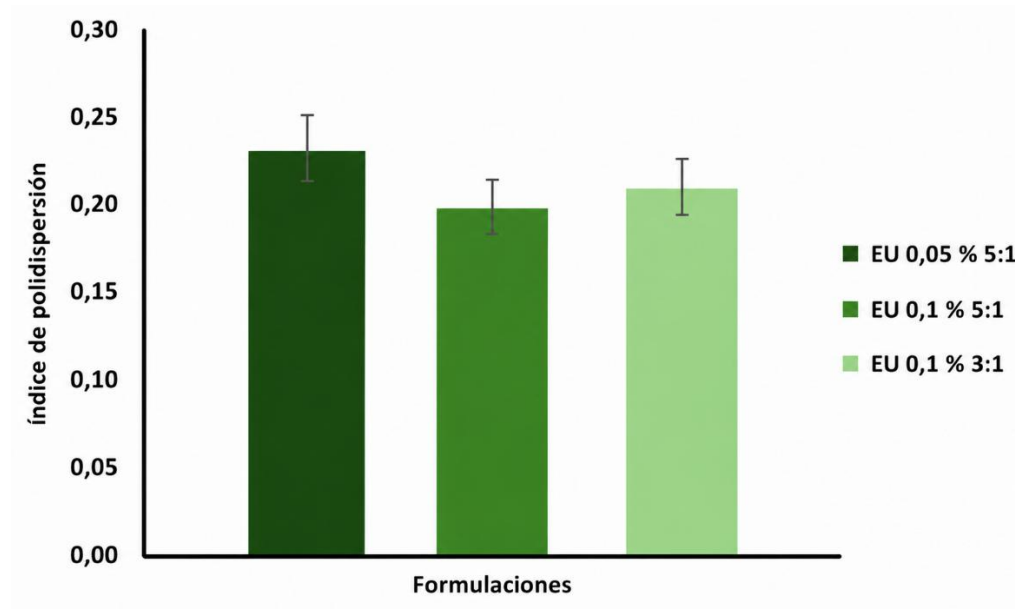
La formulación de EUD+PBS 0,1 % en proporción 3:1 respecto al núcleo presentó un tamaño promedio de 527 ± 25,65 nm, un PDI de aproximadamente 0,20 ± 0,08, y un potencial zeta de -13,39 ± 0,70 mV. La comparación gráfica entre las formulaciones se presenta en las figuras 1, 2 y 3.

Figura 1. Barras que muestran las dimensiones de las nanopartículas con recubrimiento entérico a diferentes proporciones y concentraciones de Eudragit L100-55



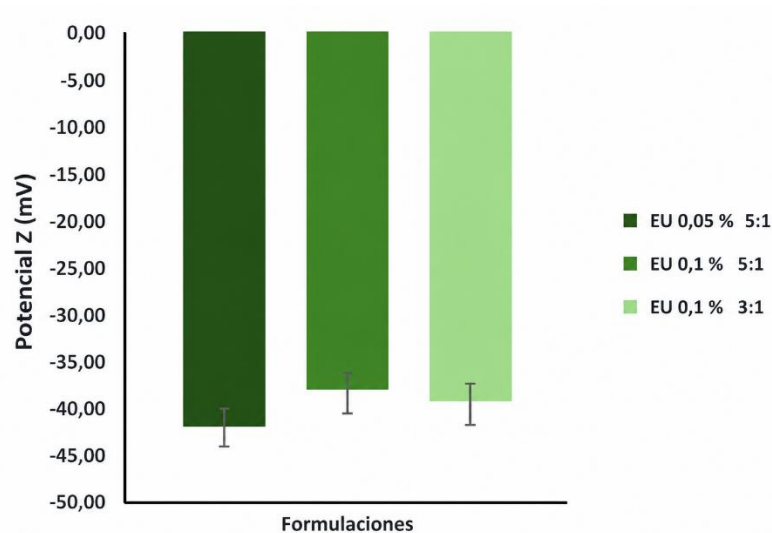
Fuente. Elaboración propia.

Figura 2. Barras que muestran los índices de polidispersión de las nanopartículas con recubrimiento entérico a diferentes proporciones y concentraciones de Eudragit L-100



Fuente. Elaboración propia.

Figura 3. Barras que representan los potenciales Z de las nanopartículas con recubrimiento entérico a diferentes proporciones y concentraciones de Eudragit L-100



Fuente. Elaboración propia.

La formulación completa incluyendo la insulina y recubrimiento con Eudragit® al 0,1 % en proporción 3:1 presentó un tamaño promedio de $299,86 \pm 21,33$ nm, $0,28 \pm 0,05$ para su PDI y $-24,93 \pm 1,10$ para su potencial Z, acordes con los objetivos establecidos en este método de

fabricación publicado en “Nanoparticle and microparticle-based systems for enhanced oral insulin delivery: a systematic review and meta-analysis” [23]. Las mediciones individuales y promedio obtenidas se resumen en la tabla 3, que presenta los resultados de los valores fisicoquímicos de las nanopartículas con insulina en proporción 3:1 a 0,1 % de Eudragit L-100.

Tabla 3. Resultados de los valores fisicoquímicos de las nanopartículas con insulina en proporción 3:1 a 0,1 % de Eudragit L-100

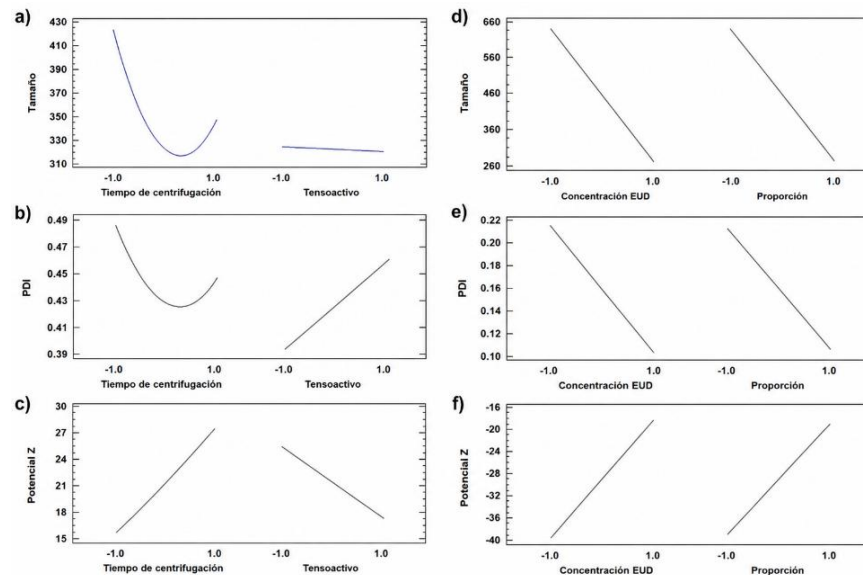
Nanopartículas	Dimensiones (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
EUD+PBS 0,1 %, 3:1	318,9	0,321	-23,8
	303,9	0,313	-26,0
	276,8	0,224	-25,0
Promedio	299,86±21,33	0,28±0,05	-24,93±1,10

Fuente. Elaboración propia.

3.3. Análisis estadístico y optimización de parámetros

Con un nivel de significancia de $p < 0,05$, se encontraron efectos significativos en el tamaño, PDI y potencial Z a distintos niveles de concentración y proporciones de Eudragit® L100-55. El menor tamaño, PDI y la mejor estabilidad fueron en una proporción de 3:1 a 0,1 % de Eudragit® L100-55. El efecto de la velocidad de centrifugación y la adición de tensioactivo es favorable a 8000 rpm y a la presencia de Tween 80. Como se muestra en la figura 4, los diseños factoriales del tipo 22 determinaron que la convergencia entre factores mejora la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, al ofrecer valores de tamaño y PDI más pequeños, además de un potencial Z óptimo.

Figura 4. Gráficas de líneas que representan: a, b, c



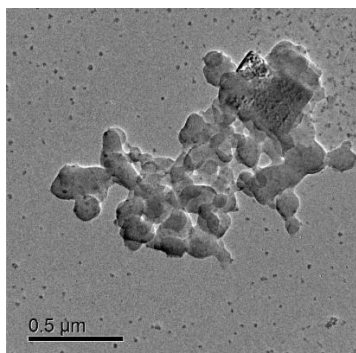
Nota. La relación entre el tiempo de agitación y la adición de tensoactivo respecto a a) tamaño de las nanopartículas, b) valor de PDI y c) potencial Z. Líneas que representan: (d, e, f) la interacción entre la concentración de Eudragit® y las proporciones de nanopartículas de núcleo respecto a: a) el tamaño, b) el valor de PDI y c) el potencial Z de las nanopartículas.

Fuente. Elaboración propia.

3.4. Determinación morfológica

La caracterización morfológica se realizó en muestras previamente sintetizadas con y sin recubrimiento con Eudragit® L100-55. Mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron imágenes de la morfología y las dimensiones de los núcleos de nanopartículas. En la figura 5 se observa que las nanopartículas recubiertas mostraron una tendencia a la coalescencia y una morfología predominantemente ovoide.

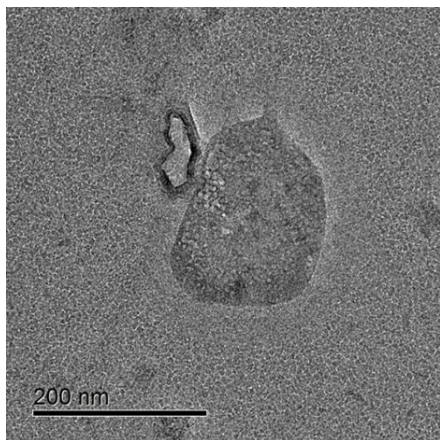
Figura 5. Nanopartículas a base de quitosano cargadas con insulina recubiertas con Eudragit® L100-55



Fuente. Elaboración propia.

Las nanopartículas sin recubrimiento exhibieron una morfología ovoide, con bordes bien delimitados que destacaron nítidamente sobre el fondo de la rejilla, como se observa en la figura 6.

Figura 6. Nanopartículas a base de quitosano, cargadas con insulina, sin recubrimiento



Fuente. Elaboración propia.

3.5. Evaluación de la validez del método analítico

En la tabla 4 se presentan las 6 curvas de calibración, construidas con el fin de evaluar la linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y reproducibilidad del método analítico propuesto para la cuantificación de insulina no encapsulada.

Tabla 4. Curva de calibración promedio

Concentración UI/mL	Absorbancia (268 nm)
	Curva promedio
0,8	0,228
1,4	0,420
2,0	0,584
2,6	0,779
3,0	0,891
Pendiente	0,301
Intercepto	-0,009
r	0,9990
Sy/x	0,094
ERR	1704

Fuente. Elaboración propia.

Las curvas presentaron consistencia; además, la tendencia confirma que hay una relación proporcional entre concentración y absorbancia, estableciendo el siguiente modelo matemático:

$$y = 0,3052 x - 0,01366 \quad (1)$$

De acuerdo con los resultados presentados en la tabla 5, y considerando los criterios de aceptación establecidos por la guía ICH Q2(R2) para la validación de procedimientos analíticos, el método es adecuado para su uso analítico.

Tabla 5. Resultado de validación del método analítico de insulina humana (AURAX®)

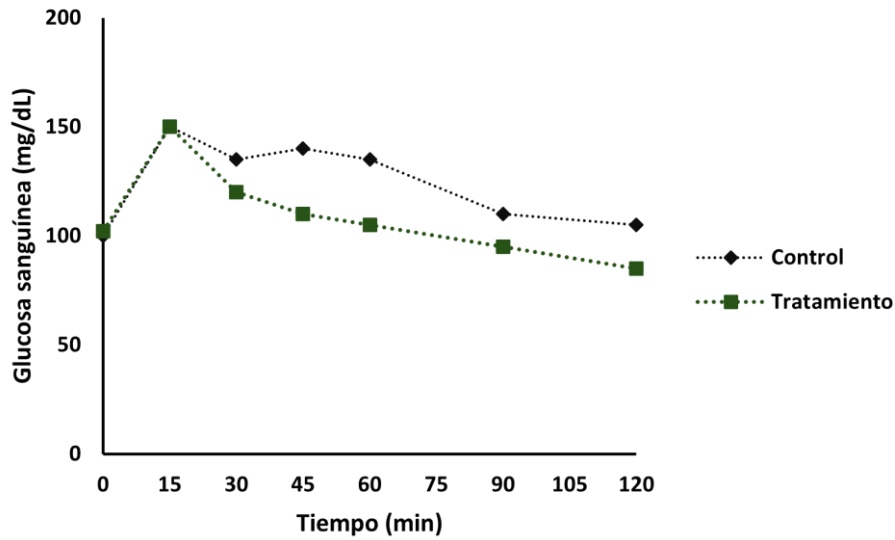
Linealidad del sistema			
Resultados		Criterio de aceptación	Dictamen
r ²	0,999	≥0,98	Aceptable
ERR	1,7	≤2,0 %	
C(β1)	(0,303 - 0,299)	-----	
Precisión global			
Resultados		Criterio de aceptación	Dictamen
Porcentaje CV	1,2 %	≤1,5 %	Aceptable
Exactitud			
Resultados		Criterio de aceptación	Dictamen
Diferencia	1,8 %	≤3,0 %	Cumple
Porcentaje de recuperación			
Porcentaje CV	1,3 %	≤3,0 %	
Precisión intermedia			
Resultados		Criterio de aceptación	Dictamen
Porcentaje CV	1,8 %	≤ 3,0 %	Cumple

Fuente. Elaboración propia.

3.6. Evaluación *in vivo*

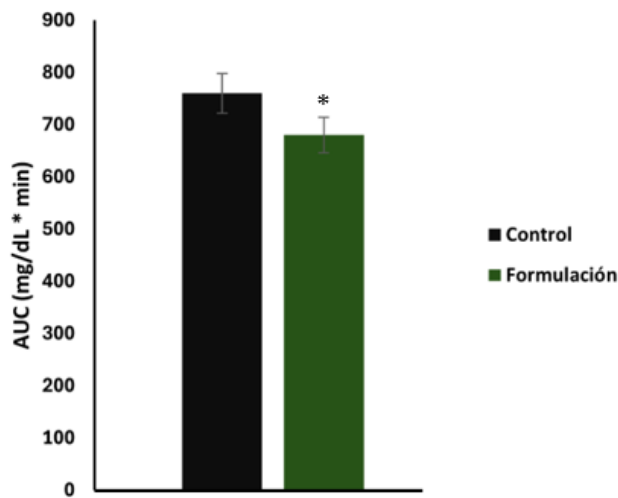
Se analizaron las concentraciones de glucosa sérica de ambos grupos (control y tratamiento) en distintos momentos. En ambos grupos se observan diferencias significativas en el área bajo la curva, siendo la menor concentración de 90 mg/dL a los 120 min en el grupo con tratamiento, en contraste con 110 mg/dL en el grupo control al mismo tiempo, como se muestra en las figuras 7 y 8.

Figura 7. Curva de tolerancia a la glucosa para los grupos de tratamiento y control



Fuente. Elaboración propia.

Figura 8. Comparación del área bajo la curva (AUC) de glucosa sérica entre los grupos con tratamiento y el grupo de control. Estadística: t- Student (*p<0,05)



Fuente. Elaboración propia.

4. Discusión

4.1. Fabricación

El quitosano soluble en condiciones ácidas ($\text{pH} < 6,5$) favorece la protonación de los grupos amino, lo que permite interacciones iónicas con la insulina y el TPP (H - uniones). Además, la presencia de grupos hidroxilo (-OH) y éter (C-O-C) permite la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares entre cadenas de quitosano (T-uniones) [13, 14]. El resultado de las interacciones electrostáticas permite la formación de las nanopartículas. El Tween 80, por debajo de su concentración micelar, estabiliza la suspensión al reducir la tensión superficial de las nanopartículas, equilibrando las fuerzas de atracción y repulsión entre ellas y garantizando su dispersión [15, 16]. La floculación y consecuente precipitación son el resultado del desbalance en las fuerzas de atracción y repulsión, así como la formación de micropartículas (>1000 nm), donde la repulsión entre partículas no es suficiente para mantener una estabilidad a largo plazo [17].

4.2. Caracterización y optimización de las propiedades fisicoquímicas

Para optimizar el perfil fisicoquímico que permita el uso de las nanopartículas como sistemas de entrega de fármacos, es importante considerar el tiempo y la velocidad de centrifugación, así como la adición de surfactante, puesto que se ha observado que variaciones desde 8000 rpm resultan en nanopartículas de 68,3 nm, y en el caso de 15000 rpm, en nanopartículas de 1663,3 nm [18].

Respecto al uso de Tween 80 (tabla 1), se ha demostrado que la incorporación de 0,5 % v/v de Tween 80 durante la fabricación de nanopartículas de quitosano-folato resultó en un tamaño promedio de $111,8 \pm 4,11$ nm, lo que evidencia una reducción significativa en sus dimensiones cuando se comparó con su adición a concentraciones más bajas [19, 20]. Para el caso de las nanopartículas que incluyen insulina, la adición de Tween 80 tuvo sustento con base en los resultados previos de diseño experimental y en las dimensiones obtenidas de $299,86 \pm 21,33$ nm, los 200 microlitros añadidos corresponden a 1 % del volumen total de disolución. Otro de los argumentos para el uso de Tween 80 es que también funciona como un tensioactivo, disminuyendo la tensión interfacial, lo que favorece la generación de nanopartículas más pequeñas y uniformes durante el proceso de emulsificación [21].

En el caso de la adición de Eudragit® L100-55 (tabla 3), el objetivo principal fue recubrir las nanopartículas de núcleo para protegerlas del medio ácido del estómago y facilitar su disolución en el pH neutro del intestino delgado, favoreciendo la absorción sistémica de

insulina (figura 1, 2 y 3) [22]. Con el riesgo de modificación de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, se realizaron ensayos con diferentes proporciones de disolución e incorporación de las nanopartículas de núcleo de quitosano. Finalmente, la concentración óptima fue de 0,1 % de Eudragit®, y una proporción de 3:1 respecto a las nanopartículas de núcleo (tabla 3). Esto, debido a que el Eudragit® facilita la formación de nanopartículas, proporcionando al sistema una matriz estable que permite regular el tamaño durante el proceso de incorporación al sistema [22].

Con base en el diseño experimental considerado y en los resultados obtenidos, la velocidad de 5000 rpm por 9 minutos permitió obtener nanopartículas con dimensiones de tamaño aproximado de $299,86 \pm 21,33$ nm, un PDI de $0,28 \pm 0,05$ y un potencial Z de $-24,93 \pm 1,10$; características óptimas de los sistemas de liberación de fármacos (figura 4) [23]. Las nanopartículas de menor tamaño tienen una mejor absorción y distribución en el organismo. Dada su capacidad para infiltrarse en los tejidos de manera más eficiente, constituye una ventaja en aplicaciones de administración de fármacos, especialmente en el ámbito de la nanotecnología [24].

4.3. Determinación morfológica

Mediante las imágenes obtenidas por TEM, fue posible observar las muestras que contenían insulina, específicamente las nanopartículas con y sin recubrimiento con Eudragit® L100-55, como se muestra en las figuras 5 y 6. Para las nanopartículas recubiertas con Eudragit® L100-55 se observa una textura más definida y lisa, con varias nanopartículas en coalescencia; se tiene evidencia de que las nanopartículas formuladas con Eudragit® suelen presentar un tamaño y una forma uniformes, lo cual resulta fundamental para una administración de fármacos consistente [25, 26, 27].

A diferencia de las nanopartículas recubiertas, las de núcleo presentan una forma ovoide y una apariencia vacuolar (figura 6) [28]. Las imágenes obtenidas por TEM facilitaron la evaluación y la visualización de nanopartículas de quitosano. Es común encontrar formas esféricas y uniformes, entre otras, por la versatilidad que tiene el quitosano para su aplicación en la tecnología farmacéutica [29].

4.4. Evaluación de la validez del método analítico

El modelo analítico de cuantificación cumple con los criterios de precisión, linealidad, selectividad y exactitud. De acuerdo con la guía ICH Q2(R2), se considera apto para su uso y sus resultados son confiables y precisos (Tabla 4 y 5) [30, 31].

4.5. Evaluación *in vivo*

De acuerdo con las curvas de concentración de glucosa (figuras 7 y 8), se observa una reducción notable de la glucosa sérica tras el tratamiento, lo que indica que al pH del intestino, las nanopartículas son liberadas del recubrimiento y permiten su paso a las células intestinales

[32, 33]. Aún es desconocido el mecanismo de cruce y su direccionamiento hacia la circulación portal para la entrega de insulina.

En la gráfica de la curva de tolerancia a la glucosa posadministración oral de glucosa (figura 7), se observa una reducción sostenida en los niveles de glucosa sérica a partir de los 30 minutos, cuyo efecto hipoglucémico se vuelve más evidente con el tiempo [34]. Esta respuesta sugiere una liberación efectiva y controlada de la insulina encapsulada.

El análisis del AUC (figura 8) confirma esta observación. Los resultados indican una reducción significativa de los niveles de glucosa posprandial [35, 36]. Es un indicador cuantitativo del efecto hipoglucemiante prolongado de la formulación oral, y sugiere que la insulina encapsulada mantuvo su actividad biológica tras la administración oral.

5. Conclusiones

La diabetes y las complicaciones asociadas al fallo en la adherencia terapéutica replantean la necesidad de tratamientos innovadores menos invasivos. En este estudio describimos la formulación de nanocomplejos como alternativa terapéutica oral a la administración clásica de insulina. En un sistema de entrega de insulina a base de quitosano, la estandarización de un tamaño y polidispersidad, facilita un incremento en la entrega de fármacos, así como su estabilidad. En altas proporciones de recubrimientos entéricos, el tamaño y PDI se incrementa significativamente en conjunto con la ausencia de tensoactivos, favoreciendo la inestabilidad y floculación. Esto, asociado con tiempos y velocidades bajas de centrifugación, disminuye la dispersión y uniformidad de la formulación. Estos efectos observados ofrecen un control estandarizado de los nanocomplejos. Por último, los parámetros presentados en este estudio pueden aplicarse para la preparación de nanopartículas basadas en quitosano, para la entrega prometedora de otros fármacos y fines biomédicos.

Para futuros trabajos se recomienda evaluar la estabilidad a largo plazo de las formulaciones en diferentes condiciones de almacenamiento, así como realizar estudios de liberación in vitro en medios biológicamente relevantes que simulen las condiciones gastrointestinales. También, es pertinente desarrollar estudios in vivo para determinar la biodisponibilidad oral de la insulina encapsulada y su impacto farmacodinámico. Del mismo modo, se sugiere explorar la incorporación de diferentes agentes estabilizadores o modificaciones en la proporción del recubrimiento entérico, con el fin de optimizar el equilibrio entre la protección gástrica y el tamaño de las partículas. Por último, sería pertinente ampliar la aplicación del sistema a la encapsulación de otros péptidos o biomoléculas sensibles, con el objetivo de consolidar la plataforma como un sistema de administración oral versátil.

Agradecimientos

Sheila Irais Peña-Corona agradece la beca otorgada por el Programa Postdoctoral de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, “Estancias Posdoctorales por México 2022; Estancia Posdoctoral Académica Inicial 2022”.

Juan Isaac Chávez-Corona es estudiante de Doctorado en el Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece el financiamiento otorgado por el **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT IN217926.**

Referencias

- [1] “Datos y cifras sobre la diabetes | Federación Internacional de Diabetes”. Accedido: 24 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://idf.org/es/about-diabetes/diabetes-facts-figures/>
- [2] L. Cloete, “Diabetes mellitus: an overview of the types, symptoms, complications and management”, *Nurs Stand*, vol. 37, n.º 1, pp. 61-66, Ene. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.7748/NS.2021.E11709>
- [3] H. Ikegami, Y. Hiromine, and S. Noso, “Insulin-dependent diabetes mellitus in older adults: Current status and future prospects”, *Geriatr Gerontol Int*, vol. 22, n.º 8, pp. 549-553, Ago. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/GGI.14414>
- [4] P. Gadziński *et al.*, “Iontropic gelation and chemical crosslinking as methods for fabrication of modified-release gellan gum-based drug delivery systems”, *Pharmaceutics*, vol. 15, n.º 1, p. 108, Dic. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS15010108>
- [5] S. Pedroso-Santana, and N. Fleitas-Salazar, “Iontropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes”, *Polym Int*, vol. 69, n.º 5, pp. 443-447, May. 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/PI.5970>
- [6] N. Van Bavel, T. Issler, L. Pang, M. Anikovskiy, and E. J. Prenner, “A simple method for synthesis of chitosan nanoparticles with ionic gelation and homogenization”, *Molecules*, vol. 28, n.º 11, p. 4328, Jun. 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28114328>
- [7] K. Jaferník *et al.*, “Chitosan-based nanoparticles as effective drug delivery systems—a review”, *Molecules*, vol. 28, n.º 4, Feb. 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28041963>
- [8] O. R. Guadarrama-Escobar *et al.*, “Chitosan nanoparticles as oral drug carriers”, *Int J Mol Sci*, vol. 24, n.º 5, Mar. 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/IJMS24054289>

- [9] G. I. Edo, E. Yousif, and M. H. Al-Mashhadani, "Chitosan: an overview of biological activities, derivatives, properties, and current advancements in biomedical applications", *Carbohydr Res*, vol. 542, Ago. 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109199>
- [10] S. C. Gutiérrez-Ruíz *et al.*, "Optimize the parameters for the synthesis by the ionic gelation technique, purification, and freeze-drying of chitosan-sodium tripolyphosphate nanoparticles for biomedical purposes", *J Biol Eng*, vol. 18, n.º 1, pp. 1-16, Dic. 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S13036-024-00403-W>
- [11] B. Xu, W. Zhang, Y. Chen, Y. Xu, B. Wang, and L. Zong, "Eudragit® L100-coated mannosylated chitosan nanoparticles for oral protein vaccine delivery", *Int J Biol Macromol*, vol. 113, pp. 534-542, Jul. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/I.IJBIOMAC.2018.02.016>
- [12] European Medicines Agency - EMA, "ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline". Accedido: 24 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
- [13] N. Van Bavel, T. Issler, L. Pang, M. Anikovskiy, and E. J. Prenner, "A simple method for synthesis of chitosan nanoparticles with ionic gelation and homogenization", *Molecules*, vol. 28, n.º 11, p. 4328, May. 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28114328>
- [14] T. Liu, J. Li, Q. Tang, P. Qiu, D. Gou, and J. Zhao, "Chitosan-based materials: an overview of potential applications in food packaging", *Foods*, vol. 11, n.º 10, May. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/FOODS11101490>
- [15] S. Seyam, N. A. Nordin, and M. Alfatama, "Recent progress of chitosan and chitosan derivatives-based nanoparticles: Pharmaceutical perspectives of oral insulin delivery", *Pharmaceuticals*, vol. 13, n.º 10, pp. 1-29, Oct. 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/PH13100307>
- [16] T. Liu, J. Li, Q. Tang, P. Qiu, D. Gou, and J. Zhao, "Chitosan-based materials: an overview of potential applications in food packaging", *Foods*, vol. 11, n.º 10, May. 2022. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/FOODS11101490>
- [17] T. L. Moore *et al.*, "Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions", *Chem Soc Rev*, vol. 44, n.º 17, pp. 6287-6305, Ago. 2015. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/C4CS00487F>

- [18] D. P. Sari, T. S. Utami, R. Arbianti, and H. Hermansyah, "The effect of centrifugation speed and Chitosan-Sodium Tripolyphosphate ratio toward the nanoencapsulation of Sambiloto (*Andrographis paniculata*) for the formulation of Hepatitis B drug", *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, vol. 105, n.º 1, p. 012112, Ene. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/105/1/012112>
- [19] M. Y. Koroleva *et al.*, "Effect of tween 80 on nanoparticle preparation of modified chitosan for targeted delivery of combination doxorubicin and curcumin analogue", *IOP Conf Ser Mater Sci Eng*, vol. 311, n.º 1, p. 012024, Feb. 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/311/1/012024>
- [20] Z. Fathalla, A. Al Fatease, and H. Abdelkader, "Formulation and in-vitro/ex-vivo characterization of pregelated hybrid alginate-chitosan microparticles for ocular delivery of ketorolac tromethamine", *Polymers (Basel)*, vol. 15, n.º 13, p. 2773, Jul. 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/POLYM15132773>
- [21] N. Faghmous, D. Bouzid, M. Boumaza, A. Touati, and O. Boyron, "Optimization of chitosan-coated W/O/W multiple emulsion stabilized with Span 80 and Tween 80 using Box-Behnken design", *J Dispers Sci Technol*, vol. 42, n.º 10, pp. 1566-1578, 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/01932691.2020.1774387>
- [22] M. Rezazadeh, R. Safaran, M. Minaiyan, and A. Mostafavi, "Preparation and characterization of Eudragit L 100-55/chitosan enteric nanoparticles containing omeprazole using general factorial design: In vitro/in vivo study", *Res Pharm Sci*, vol. 16, n.º 4, pp. 358-369, Ago. 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.4103/1735-5362.319574>
- [23] C. E. Romero-Carmona *et al.*, "Nanoparticle and microparticle-based systems for enhanced oral insulin delivery: a systematic review and meta-analysis", *J Nanobiotechnology*, vol. 22, n.º 1, p. 802, Dic. 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12951-024-03045-8>
- [24] M. A. Islam, S. Barua, and D. Barua, "A multiscale modeling study of particle size effects on the tissue penetration efficacy of drug-delivery nanoparticles", *BMC Syst Biol*, vol. 11, n.º 1, Nov. 2017. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S12918-017-0491-4>
- [25] G. Hemanth, A. Patil, M. G. Hariprasad, M. A. Moqbel Redhwan, and S. Guha, "Development, optimization, and characterization of Eudragit-based nanoparticles for Dasatinib delivery", *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 36, n.º 6, pp. 756-778, 2025. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/09205063.2024.2427489>
- [26] D. Jain, D. K. Majumdar, and A. K. Panda, "Insulin loaded eudragit L100 microspheres for oral delivery: preliminary in vitro studies", *J Biomater Appl*, vol. 21, n.º 2, pp. 195-211, Oct. 2006. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/0885328206060436>

- [27] N. Kheiripour *et al.*, “The effects of synthetic orally administrated insulin nanoparticles in comparison to injectable insulin on the renal function markers of type 1- diabetic rats”, *Iran J Basic Med Sci*, vol. 23, n.º 6, p. 810, Jun. 2020. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32695298/>
- [28] M. Jelvehgari *et al.*, “Development of pH-sensitive insulin nanoparticles using Eudragit L100-55 and chitosan with different molecular weights”, *AAPS PharmSciTech*, vol. 11, n.º 3, pp. 1237-1242, Sep. 2010. Disponible en: <https://doi.org/10.1208/S12249-010-9488-7>
- [29] G. Purohit, and D. S. Rawat, “Characterization Techniques for Chitosan and Its Based Nanocomposites”, *Chitosan-Based Nanocomposite Materials: Fabrication, Characterization and Biomedical Applications*, pp. 79-101, Ene. 2022. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-981-19-5338-5_3
- [30] CNQFB, “Guía de validación de métodos analíticos”, 2002.
- [31] European Medicines Agency - EMA, “ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline”. Accedido: 26 de agosto de 2025. [En línea]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>
- [32] H. Cai *et al.*, “Development of a pH-sensitive nanoparticle via self-assembly of fucoidan and protamine for the oral delivery of insulin”, *Pharmaceutics*, vol. 16, n.º 10, p. 1323, Oct. 2024. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS16101323>
- [33] R. Maurya, S. Ramteke, P. Guru, and N. K. Jain, “Oral glucose-responsive nanocarrier system for management of diabetes”, *J Endocrinol Metab*, vol. 12, n.º 4-5, pp. 146-160, Ago. 2022. Disponible en: <https://jofem.org/index.php/jofem/article/view/747/284284591>
- [34] C. Y. Low *et al.*, “Critical updates on oral insulin drug delivery systems for type 2 diabetes mellitus”, *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 23, n.º 1, pp. 1-25, Dic. 2025. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/S12951-024-03062-7>
- [35] Z. M. Wu *et al.*, “Novel preparation of PLGA/HP55 nanoparticles for oral insulin delivery”, *Nanoscale Res Lett*, vol. 7, n.º 1, pp. 1-8, Jun. 2012. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-299>
- [36] Y. Xiao *et al.*, “Glucose-responsive oral insulin delivery platform for one treatment a day in diabetes”, *Matter*, vol. 4, n.º 10, pp. 3269-3285, Oct. 2021. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.MATT.2021.08.011>