



**UTILIZACIÓN DE LA  
MICROENCAPSULACIÓN EN LA  
MEDICINA REGENERATIVA**

**FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN *IN  
VITRO* DE MICROESFERAS  
POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES DE  
METFORMINA FIJADAS EN GELES  
BIOADHESIVOS**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Facultad de Farmacia**

**Juan Carlos Jiménez Aires**

**Curso 2021/2022**



# **UTILIZACIÓN DE LA MICROENCAPSULACIÓN EN LA MEDICINA REGENERATIVA.**

## **FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES DE METFORMINA FIJADAS EN GELES BIOADHESIVOS**

**Trabajo Fin de Máster**

**Proyecto Experimental**

**Grado en Farmacia**

**Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**

**Tutora: Prof.<sup>a</sup> D.<sup>a</sup> María Luisa González Rodríguez**

**Alumno: Juan Carlos Jiménez Aires**

**Facultad de Farmacia**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

**Presentación: Facultad de Farmacia**

**Fecha: diciembre de 2022**



## **RESUMEN**

Metformina es un fármaco ampliamente utilizado hoy en día principalmente en la terapia de la diabetes tipo 2 por sus efectos hipoglucemiantes; sin embargo, recientes estudios sobre los efectos de este fármaco sobre otras estructuras fisiológicas han demostrado que, debido a su mecanismo de acción, puede utilizarse en el tratamiento de otras patologías cuya etiología dista en gran medida de la diabetes.

Este fármaco posee un efecto osteogénico derivado de su acción sobre las células madre mesenquimales y los proteoblastos, lo que ha supuesto un nuevo campo de investigación. Son numerosos los estudios de nuevas formulaciones con esta biguanida como principio activo, en la búsqueda de conseguir terapias dirigidas a las estructuras óseas, entre ellas, la región periodontal y las estructuras maxilofaciales. Existe un continuo desarrollo de nuevas formulaciones, las cuales han permitido confirmar que la encapsulación de metformina en microesferas poliméricas de ácido poliláctico (PLA), y el uso de hidrogeles poliméricos muestran una liberación prolongada del fármaco en el lugar de acción.

En elaboración de esta nueva formulación de microesferas de PLA cargadas con metformina, se siguió el método de la doble emulsión y extracción del solvente, incorporándolas posteriormente en un gel de Pluronic®/Hialuronato con el fin de obtener un medicamento mínimamente invasivo, con una liberación prolongada en el tiempo y optimizada en términos de biodisponibilidad y estabilidad.

Con el fin de conseguir una formulación exitosa, se llevó a cabo una metodología basada en el *Quality-by-Design* que nos permitió optimizar la influencia de los factores y los niveles más importantes en la elaboración de la fórmula, obteniéndose así una formulación con la mayor eficacia y estabilidad posibles.

Cada una de las formulaciones finales se caracterizó y se realizó un análisis estadístico del proceso de elaboración, así como una validación del método analítico, asegurando la calidad de la formulación final.

**PALABRAS CLAVE:** Metformina, microesferas, doble emulsión, hidrogel, osteogénesis, validación

## **ABSTRACT**

Metformin is a drug widely used today, mainly in the therapy of type 2 diabetes due to its hypoglycemic effects; however, recent studies on the effects of this drug on other physiological structures have shown that, due to its mechanism of action, it can be used in the treatment of other pathologies whose etiology is far from diabetes.

This drug has an osteogenic effect derived from its action on mesenchymal stem cells and proteoblasts, which has led to a new field of research. There are numerous studies of new formulations with this biguanide as an active principle, in the search for therapies directed at bone structures, including the periodontal region and maxillofacial structures. There is a continuous development of new formulations, which have confirmed that the encapsulation of metformin in polymeric microspheres of polylactic acid (PLA), and the use of polymeric hydrogels show a prolonged release of the drug at the site of action.

In the elaboration of this new formulation of PLA microspheres loaded with metformin, the method of double emulsion and solvent extraction was followed, later incorporating them into a Pluronic®/Hyaluronate gel in order to obtain a minimally invasive drug, with a release prolonged in time and optimized in terms of bioavailability and stability.

In order to achieve a successful formulation, a methodology based on Quality-by-Design was carried out, which allowed us to optimize the influence of the most important factors and levels in the preparation of the formula, thus obtaining a formulation with the highest possible efficiency and stability.

Each of the final formulations was characterized and a statistical analysis of the manufacturing process was carried out, as well as a validation of the analytical method, ensuring the quality of the final formulation.

**KEY WORDS:** Metformin, microspheres, double emulsion, hydrogel, osteogenesis, validation.



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>3</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>4</b>
3.1. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) .....	4
3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	6
3.2.1. System suitability .....	6
3.2.2. Especificidad o Selectividad .....	7
3.2.3. Estudio de degradación forzada.....	7
3.2.3.1. Degradación básica .....	8
3.2.3.2. Degradación ácida.....	8
3.2.3.3. Degradación oxidativa con peróxidos .....	8
3.2.3.4. Degradación solar.....	9
3.2.3.5. Degradación por luz ultravioleta.....	9
3.2.4. Linealidad .....	9
3.2.5. Linealidad baja .....	11
3.2.6. Precisión o Repetitividad.....	12
3.2.7. Límite de cuantificación (LOQ) .....	13
3.2.8. Límite de detección (LOD) .....	14
3.3. PREPARACIÓN Y SÍNTESIS DE MICROESFERAS DE PLA CARGADAS CON METFORMINA.....	14
3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS DE METFORMINA .....	17
3.4.1. Morfología.....	17
3.4.2. Eficacia de encapsulación.....	17
3.4.3. Compatibilidad fármaco-excipiente.....	17
3.4.3.1. Calorimetría diferencial de barrido.....	17
3.4.3.2. Microscopía en platina caliente .....	19
3.5. FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEL.....	19
3.5.1. Composición del gel .....	19
3.5.2. Incorporación de microesferas en gel.....	21
3.5.3. Caracterización de microesferas en gel .....	21
3.5.3.1. Estudio reológico.....	21
3.5.3.2. pH .....	22
3.5.3.3. Mucoadhesividad .....	22
3.5.3.4. Tiempo de gelificación .....	23
3.6. Estudio de permeación in vitro .....	24
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>25</b>
4.1. PREPARACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	25
4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....	26
4.2.1. System Suitability .....	26
4.2.2. Especificidad o Selectividad .....	26
4.2.3. Estudios de degradación forzada .....	26
4.2.4. Linealidad .....	26
4.2.5. Linealidad a baja escala.....	28
4.2.6. Precisión o Repetitividad.....	30
4.2.7. Límite de cuantificación .....	31

4.2.8. Límite de detección .....	31
4.3. OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN MEDIANTE DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
4.3.1. Estudio ANOVA: Análisis de la Varianza .....	33
4.3.2. Estudio ANOM: Análisis de las medias marginales .....	35
4.3.3. Diagrama de Pareto.....	37
4.3.4. Análisis de regresión y superficies de respuesta.....	39
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS .....	41
4.4.1. Morfología.....	41
4.4.2. Calorimetría diferencial de barrido.....	42
4.4.3. Microscopía en platina caliente .....	44
4.5. CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL .....	44
4.5.1. Reología.....	44
4.5.2. pH .....	47
4.5.3. Mucoadhesividad .....	48
4.5.4. Tiempo de gelificación .....	48
4.6. ESTUDIO DE PERMEACIÓN IN VITRO .....	49
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>53</b>
<b>7. ANEXO 1 .....</b>	<b>57</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**

Metformina (MF) es un derivado de biguanida ampliamente utilizado en la práctica clínica como fármaco antidiabético. Inhibe la gluconeogénesis hepática y desencadena la captación de glucosa en el músculo esquelético. El fármaco se tolera bien, es seguro y con una farmacocinética conocida. Debido a sus propiedades, metformina es actualmente el fármaco de primera línea para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Sin embargo, la investigación clínica con este fármaco se encuentra en un punto de rápido crecimiento, y ha sido capaz de demostrar en los últimos tiempos el potencial de este principio activo en la terapia de múltiples trastornos distintos de la diabetes.

Así, diversos análisis epidemiológicos han informado que MF puede mejorar el pronóstico de los pacientes con cáncer y también puede prevenir el inicio del tumor (De Censi et al., 2010; Sreenivasan et al., 2014). Además, hay evidencias que sugieren que esta biguanida actúa como un factor antienvjecimiento y modula la microbiota, promoviendo así la salud del paciente (Pryor y Cabreiro, 2015). Hoy en día, son cada vez más los estudios que indican que MF tiene un efecto osteogénico al promover la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC) y los preosteoblastos (Gao et al., 2008), (Cortizo et al., 2006). De hecho, a inicios de la pasada década, se demostró que este fármaco era capaz de inducir la diferenciación y mineralización de preosteoblastos en osteoblastos a través de la activación de la vía de señalización de la quinasa activada por AMP (AMPK) (Molinuevo et al., 2010). Es decir, se demostró que la metformina posee la capacidad de regenerar estructuras óseas en determinadas ocasiones, como resultado de su acción sobre las células encargadas de formar los huesos en nuestro organismo.

Los mecanismos precisos de acción de MF aún no se han dilucidado completamente, pero se sabe que en ellos pueden estar involucradas muchas vías. El mecanismo ampliamente aceptado de la acción de este fármaco es la estimulación de la proteína quinasa activada por monofosfato de adenosina (AMPK) (Zhou et al., 2001). La AMPK se activa por un aumento en la relación AMP: ATP en condiciones de estrés metabólico, incluidas la hipoxia y la deficiencia de glucosa (Hardie et al., 2007). Por lo tanto, AMPK

puede actuar como un indicador de los niveles de energía en las células. En los hepatocitos, MF se acumula dentro de la matriz mitocondrial y se dirige al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Una vez que se inhibe el complejo I, se produce una reducción de la producción de ATP y un aumento de los niveles de ADP y AMP, lo que conduce a la activación de AMPK, como describieron diversos autores (Owen et al., 2000; Viollet et al., 2012), el cual inhibe la transcripción de genes gluconeogénicos. Además, inhibe la lipogénesis, lo que mejora la sensibilidad a la insulina (Fullerton et al., 2013).

De esta forma, una vez demostrada la eficacia y seguridad de este fármaco a dosis normales en terapia de diversas patologías, se comenzaron a estudiar los posibles efectos de metformina, si esta se administraba a dosis bajas y durante un periodo de tiempo sostenido. De esta forma, se consiguieron demostrar progresivamente los efectos a largo plazo de la metformina a dosis bajas, y debido a la escasa biodisponibilidad oral (50-60 %) y la corta vida media de este fármaco (entre 1.5 y 1.6 horas), se hizo cada vez más necesario el desarrollo de formulaciones eficaces de liberación prolongada (Ghumman et al., 2020).

Debido a ello, se comenzaron a realizar diversos estudios con el fin de encontrar formulaciones de metformina incorporada en microesferas principalmente poliméricas ya que se demostró que las mezclas de ciertos polímeros podrían mejorar la eficiencia de encapsulación y la estabilidad del fármaco, a la vez que prolongar su tiempo de acción farmacológica (Ghumman et al., 2020). Los primeros estudios realizados sobre MF en este campo estaban principalmente dirigidos al tratamiento de la diabetes tipo 2 con el fin de que la prolongación en la liberación de MF permitiera mejor la biodisponibilidad, aumentar las concentraciones plasmáticas constantes del fármaco y también alcanzar una mejora en el cumplimiento de la farmacoterapia por parte del paciente (Khalid et al., 2020).

La consecución de todos estos puntos clave permitieron considerar el uso de polímeros para formular microesferas y la liberación controlada de la metformina, un logro notable en el campo de la formulación y administración del fármaco, llegándose a incrementar los tiempos de liberación del fármaco hasta 12 horas (Ghumman et al., 2020) y en algunos casos semanas o incluso meses (Bouriche et al., 2021), es decir, prolongándose

la liberación exponencialmente mediante el uso de microesferas de MF, en comparación del principio activo aislado. Esto permitió sentar las bases para posteriores estudios, los cuales ampliaron las fronteras del conocimiento, y evaluar el uso de estas microesferas cargadas con MF para otras patologías.

Si bien se ha demostrado que MF favorece la formación de hueso debido a sus múltiples funcionalidades, incluida la diferenciación osteogénica de las células madre (Houshmand et al., 2018). En la búsqueda bibliográfica llevada a cabo a cerca de encontrar indicios de que MF pudiera tener relación con el metabolismo óseo y la regeneración de estas estructuras, con el fin de elaborar una formulación de liberación prolongada para conseguir el objetivo descrito en la presente memoria, varios estudios demostraron que la MF realmente podría ayudar a mejorar la regeneración ósea y periodontal en pacientes diabéticos, siendo por tanto, lógico y beneficioso desarrollar una resina como base o revestimiento que contuviera el fármaco, para liberarlo y estimular la síntesis de minerales y la producción de dentina (Wang et al., 2019).

Sin embargo, el aspecto más desafiante es ofrecer un sistema reservorio óptimo y un sistema de liberación controlada para evitar la rápida dilución del principio activo, así como una liberación adecuada en el sitio óseo afectado. Para abordar estos obstáculos, estudios muy recientes han diseñado hidrogeles híbridos para la administración localizada de MF como molécula osteoinductora segura, de forma que se ha conseguido desarrollar un hidrogel bioactivo cargado con MF y con biomecánica ajustable como una solución terapéutica inyectable viable y mínimamente invasiva para la regeneración ósea (Qu et al., 2021).

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

En base a los antecedentes anteriores, se pone de manifiesto que el avance del estudio de MF como principio activo útil en gran diversidad de patologías diferentes a las ya conocidas, y su incorporación en nuevas formas farmacéuticas como microesferas poliméricas, y su posterior incorporación en hidrogeles, podrán permitir alcanzar velocidades de liberación muy prolongadas en el tiempo, permitiendo crear nuevas formas de administración que indudablemente reportarán una serie de ventajas en

términos de perfiles de liberación, biodisponibilidad, adherencia etc. en relación con el principio activo aislado y administrado de forma oral.

Por ello, el OBJETIVO GENERAL del presente trabajo de investigación es diseñar y caracterizar una formulación de MF en microesferas de ácido poliláctico vehiculada en un gel de hialuronato-Pluronic® F127 con el fin de prolongar el tiempo de liberación del fármaco y así conseguir cantidades muy bajas de liberación.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes OBJETIVOS PARCIALES:

1. Desarrollar una formulación de microesferas poliméricas de PLA que sean capaces de albergar MF en su interior, y llevar a cabo una liberación prolongada del mismo, aplicando para ello la herramienta del *Quality by design* para analizar los factores determinantes en el método de preparación de micropartículas de MF y evaluar la cantidad y calidad de la formulación final.
2. Desarrollar una formulación de hidrogel Pluronic/Hialuronato en el cual incorporar microesferas de MF alcanzándose una mayor prolongación en la liberación del principio activo.
3. Optimizar ambas formulaciones para asegurar una dosificación correcta, maximizar la compatibilidad entre el principio activo y los excipientes y también entre la formulación y la mucosa bucal.
4. Validar el método analítico por HPLC usado para asegurar que las medidas llevadas a cabo durante el estudio cumplen los criterios establecidos de calidad.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1. Puesta a punto del método analítico mediante Cromatografía líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Con el fin de cuantificar la MF que contendrían las microesferas elaboradas en este trabajo, se procedió a la puesta a punto de un método analítico específico para la molécula.

Para ello, se utilizó cromatógrafo de alta resolución o HPLC, el cual incorporaba una columna LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART 125-4, actuando la misma como fase

fija o estacionaria en el proceso analítico. A esta fase le complementó una fase móvil formada por un tampón dihidrogenofosfato de potasio (PBS) con una concentración 0.02 M ajustada a pH 6.8 y acetonitrilo (calidad HPLC), ambos en proporción 30:70, respectivamente. Así, la fase móvil fue fijada con un flujo de 1.5 mL/min y un volumen de inyección muestral de 10 µL. Todo ello fue conectado a un equipo de HPLC de la marca Hitachi Elite LaChrom.

La elección de cada uno de estos parámetros para poner a punto el método analítico no resulta de una elección al azar de los mismos, sino de un diseño experimental aplicando la metodología del *Quality-by-design*, seleccionando el modelo estadístico de Taguchi L8, en el cual se analizaron varias variables a fin de encontrar si existían diferencias significativas en el método al cambiarlas.

Las variables y sus niveles se recogen en la Tabla 1.

<b><u>FACTORES</u></b>	<b><u>NIVELES</u></b>
<b>Tipo de Fase Móvil Acuosa</b>	Agua miliQ
	Tampón PBS 0.02 M pH 6.8 (Fosfato)
<b>Flujo de Fase Móvil</b>	1 mL/min
	1.5 mL/min
<b>Composición de la Fase Móvil</b>	30 % PBS / 70 % Acetonitrilo
	50 % PBS / 50 % Acetonitrilo
<b>Temperatura del equipo</b>	25 °C
	40 °C

**Tabla 1. Variables estudiadas en la puesta a punto del método analítico.**

La matriz resultante de combinar adecuadamente los factores y niveles para el modelo de Taguchi arroja un total de 8 experimentos cuyas condiciones se recogen en la Tabla 2.

	Tratamiento			
Run	Fase Acuosa	Flujo	% Fase Acuosa	Temperatura
1	Fosfato	1	30	25 °C
2	Fosfato	1	50	40 °C
3	Fosfato	1.5	30	40 °C
4	Fosfato	1.5	50	25 °C
5	Agua	1	30	40 °C
6	Agua	1	50	25 °C
7	Agua	1.5	30	25 °C
8	Agua	1.5	50	40 °C

**Tabla 2. Matriz experimental de Taguchi L8.**

Una vez se procesaron todos los ensayos en HPLC, se pudo llevar a cabo la selección de las condiciones óptimas para la resolución del pico de MF y así poder aplicar el método para los siguientes estudios

### **3.2. Validación del método analítico**

El objetivo principal de la validación del método de cuantificación de MF será demostrar que el propio método analítico usado para este fin es apto y arroja resultados fiables. Para ello, se llevarán a cabo distintas pruebas analíticas que nos permitirán validar ciertos parámetros necesarios para asegurar la fiabilidad del método. De esta forma, los parámetros de validación que se estudiaron serán descritos a continuación.

#### **3.2.1. System suitability**

Esta prueba es utilizada para comprobar la idoneidad del sistema, es decir, verificar que el método analítico es adecuado para el propósito previsto del mismo. Este parámetro nos permite asegurar la calidad del método en las mediciones que llevamos a cabo. Para realizar esta prueba correctamente, se inyectó un estándar de MF de concentración 0.2 mg/mL un total de 6 veces, y posteriormente se calculó la Desviación Estándar Relativa (RSD), la cual debería situarse en valores inferiores al 2 % para demostrar que el método sea idóneo.

### **3.2.2. Especificidad o Selectividad**

Este parámetro nos permite medir el analito en cuestión, en este caso MF y evaluar la presencia, o no, de los otros componentes que pueden estar en la muestra de la fórmula pero que no deben ser cuantificados como MF.

Para ello, en primer lugar, se realizó una división de la formulación en dos partes; por un lado, los componentes de la fase acuosa de la doble emulsión y, por otro lado, la parte oleosa u orgánica; de esta forma el procedimiento se basó en elaborar soluciones acuosas de cada componente por separado y a la concentración en la que se encontraban en la formulación, y comprobar su espectro de absorción en HPLC a la longitud de onda de medida usada para medir MF durante todo el trabajo.

Así, se prepararon, por duplicado, las siguientes soluciones acuosas, con concentraciones:

Fase Acuosa:

- Solución de NaCl: 1.38 mg/mL
- Solución de PVA: 0.02 mg/mL

Fase Orgánica:

- Dispersión de PLA: 5.55 mg /mL
- Dispersión de Span® 80: 0.028 mL/mL

Una vez preparamos las soluciones por duplicado, éstas se filtraron con filtros de jeringa de 0.45 micras, para asegurar la no introducción de sólidos no disueltos en nuestro equipo de HPLC, y que los resultados sean comparables a los de las muestras finales analizadas. Tras el filtrado, se introdujo cada una de las soluciones en viales topacio de HPLC y se procedió a realizar el análisis de cada muestra a la longitud de onda de absorción de MF.

### **3.2.3. Estudio de degradación forzada**

Este estudio, como su propio nombre indica, nos ayudó a medir la estabilidad del fármaco ante situaciones de alto estrés y degradación, superiores a las que podrían darse en unas condiciones normales de elaboración, almacenamiento o distribución del

producto, de forma que, si ante estas condiciones, la MF en nuestro caso, no sufriera degradación, entonces sería completamente estable en condiciones normales.

El estudio de degradación forzada se llevó a cabo bajo diferentes condiciones posibles de inestabilidad del fármaco, resistencia a bases, ácidos, peróxidos, luz, o luz ultravioleta, cada uno de ellos será descrito posteriormente.

Para comenzar el procedimiento, se elaboraron 3 soluciones madre, una solución básica de NaOH (0.1 M), otra ácida de HCl (0.1 M) y otra solución con peróxido de hidrógeno 3 % v/v).

Una vez se prepararon las tres soluciones madre, se procedió a preparar cada prueba de degradación forzada.

#### ***3.2.3.1. Degradación básica***

Tras pesar 2.5 mg de MF, estos se llevaron a un matraz aforado de 25 mL y se disolvieron con 1 mL de agua al que se añadieron 0.5 mL de la solución preparada de NaOH 0.1M. Se dejó reposar la mezcla en el matraz durante 5 horas; posteriormente, se añadieron 0.5 mL de la solución de HCl 0.1 M para neutralizar el pH y se diluyó llenando el matraz con agua purificada hasta su aforo.

#### ***3.2.3.2 Degradación ácida***

Se pesaron, como en la anterior prueba, 2.5 mg de MF los cuales se llevaron a un matraz aforado de 25 mL y se disolvieron con 1 mL de agua, a lo que posteriormente se le añadió 0.5 mL de HCl 0.1 M, de modo que, al contrario que la anterior prueba, en la que se medía la resistencia a las bases de la metformina, en esta ocasión se midió la resistencia al ácido del principio activo. Para ello, también se dejó reposar la mezcla 5 horas, tras las cuales se añadieron 0.5 mL de la solución de NaOH 0.1 M y se llenó el matraz hasta aforo con agua purificada.

#### ***3.2.3.3. Degradación oxidativa con peróxidos***

Se pesaron 2.5 mg de MF, que se llevaron a un matraz aforado de 25 mL, al cual se le añadieron 1 mL de agua y 1 mL de la solución madre de peróxido de hidrógeno al 3 % v/v. Esta mezcla se dejó reposar durante 8 horas y tras ello se enrasó el matraz con agua purificada.



#### **3.2.3.4. Degradación solar**

Se pesaron 2.5 mg de MF y se llevaron a un matraz aforado de 25 mL al cual también se añadieron 15 mL de agua purificada y se dejaron reposar a luz de sol directa durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, se enrasó el matraz con agua purificada.

#### **3.2.3.5. Degradación por luz ultravioleta**

Se pesaron 2.5 mg de MF y se llevaron a un matraz aforado de 25 mL; en él se disolvió la MF con 15 mL de agua purificada y la mezcla se llevó a una campana de bioseguridad con luz ultravioleta a 254 nm durante 8 horas, tiempo tras el cual se recuperó el matraz y se enrasó con agua purificada.

Tras realizar cada uno de estos procedimientos, se recolectaron los 5 matraces de 25 mL y se extrajo una pequeña alícuota de aproximadamente 1 mL de cada uno de ellos, la cual se filtró con un filtro de jeringa de 0,45 micras y se llevaron respectivamente a 5 viales topacio para HPLC; de esta forma, se comenzó un nuevo análisis cromatográfico a la longitud de onda de absorción de la MF y se comprobaron las áreas correspondientes a cada muestra comparándolas siempre con un estándar de MF elaborado en ese mismo día.

#### **3.2.4. Linealidad**

Este parámetro nos permite verificar que cada una de las muestras analizadas se encuentran dentro de un rango en el cual las respuestas del equipo se corresponden proporcionalmente con las variaciones de concentración de metformina en cada muestra. El estudio se llevó a cabo mediante la preparación de distintos niveles de concentración, en porcentaje, de una cantidad definida de metformina en solución. Esta se fijó en 0.2 mg/mL, la cual supondría una muestra definida como 100 % de MF. Posteriormente se elaborarían los demás niveles correspondientes al 50 %, 75 %, 125 % y 150 % del fármaco, es decir, variaciones en la concentración del principio activo en solución.

Para comenzar, se elaboró una solución madre con una concentración de 0.5 mg/mL.

Posteriormente, a partir de la solución madre se obtuvo el estándar de MF de concentración 0.2 mg/mL representando la muestra de 100 %. Al igual que se preparó esta solución, también se siguieron los mismos cálculos para la preparación de los demás niveles:

- **Nivel 100 %:** 0.2 mg/mL (4 mL de la solución madre y llevados a 10 mL con agua miliQ).
- **Nivel 50 %:** 0.1 mg/mL (2 mL de la solución madre y llevados a 10 mL con agua miliQ)
- **Nivel 75 %:** 0.15 mg/mL (3 mL de la solución madre y llevados a 10 mL con agua miliQ)
- **Nivel 125 %:** 0.25 mg/mL (5 mL de la solución madre y llevados a 10 mL con agua miliQ)
- **Nivel 150 %:** 0.3 mg/mL (6 mL de la solución madre y llevados a 10 mL con agua purificada)

Una vez se elaboraron por triplicado cada una de las soluciones descritas, se extrajo una alícuota de aproximadamente 1 mL de cada una de ellas, y se pasó por un filtro de jeringa de 0.45 micras, y se analizaron por HPLC.

- **Test de homogeneidad de varianzas:** Con el fin de determinar si la concentración de los analitos representa un factor de influencia en la variabilidad de los resultados, se llevó a cabo el test de Cochran o también denominado de homogeneidad de varianzas, en el cual se compara el valor de G calculada ( $G_{exp}$ ) y G tabulada ( $G_{tab}$ ), de forma que si se cumple que  $G_{exp} < G_{atb}$  entonces existe una homogeneidad de varianza en el estudio de la relación concentración-área realizado.

Para ello se calcularon en primer lugar los factores de respuesta (Figura 1) y las varianzas de las tres repeticiones de cada uno de los niveles dispuestos para el cálculo de la linealidad. Se escogió la varianza máxima de todas ellas, y entre ellas se dividió el sumatorio del resto de varianzas, obteniéndose así la  $G_{exp}$  a partir de su fórmula (Figuras 2), posteriormente, se hizo una comparativa con la  $G_{tab}$  para resolver la homogeneidad o heterogeneidad de las varianzas en este caso.

$$f = \frac{Area}{concentration}$$

**Figura 1. Fórmula para el cálculo de  $G_{exp}$ .**

$$G_{exp} = \frac{Var_{max}}{\sum_1^k var}$$

**Figura 2. Fórmula para el cálculo de factor de respuesta.**

**-Test de proporcionalidad:** Con el fin de obtener una visión general de la proporcionalidad de los resultados obtenidos del cálculo de área a partir de una determinada concentración definida en HPLC, se decidió llevar a cabo este estudio, el cual en condiciones ideales debería resultar en una recta con la mínima curvatura posible, indicado así la proporcionalidad de los valores obtenidos con el uso del método analítico seleccionado. Esto nos permite establecer el criterio de aceptación, de forma que para que el test de proporcionalidad sea válido, el valor del coeficiente de correlación ( $r^2$ ) en la recta de regresión debe ser  $r^2 \geq 0.990$

**- Test de la pendiente:** La función que sigue un procedimiento analítico, es la relación existente, dentro de un rango específico, entre el área y la concentración del analito. De esta forma, para cada nivel concentración descrito en la linealidad, existirá un factor de respuesta (f), el cual sigue la fórmula  $f = \text{área}/\text{concentración}$ . Al representar cada uno de los valores de área con respecto a la concentración, se obtendrá una recta. Con el fin de establecer un criterio de aceptación para este ensayo, se estableció que el RSD del factor de respuesta debía ser  $\leq 2\%$ .

### **3.2.5. Linealidad baja**

Para asegurar que la linealidad del método se mantiene aún en rangos de valores muy bajos o incluso casi indetectables para otros instrumentos, se llevó a cabo la medición de la linealidad a baja escala. Esta medida se realizó diluyendo cien veces todas las muestras del apartado anterior que se usaron para el cálculo de la linealidad, es decir, tomamos 1 mL de las muestras y lo llevamos a un matraz de 100 mL el cual se enrasó con agua miliQ, consiguiendo así una dilución 1:100. De estos matraces se recogió 1 mL y se llevó esta alícuota a viales topacio para volver a realizar mediciones en HPLC.

Del mismo modo que con la linealidad, se llevaron a cabo en este apartado también tres estudios adicionales que permitiesen asegurar el cumplimiento de la linealidad baja del método analítico.

**- Test de homogeneidad de varianzas:** Al igual que se hizo en el estudio de linealidad, se calcularon las varianzas de las tres repeticiones de cada uno de los niveles, esta vez mucho menores, que fueron establecidos para el cálculo de la linealidad baja. Posteriormente se calculó  $G_{\text{exp}}$  siguiendo la fórmula de las Figura 2, y se comparó con

$G_{\text{tab}}$ . En este estudio, el criterio de aceptación se fijó igualmente en el cumplimiento de  $G_{\text{exp}} < G_{\text{atb}}$ .

- **Test de proporcionalidad:** Se elaboró una recta de calibrado comparando los valores área/concentración, y se obtuvo la línea de tendencia de la recta obtenida, así como su coeficiente de regresión, considerándose como criterio de aceptación para el test, el requisito de que  $r^2 \geq 0,990$ .

- **Test de la pendiente:** Al igual que se realizó una gráfica en el test de la pendiente para el cálculo de la linealidad, en este caso también se llevó a cabo la elaboración de una recta factor de respuesta/concentración, y se calculó la media total de desviación estándar relativa (%RSD), con el fin de comprobar si el resultado del test cumpliera el criterio de aceptación  $\%RSD \leq 2\%$ .

### **3.2.6. Precisión o Repetitividad**

Este parámetro nos permite evaluar la existencia de errores en el instrumento de medición, en este caso del HPLC, o errores aleatorios en el proceso de medida del método analítico.

#### **- Repetibilidad de la inyección**

Para ello, se preparó una solución estándar de metformina con una concentración de 0.2 mg/mL se llevó aproximadamente 1 mL a un vial topacio para HPLC previamente filtrado con filtro de jeringa de 0.45 micras y se procedió a analizar la muestra 10 veces consecutivas. Posteriormente, se llevó a cabo el cálculo de la desviación estándar relativa, con el mismo criterio de aceptación que el apartado anterior, es decir, no debiendo superar 2 %.

#### **- Repetibilidad del análisis**

Para llevar a cabo este estudio, se elaboraron diluciones de una solución de metformina estándar con el fin de comprobar si el método conservaba su repetibilidad en un rango de concentraciones de la muestra, distinto del valor estándar de 0.2 mg/mL, de esta forma se elaboraron una solución de 0.1 mg/mL que representaría un valor del 50 % de la concentración estándar, y otra solución de 0.3 mg/mL representando un 150 % de la concentración estándar. Una vez preparada cada una de las tres diluciones, se realizaron

inyecciones en HPLC de cada una de ellas por triplicado. Una vez obtenidas las áreas de cada medida, se llevó a cabo el cálculo de desviación estándar relativa (RSD), el cual debe ser menor al 2 % para cumplir el criterio de aceptación.

#### **- Precisión intermedia**

Con el fin de evaluar las diferencias en los resultados y su significancia en el proceso analítico, derivadas del analista, se realizó el estudio de precisión intermedia el cual permite comparar los resultados de distintos operadores, y aportar un mayor análisis de la repetibilidad del método. Para ello, se llevó a cabo el estudio de la siguiente forma. Cada operario realizó dos inyecciones al día durante dos días de un estándar de metformina. Se prepararon 2 estándares de MF en solución, por tanto, cada operario repitió el proceso dos veces; dos inyecciones al día del Estándar 1 y dos inyecciones al día del Estándar 2, durante dos días ambas. Posteriormente, se calculó la media de cada grupo de datos obtenido, y se llevó a cabo el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD), a fin de comprobar si se cumplía el criterio de aceptación de RSD menor al 2 %.

#### **3.2.7. Límite de cuantificación (LOQ)**

El límite de cuantificación es la concentración mínima a la cual una muestra puede ser cuantificada mediante un equipo de análisis con un nivel de exactitud y precisión aceptables. Para llevar a cabo este estudio, se realizaron una serie de diluciones de una muestra de metformina en solución, y se analizaron todas ellas, en orden de concentración decreciente en HPLC, de forma que cada muestra presentara un menor valor de área debido a la bajada de concentración progresiva de metformina en cada una de las muestras, hasta el punto en el cual el área de pico de metformina en el espectro de HPLC no puede ser cuantificada conservando la exactitud y precisión, en este punto de concentración se establece el LOQ. Para realizar el ensayo se preparó una solución madre de MF de concentración 0.2 mg/mL que representa el 100 % de concentración; a partir de ella se realizaron diluciones de concentración decreciente que representaban los valores de 1 %, 0.75 %, 0.5 % y 0.25 %.

Una vez se prepararon, se llevaron al HPLC para determinar sus áreas, hasta alcanzar la última área que podía ser cuantificable del grupo de muestras.

### **3.2.8. Límite de detección (LOD)**

El límite de detección se define como la concentración más baja a la cual un analito puede ser detectado, aunque este pueda no ser cuantificado necesariamente, es decir, en este estudio se buscó la mínima concentración que produjera señal de área de MF en el cromatograma, aunque esta misma área no pueda cuantificarse.

Para llevar a cabo el estudio se realizaron, al igual que en el estudio del LOQ, diluciones de concentraciones con valor de 1 %, 0.75 %, 0.5 % y 0.25 % y además se preparó una última de 0.1 % ya que la anterior seguía siendo detectable y también cuantificable.

De la misma forma, se siguió el procedimiento de análisis en HPLC de cada una de las muestras hasta llegar a la concentración mínima detectable por el equipo, fijándose así el valor de LOD.

### **3.3. Preparación y Síntesis de Microesferas de PLA cargadas con Metformina**

La microencapsulación por evaporación de solventes se usa principalmente en la industria farmacéutica para obtener formulaciones de liberación controlada. Existen diferentes métodos disponibles para usar la microencapsulación mediante la técnica de evaporación de solventes. La selección de un método que proporcione una encapsulación adecuada del fármaco generalmente depende de la hidrofilia o lipofilia de las moléculas activas (Li et al., 2008). Así, el método de aceite en agua (o/w) generalmente se adopta para la encapsulación de agentes activos insolubles o poco solubles en agua.

Sin embargo, esta técnica falla cuando se trata de la encapsulación de agentes altamente hidrofílicos. Esto se debe a que el agente activo puede difundir en la fase continua durante la formulación o puede no disolverse en el solvente orgánico. En estos casos, las emulsiones múltiples juegan un papel fundamental. El tipo más común de emulsiones múltiples es la emulsión de agua en aceite ( $w_1/o/w_2$ ) de forma que la mayoría de los fármacos hidrófilos se han encapsulado mediante este método (Crotts y Park, 1998; Okochi y Nakano, 2000; Sinha y Trehan, 2003). El agente soluble en agua se solubiliza dentro de la fase  $W_1$  (fase interna de la primera emulsión), que luego muestra una liberación prolongada del fármaco, efectos tóxicos menores y alta eficacia de encapsulación del agente activo (Nakhare y Vyas, 1996).

Debido a que MF es una molécula hidrófila, se decidió llevar a cabo el método de la doble emulsión seguido de evaporación del solvente, a fin de obtener microesferas estables y con alta eficacia de encapsulación. En cuanto al procedimiento detallado de la elaboración de la formulación, se llevaron a cabo estudios preliminares para intentar optimizar el proceso de síntesis de las microesferas.

Entre los estudios preliminares, con el fin de encontrar la forma más sencilla, rápida y sobre todo efectiva en términos de evitar pérdidas de principio activo, se realizó un estudio de cribado de varios de los factores descritos hasta el momento mediante un diseño experimental del tipo matriz ortogonal de Taguchi L9, que nos permitiese elegir la combinación de factores que proporcionaban una formulación de mayor calidad. Entre los factores elegidos para llevar a cabo el estudio del diseño experimental final, se escogieron las cantidades de MF (10 mg, 25 mg o 40 mg) y NaCl (1 %, 3 % o 5 %) totales en la formulación, el proceso de evaporación de solvente orgánico (Evaporación en campana, en rotavapor a temperatura ambiente, o rotavapor a 40 °C) y el número de lavados de la formulación antes de su secado (1, 2 o 3).

Con todos estos parámetros, se creó el siguiente diseño experimental (Tabla 3):

<b>Experimento</b>	<b>Metformina (mg)</b>	<b>NaCl (%)</b>	<b>Proceso de evaporación</b>	<b>Número de lavados</b>
<b>1</b>	10	1	Campana	1
<b>2</b>	10	3	Rotavapor TA	2
<b>3</b>	10	5	Rotavapor 40 °C	3
<b>4</b>	25	1	Rotavapor TA	3
<b>5</b>	25	3	Rotavapor 40 °C	1
<b>6</b>	25	5	Campana	2
<b>7</b>	40	1	Rotavapor 40 °C	2
<b>8</b>	40	3	Campana	3
<b>9</b>	40	5	Rotavapor TA	1

**Tabla 3. Diseño experimental. Matriz ortogonal de Taguchi L9 (TA: temperatura ambiente).**

Tras realizar estos ensayos y caracterizar las muestras obtenidas de una forma rápida y sencilla basándonos principalmente en el aspecto visual de las microesferas al microscopio y comparando con las formulaciones realizadas anteriormente, se concluyó que la liofilización no era un proceso rentable en cuanto al coste/tiempo/calidad de la fórmula; por tanto, se descartó este proceso y tras una breve revisión bibliográfica, se decidió filtrar el producto acuoso de la doble emulsión obteniendo así las microesferas húmedas en papel de filtro, del mismo modo se comprobaron que parámetros nos permitían obtener mejores lotes, y finalmente se elaboró el procedimiento final.

Los lotes finales se prepararon mediante el proceso descrito anteriormente, de doble emulsión  $W_1/O/W_2$  con extracción de solvente. Para ello, se disolvieron 100 mg de PLA-A (Resomer L207S) en 5 mL de diclorometano (DCM). A esta mezcla se añadieron 50 microlitros de Span<sup>®</sup> 80. En otro vial distinto con 0.5 mL de agua, se disolvieron 40 mg de MF y 25 mg de NaCl. Mediante goteo, con ayuda de una jeringa de 5 mL se añadieron los 0.5 mL de fase acuosa sobre la fase orgánica mientras se emulsionaba en frío a 9000 rpm durante 1 minuto en el homogeneizador UltraTurrax. Una vez terminado este proceso, se ha obtenido la emulsión  $W_1/O$ .

Para formar la segunda emulsión, se usó un homogeneizador IKA el cual se sometió a 1000 rpm durante 2 min agitando 7.5 mL de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA) pH 4 al 2 % p/v. Sobre esta solución de PVA se añadió mediante goteo, y en frío, la emulsión formada anteriormente, y por acción del homogeneizador se dispersará la misma y se formará la doble emulsión  $W_1/O/W_2$  ya estable. En este punto, la obtención de microesferas sólidas tuvo lugar añadiendo 10 mL más de PVA; todo ello se vertió en un vaso de precipitado de 100 mL con agitador mecánico, y se introdujo en campana de extracción con un agitador IKA RT1 Werke a una velocidad de 400 rpm hasta evaporación del DCM; una vez evaporado el solvente, se procedió a la filtración de la formulación, usando Kitasato con bomba de vacío. Se realizaron dos filtraciones consecutivas con cambio de filtro. Para las filtraciones se usaron, en primer lugar, un filtro grosero, del cual se recogió tras la primera filtración gran parte de producto, y en segundo lugar filtros de 0.45 micras de tamaño de partícula evitando así con la primera filtración una colmatación temprana de este filtro más fino. Tras la recolección del líquido filtrado de la primera filtración, este mismo se hace pasar por el filtro de 0.45 micras y se recoge el



producto sólido filtrado. Antes de desechar este filtro, se realizó un lavado con 10 mL de agua purificada y se recogieron cada uno de los líquidos filtrados sucesivamente para su posterior análisis en HPLC. Finalmente, el producto sólido obtenido se introdujo en un eppendorf y se llevó a una estufa programada a 37 °C durante 24 horas para el secado de las microesferas. Transcurrido el tiempo se obtuvo un polvo blanco de microesferas que pasaron a ser caracterizadas

### **3.4. Caracterización de las microesferas de metformina**

Para llevar a cabo la caracterización de las microesferas de MF se llevaron a cabo diferentes análisis que nos permitieron evaluar aspectos morfológicos, químicos y funcionales de las mismas. Por ello se decidieron realizar los siguientes estudios al finalizar el proceso de elaboración de las mismas para evaluar su calidad final.

#### **3.4.1. Morfología**

Probablemente fue uno de los estudios más sencillos debido a que se realizó mediante examen en microscopio óptico. Este análisis no precisó de cálculos adicionales, sino simplemente un estudio a simple vista de una alícuota de microesferas secas dispersas en una gota de agua. Para realizar este estudio se utilizó el microscopio óptico Olympus BH-2 en un rango de distintos objetivos 10X, 40X y 100X.

#### **3.4.2. Eficacia de encapsulación**

Para llevar a cabo el cálculo de la eficacia de encapsulación, se recolectó el líquido sobrante tras el filtrado de las microesferas ya elaboradas, el cual contendría en solución la MF que no había sido encapsulada dentro de las microesferas.

De esta forma, al calcular en HPLC la concentración de MF en el líquido, sabríamos la cantidad de fármaco no encapsulado, y mediante un sencillo cálculo por diferencia, podríamos también conocer la cantidad que sí se había conseguido incorporar dentro de las microesferas. A partir de este dato, se efectuó el cálculo de la eficacia de encapsulación en porcentaje.

#### **3.4.3. Compatibilidad fármaco-excipientes**

##### ***3.4.3.1 Calorimetría diferencial de barrido***

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) es una técnica de análisis térmico adecuada para determinar la pureza, las formas polimórficas y el punto de fusión de una muestra en la Industria Farmacéutica. También se considera una herramienta para estudiar el

comportamiento térmico de las bicapas lipídicas y de los sistemas de administración de fármacos lipídicos, como los liposomas, mediante la medición de parámetros termodinámicos como la entalpía y la temperatura máxima, que afectan la estabilidad de la suspensión liposomal en determinadas condiciones de almacenamiento (Demetzos, 2008)

Con esta técnica de análisis térmico se obtienen los denominados termogramas, gráficos que nos permiten describir el comportamiento de cada uno de los fármacos o excipientes incluidos en una formulación, e incluso de la propia formulación. Los termogramas se componen de picos generados a partir de los cambios fisicoquímicos en la muestra, resultantes de un aumento exponencial de la temperatura. De esta forma, cada uno de estos picos será mayor o menor en base y altura, y por tanto en área dependiendo de ciertos parámetros como la masa de la muestra a analizar, el proceso físico o químico que haya sufrido al aumentar su temperatura, y la entalpía del proceso.

En este proyecto se analizaron varias muestras, compuestas tanto por el principio activo y los excipientes por separado, como por mezclas activo-excipiente y la formulación final, con el fin de encontrar diferencias en los termogramas dependiendo de la composición de la muestra. En nuestro caso se realizó el análisis de un total de nueve muestras, cuatro de ellas de componentes de la formulación puros: MF, PLA, NaCl, PVA y el resto de ellas mezclas de componentes, entre las cuales se analizaron, mezcla física de MF y PLA en proporción 50 %, mezcla física de MF y PVA en proporción 50 %, mezcla física de MF y PLA en proporción de formulación final, mezcla física de MF, PLA y NaCl en proporción 33 % cada componente, y una última de microesferas ya elaboradas.

Para llevar a cabo este análisis, se utilizó un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC-131 Setaram, France) y las muestras, con una masa total entre 5 y los 10 mg, se insertaron en crisoles de aluminio cubiertos con tapas de aluminio perforadas que permitieran salir los gases resultantes del proceso de calentamiento y evaporación de ciertos componentes de la muestra introducida. Para llevar a cabo el análisis en unas condiciones estandarizadas y asegurar la integridad del proceso independientemente de la naturaleza de la muestra a medir, se establecieron una serie de parámetros dentro del instrumento, como el intervalo de temperaturas comprendido entre los 30 y los 350

°C, velocidad de calentamiento de la muestra de 10 °C/min y una atmosfera de aire estática dentro del mismo.

#### **3.4.3.2 Microscopía en platina caliente**

La microscopía en platina caliente (HSM) es una técnica de análisis térmico que combina las mejores propiedades del análisis térmico y la microscopía. HSM se utiliza para admitir y complementar observaciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC), entre otros, así como para detectar pequeños cambios en la muestra que la DSC pueden pasar por alto durante un experimento térmico. Mediante el uso de la técnica HSM, se puede llevar a cabo un estudio sobre las propiedades físicas y químicas, como la morfología de la muestra, la naturaleza cristalina, el polimorfismo, la desolvatación, la miscibilidad, la fusión, las transiciones de estado sólido y la incompatibilidad entre varios compuestos farmacéuticos (Kumar et al., 2020). Igualmente, la técnica de HSM también se usa ampliamente para filtrar cocristales, excipientes y polímeros para dispersiones sólidas.

Con el fin de establecer las temperaturas de fusión de cada uno de los compuestos y el comportamiento de los mismos tanto juntos como por separado al aplicarles altas temperaturas, se decidió realizar el estudio de la microscopía en platina caliente para complementar los termogramas de DSC con material más visual como serían imágenes reales de un microscopio óptico del proceso de fusión e incluso evaporación de ciertos componentes de la formulación para explicar con mayor detalle su funcionamiento.

Para llevar a cabo esta técnica, se utilizó un portaobjetos de vidrio sobre el cual se colocó la muestra, a la cual posteriormente se le aplicó un aumento de temperatura gradual para observar cambios físicos y morfológicos de la misma, de forma que se pudiese confirmar junto a la técnica utilizada anteriormente, las temperaturas de fusión de cada compuesto de la fórmula, e incluso la temperatura de ebullición del agua contenida en la misma, aunque fuese en bajísima proporción.

### **3.5. Formulación y caracterización del gel**

#### **3.5.1. Composición del gel**

Los hidrogeles termosensibles son un tipo de macromoléculas de liberación sostenida de fármacos excepcionales compuestos de biomateriales naturales o sintéticos, que son capaces de formar hidrogeles, nanopartículas y membranas termosensibles (Wen et al., 2020). Estos sistemas de hidrogel han recibido una atención considerable debido a su

baja toxicidad, buena liberación sostenida, capacidad para mantener la actividad biológica del fármaco, buena biodegradabilidad y biocompatibilidad, y propiedad de liberación sostenida (Zheng et al., 2019).

Pluronic® F127 es un copolímero que puede someterse a una disolución y transición de gel a temperatura y pH casi fisiológicos para formar un hidrogel sensible a la temperatura. Estos hidrogeles son líquidos a temperatura ambiente, pero gelifican cercano a la temperatura corporal o cambian el pH, lo que representa un sistema controlado de administración de fármacos (Ci et al., 2017). Debido a su buena hidrofilia, biocompatibilidad y liberación sostenida, manteniendo la actividad biológica de los fármacos, el hidrogel Pluronic® F127 se ha utilizado ampliamente en los sistemas de administración de fármacos.

Por otra parte, se decidió adicionar hialuronato sódico de alto peso molecular a la formulación, no solo para mejorar la resistencia mecánica del hidrogel, sino que también permitirá una liberación sostenida del fármaco (Jung et al., 2017)

De esta forma, se decidió elaborar un gel a partir de la combinación de Pluronic y ácido hialurónico con el fin de obtener una formulación de gran resistencia mecánica, pero con cierta fluidez y que permitiera incorporar las microesferas de MF y prolongar la liberación del principio activo aún más en el tiempo. Así, el principal objetivo de la formulación de este gel sería combinar las propiedades gelificantes del poloxámero Pluronic® F127 a temperatura corporal, y aprovechar su flexibilidad y fluidez a temperaturas más bajas para incorporar las microesferas previamente a la gelificación, y añadir cierta proporción de ácido hialurónico aprovechando su alta biocompatibilidad, su mayor densidad que aportaría mucoadhesividad a la fórmula, su resistencia mecánica y su poder en la liberación controlada de principios activos contenidos dentro de su red de gel.

Para la elaboración de este gel, se utilizaron Pluronic® F127 e hialuronato sódico en proporciones 80: 20, respectivamente. Para ello se comenzó preparando una solución de Pluronic al 17 % p/p en agua, disolviendo 17 g de Pluronic en un total de 83 g de agua adicionando poco a poco el polímero al líquido mientras la mezcla se agitaba de forma continua en el homogeneizador IKA RT1 Werke y se alojaba en un recipiente con baño

de hielo, ya que las bajas temperaturas disminuyen la viscosidad del Pluronic y permiten una elaboración más sencilla.

Por otra parte, se preparó una solución al 3 % p/v de hialuronato sódico en agua y se dejó reposar durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se estableció un peso total de gel final de 3 g, del cual se calculó el 80 % que sería la parte de Pluronic y el 20 % la parte de hialuronato.

### **3.5.2. Incorporación de microesferas en gel**

Debido a la mayor fluidez del gel Pluronic respecto al gel de hialuronato, la incorporación de las microesferas se realizó sobre el gel Pluronic en primera instancia para posteriormente añadir el segundo gel. Se estableció una proporción fija de microesferas por unidad de gel, para asegurar que todos los lotes de gel contuvieran la misma cantidad de microesferas y, por tanto, de principio activo. Esta cantidad definida previamente fueron 35 mg de microesferas por cada gramo de gel; por tanto, se incorporaron 35 mg en 0.8 g de Pluronic mediante agitación en frío para disminuir la viscosidad del gel y facilitar el proceso; posteriormente se añadieron 0.2 mg de hialuronato por cada gramo total de gel que se preparó. Toda la mezcla se agitó manualmente y, posteriormente, en vortex, almacenándose en nevera para evitar la contaminación biológica y/o degradación de los geles.

### **3.5.3. Caracterización de microesferas en gel**

#### ***3.5.3.1. Estudio reológico***

Como cualquier formulación farmacéutica, uno de los puntos más importantes a tener en cuenta es el estudio de la reología de la misma. Para llevar a cabo el análisis reológico completo y conocer las interacciones de la fórmula con el medio y las interacciones entre los componentes de la formulación, se estudiaron tres parámetros principalmente, a partir de los cuales se pudieron extraer las conclusiones; estos fueron el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), el módulo de pérdida ( $G''$ ) y la tangente del ángulo de desfase, los cuales nos permiten describir el comportamiento viscoelástico de los materiales, y se relacionan entre los tres de la siguiente forma,  $\tan \delta = G''/G'$ .

De esta forma, cuando los módulos de almacenamiento y pérdida coinciden matemáticamente, o gráficamente al cruzarse en la representación, la tangente es igual a 1, punto en el cual existe un cambio de las propiedades viscoelásticas de la muestra.

Para obtener estos valores, se estudiaron las muestras en un Reómetro de placas paralelas de 40 mm de diámetro (Discovery HR-3 hybrid rheometer, TA Instruments, New Castle, DE, USA). Las condiciones a las que se realizaron los ensayos fueron establecidas en el instrumento a unos valores fijos de 15-65 °C de rango de temperatura, velocidad de 2 °C por minuto, frecuencia de 1 Hz y un estrés oscilatorio de 0.1 %.

### **3.5.3.2. pH**

Con el fin de controlar en todo momento el pH tanto de reactivos, compuestos de la formulación y las formulaciones finales para evitar variaciones indeseables, se llevaron a cabo medidas de pH a todos ellos utilizando un pHmetro pH/ORP Edge Dedicated.

### **3.5.3.3. Mucoadhesividad**

Debido a la complejidad instrumental de este ensayo, se tomó como referencia el equipo utilizado para el mismo fin en trabajos anteriores (Nakamura et al., 1996) para realizar este ensayo se podría dividir el proceso en dos grandes partes.

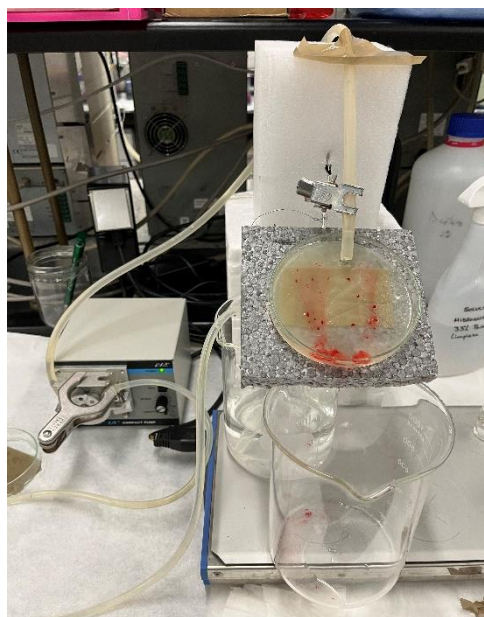
La primera parte fue la elaboración de una solución caliente de agar/mucina al 1 % y al 2 %, respectivamente, en un tampón fosfato a pH 6. Una vez elaborada esta solución y aún caliente en un baño de calor, esta se extendió sobre placas de Petri hasta alcanzar un grosor de capa de unos 0.25 g/cm<sup>3</sup>. Las placas se dejaron enfriar y gelificar a una temperatura de unos 4-8 °C durante un tiempo de aproximadamente 3 horas, tiempo tras el cual y alcanzada la gelificación de la solución agar/mucina, se equilibraron durante una hora a temperatura de 22 °C y humedad relativa del 79 %, utilizando una solución de sulfato amónico saturado en una cámara para conseguirla.

Posteriormente, la segunda parte del ensayo fue la puesta a punto del propio instrumento de ensayo (Figura 3) mediante la construcción de una estructura de polispán a la cual se fijó la placa de Petri anteriormente preparada con un ángulo de inclinación de 45 °. Una vez formada la estructura, se elaboró una solución de saliva artificial de la cual se anexa su composición en la tabla 4.

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	19 mg/mL
KCL	2240 mg/mL
CaCl <sub>2</sub>	103 mg/mL
H <sub>2</sub> PO <sub>2</sub>	544 mg/mL

**Tabla 4. Composición química de saliva artificial a pH 7.**

Esta solución de saliva artificial se hizo recircular por medio de una bomba peristáltica a través de un tubo de silicona desde un vaso de precipitado de 1L que contenía el reservorio de saliva artificial, hasta la placa de Petri sobre la cual se colocó el gel, justo a la altura de la placa a la cual la saliva artificial caía sobre él, gota a gota, simulando la fluidez de saliva sobre el gel en la cavidad bucal, de forma que el gel se desplazaba poco a poco por gravedad y acción de la saliva artificial hacia la parte baja de la placa de Petri.



**Figura 3. Equipo desarrollado para el ensayo de mucoadhesividad**

El principal objetivo de este ensayo era calcular el tiempo de desaparición del gel de la placa de Petri, para estimar si el gel se adhiere en mayor o menor medida a la placa de la misma forma que haría en la cavidad bucal. Para facilitar el estudio y el cálculo del tiempo, se añadió un colorante, rojo cochinilla, al gel de Pluronic/Hialuronato, permitiendo así hacer mucho más visual el proceso y evaluar la desaparición completa del gel, algo que, siendo este transparente, se complicaba.

#### **3.5.3.4. Tiempo de gelificación**

Como se comentó previamente en el apartado de formulación del gel, el Pluronic, al igual que el ácido hialurónico, son geles sensibles a la temperatura y tienen una pequeña ventana de temperatura en la cual su viscosidad puede cambiar en gran medida,

pasando de geles muy fluidos a geles muy sólidos o viceversa con cambios de unos pocos grados centígrados.

Debido a que la composición del gel formulado en nuestro trabajo era una mezcla de dos geles y otros componentes integrados con las microesferas, era interesante y necesario determinar el tiempo de gelificación por el método de inversión de cada una de las formulaciones: gel blanco, gel con MF y gel con microesferas, en un vial. Para llevar a cabo el método de inversión, se preparó un baño termostatzado a 37 °C y 3 viales, cada uno de los cuales portaba una muestra de gel de 1 gramo de las descritas anteriormente.

Se sumergieron cada uno de los viales en el baño y se sacaron en intervalos de 5 segundos, dejando entre intervalo un tiempo para la estabilización de la muestra y observar si se había producido la gelificación o, por el contrario, era necesario más tiempo a la temperatura del baño, la cual simulaba la temperatura de la cavidad bucal en la que serían aplicados los geles en la práctica real.

Tras extraer los geles del baño cada 5 segundos, la comprobación que se realizaba para visualizar la gelificación era una simple inversión del vial, observándose desplazamiento por gravedad del gel si este no había gelificado, o manteniéndose en el fondo si por el contrario sí había gelificado.

### **3.6. Estudio de permeación *in vitro***

Una vez incorporadas las microesferas en el gel y caracterizada la formulación, se decidió llevar a cabo un ensayo de permeación *in vitro* a través de membranas artificiales utilizando celdas de difusión de Franz, con el fin de evaluar la capacidad del gel de permear a través de la membrana a través del tiempo y calcular la cantidad de principio activo capaz de difundir de la formulación a la celda a lo largo del tiempo.

Para llevar a cabo este ensayo, se necesitaron varios equipos, como una bomba peristáltica con tubos de silicona, y un equipo de permeación dotado de termostato y celdas de difusión de Franz.

Al igual que los anteriores ensayos, uno de los objetivos del estudio de permeación es replicar de la forma más precisa posible las condiciones de la cavidad bucal, ya que será el tejido diana de aplicación de nuestra formulación final, para conseguir asimilar lo



máximo posible nuestro instrumento de laboratorio con las estructuras fisiológicas de la boca. Para ello, se se utilizó saliva artificial cuya composición fue descrita anteriormente, membranas sintéticas de nitrato de celulosa de 0.22 micras hidratadas con tampón PBS de dihidrógeno de fosfato e hidrogenofosfato de potasio a pH 7.4 estabilizadas durante 1 hora, y agua recirculante alrededor de las celdas a una temperatura de 37 °C.

Para comenzar el ensayo, se llenaron los compartimentos receptores de las celdas con la solución PBS en agitación continua con imán y se sellaron con papel de Parafilm evitando su evaporación y se activó circuito de agua recirculante a temperatura fisiológica; posteriormente, se colocaron las membranas de nitrato de celulosa y se acoplaron sobre ellas cada uno de los compartimentos donadores.

Sobre los compartimentos donadores se incorporó 1 g de gel conteniendo 35 mg de microesferas, y se añadió 0.5cmL de saliva artificial para favorecer la liberación, tal y como ocurriría en un caso real en la boca. llenándose en total seis celdas, en las que se encontraban las muestras por duplicado de gel con MF, gel con microesferas y una solución control de MF. De esta forma, a intervalos determinados de tiempo establecidos a las 1,2, 3, 4, 5, 6, 24 h tras comenzar el ensayo, se tomaron alícuotas de 1 mL del compartimento aceptor, reponiendo en el mismo el volumen extraído con tampón PBS permitiendo así la existencia de una cantidad constante de tampón a lo largo del estudio.

Finalmente, se llevaron las alícuotas a viales topacio para su cuantificación en HPLC, permitiéndonos así calcular la cantidad de MF que difundió a través de la membrana a lo largo del estudio, hora por hora, y el fármaco total permeado al final del estudio en cada una de las celdas.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Preparación del método analítico**

En este caso, se diferenció claramente que la fase acuosa debía ser tampón fosfato para conseguir buenos resultados, y a esto se le sumó un flujo de 1.5mL y los valores de ratio de fase acuosa/orgánica y temperatura del horno ya descritos al principio de este

apartado. Al analizar cada pico de los 8 ensayos, se observó que ciertos Run, como el 3 y 4, presentaban buena área, simetría y tiempos de retención acordes a la metformina pura, pero se observaba cierto “Peak Tailing” que se intentó solucionar por medio de cambios en pH de la fase móvil (Acetonitrilo por Metanol), e incluso con cambios de columna de HPLC, que sin embargo no dieron resultado, por lo que se aceptó el método descrito y su asimetría de pico que se situaba en torno a 1.95.

## **4.2. Validación del método analítico**

### **4.2.1. System Suitability**

Tras realizar las 6 inyecciones en HPLC de un estándar de MF de concentración 0.2 mg/mL, los resultados de áreas fueron los recogidos en el punto 7 de este trabajo (Anexo 1; Tabla 1). Tras calcular la desviación estándar relativa de las muestras, esta resultó ser de 1.01 %, por lo que el método cumple con la idoneidad.

### **4.2.2. Especificidad o Selectividad**

Una vez realizadas las medidas de cada uno de los componentes de la formulación por duplicado, se recogieron los resultados en la segunda tabla del anexo. (Anexo 1; Tabla 2). Como se aprecia, ninguna de las muestras, por duplicado, nos dan valor de área, es decir, en ninguna de ellas existe algún componente que absorba luz a la longitud de onda de la MF, por lo que en las muestras que se analizaran con la formulación completa, ninguno de los componentes de la doble emulsión interferiría en la medida del área de la MF en HPLC. De esta forma podemos confirmar que el método analítico es selectivo.

### **4.2.3. Estudios de degradación forzada**

Los resultados, por duplicado, de cada una de las medidas nos mostraron que las áreas de cada muestra no distaban apenas del área del estándar de MF (Anexo 1; Tabla 3), lo que podría interpretarse como que ninguna de las condiciones de degradación forzada afectaba a la estructura de la MF ni a la calidad de la solución; por tanto, pudo afirmarse que este el fármaco era resistente a estas condiciones y no estaba siendo destruido a lo largo del proceso de elaboración de las microesferas.

### **4.2.4. Linealidad**

Los resultados de las áreas por niveles de concentración se recogen en el Anexo 1, tabla 4. Para comprobar la linealidad de las áreas resultantes del HPLC de cada una de las muestras y demostrar que el método por tanto es lineal, a partir del estándar, y de la señal del instrumento de medición, calcularemos la concentración teórica de la muestra,

la cual debería ser muy cercana o prácticamente igual a la concentración real conocida debido a la alta resolución del HPLC. Se pudo comprobar que todos los cálculos teóricos de concentraciones de cada muestra se correspondían con los valores de concentración real de cada una de ellas, por lo que podría asegurarse que el método es lineal.

- **Test de homogeneidad de varianzas:** Una vez calculadas las varianzas de cada grupo de áreas resultantes del análisis de cada muestra por triplicado, podemos calcular la  $G_{exp}$  a partir de la fórmula que podemos observar en la imagen (Figuras 1 y 2). Una vez hemos obtenido que  $G_{exp} = 0.476$  debemos comparar con la  $G_{tab}$  en las tablas estadísticas del test de Cochran, sabiendo que en nuestro estudio  $n=3$  y  $k=5$ , de esta forma se concluyó que  $G_{tab}=0.5981$  y por tanto  $G_{exp} < G_{tab}$ . Se pudo concluir que existe una homogeneidad de la varianza en nuestro estudio.
- **Test de proporcionalidad:** Como se puede observar en el gráfico (Figura 4) al representar la recta de regresión lineal resultante de relacionar área y concentración en el cálculo de la linealidad, se obtiene un coeficiente de correlación de 0,9971 concluyéndose que se cumple el test de proporcionalidad al ser  $r^2 \geq 0,990$ .

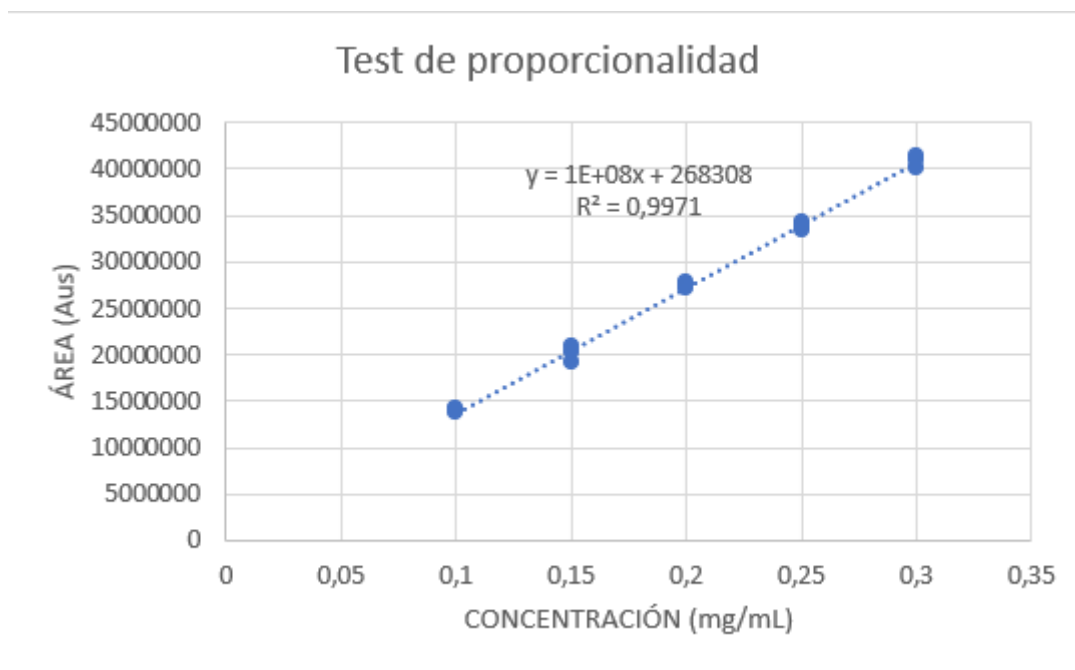
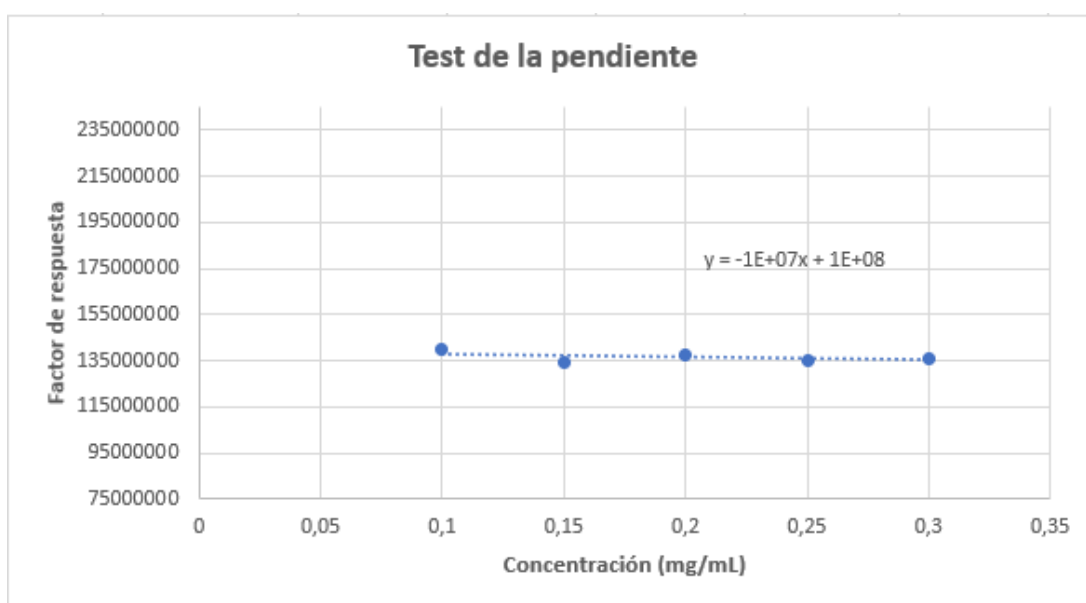


Figura 4. Gráfica Test de Proporcionalidad para la Linealidad.

- **Test de la pendiente:** Una vez se calcularon los factores de respuesta de cada una de las tres repeticiones, de los cinco niveles de muestras analizadas, se realizó el cálculo de la media y desviación estándar de cada grupo de 3 repeticiones, y se calculó el %RSD de cada uno de ellos también. Finalmente se calculó la media de todos los %RSD obtenidos (Anexo 1; Tabla 11), concluyendo de esta forma que la desviación estándar relativa promedio del ensayo se situó justo en un 2 %, es decir, aunque al límite, se cumplió el test de la pendiente, asegurándose así mediante una prueba más, la linealidad del método analítico llevado a cabo.



**Figura 5. Gráfica Test de la Pendiente para la Linealidad.**

#### **4.2.5. Linealidad a baja escala**

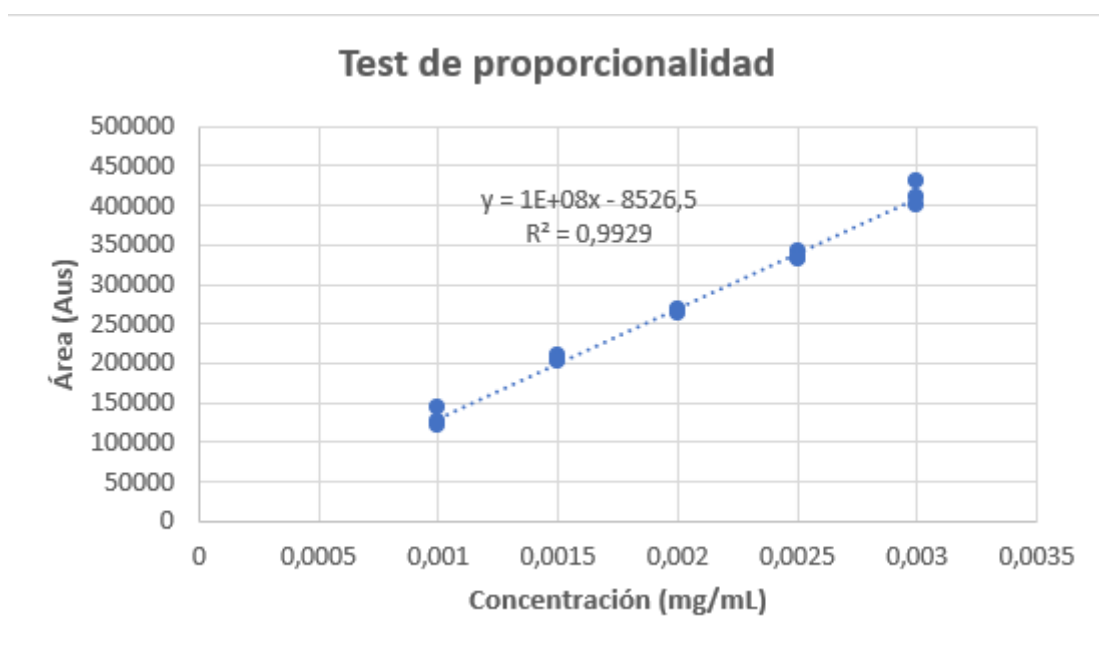
Una vez obtenidos los resultados arrojados por el HPLC (Anexo 1; Tabla 5), los resultados de las áreas se corresponden con valores 100 veces menores, lo que es un indicativo de que el método es efectivo.

Al igual que en el cálculo de la linealidad en el apartado anterior, se realizaron los mismos cálculos en este apartado, teniendo en cuenta que todo está diluido 100 veces respecto a las concentraciones del apartado anterior.

Tal y como se demostró en el apartado anterior; la linealidad del método analítico, en este apartado también podemos confirmar que el mismo es lineal a escala baja, es decir, se mantiene, aunque se utilice con muestras de muy pequeño valor de concentración, y por consiguiente resulten en pequeñas áreas.

- **Test de homogeneidad de varianzas:** Al calcular las varianzas de cada grupo de áreas medidas por triplicado, se obtuvo el valor de  $G_{exp}$ , el cual resultó en 0.22. Esto permitió concluir que  $G_{exp} < G_{tab}$ , ya que la  $G_{tab}$  en este caso es igual a 0.5981. Por tanto, se cumplió el criterio de aceptación.

- **Test de proporcionalidad:** Al realizar la recta de calibrado (Figura 6) en la cual se enfrentan área/concentración, se concluyó que el valor del coeficiente de correlación era de 0,9929 el cual, siendo mayor a 0.990, permitió concluir que se cumplía el criterio de aceptación para el test de proporcionalidad en el ensayo de linealidad baja.



**Figura 6. Gráfica Test de proporcionalidad para la Linealidad Baja.**

- **Test de la pendiente:** Del mismo modo que en el ensayo de la linealidad, se calcularon media y desviación estándar de cada grupo de 3 repeticiones, y se calculó el %RSD de cada uno de los grupos de repeticiones del mismo nivel (Anexo 1; Tabla 12). Posteriormente, se hizo una media de los %RSD de cada grupo de repeticiones, y se

calculó el %RSD total, que tuvo como valor 1,64. Por tanto, se cumplió el criterio de aceptación ya que el %RSD total fue menor al 2 %.

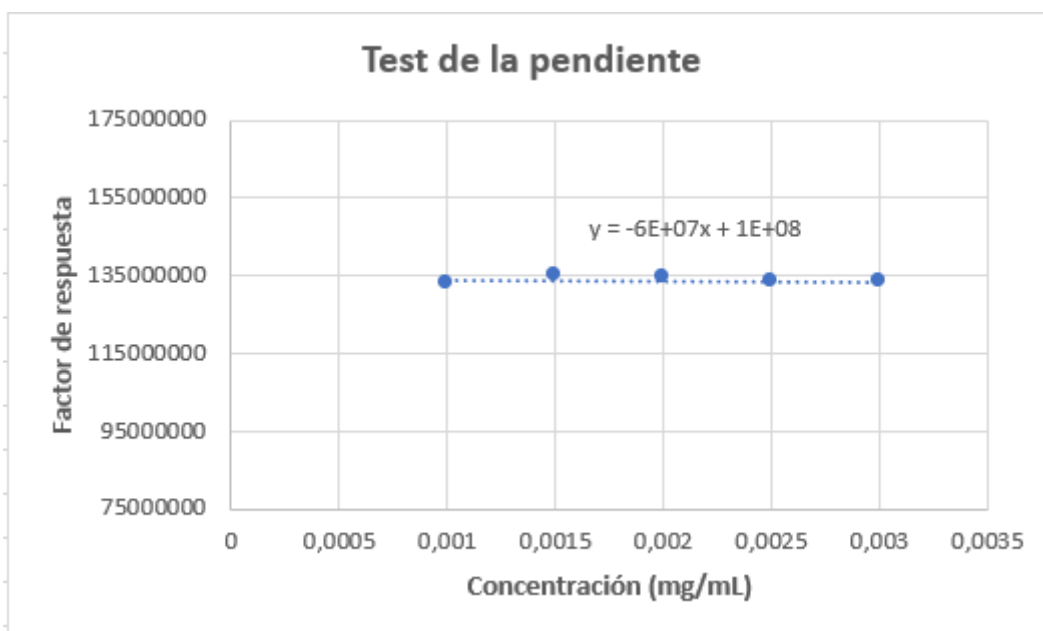


Figura 7. Gráfica Test de la Pendiente para la Linealidad Baja.

#### **4.2.6. Precisión o Repetitividad**

##### **- Repetibilidad de inyección:**

Los resultados de áreas de cada repetición por HPLC se recolectaron en la siguiente tabla (Anexo 1; Tabla 6) y se calculó el valor de desviación estándar relativa, el cual resultó en un 0.82 %, es decir, cumple con el criterio de aceptación para considerarse un método preciso en la medida de MF.

##### **- Repetibilidad de análisis:**

Como podemos observar en la tabla (Anexo 1; Tabla 7), la media de las desviaciones estándar relativas de los grupos de datos resulta en un 1.86 %, lo que nos indica que el estudio de repetibilidad de análisis cumple el criterio de aceptación y, por tanto, el análisis de las muestras es repetible en un rango de concentraciones distintas entre sí.

##### **- Precisión Intermedia:**

De esta forma, tras comparar los resultados de áreas resultantes de cada muestra en HPLC (Anexo 1; Tablas 8 y 9) se obtuvieron los dos %RSD, correspondientes a cada

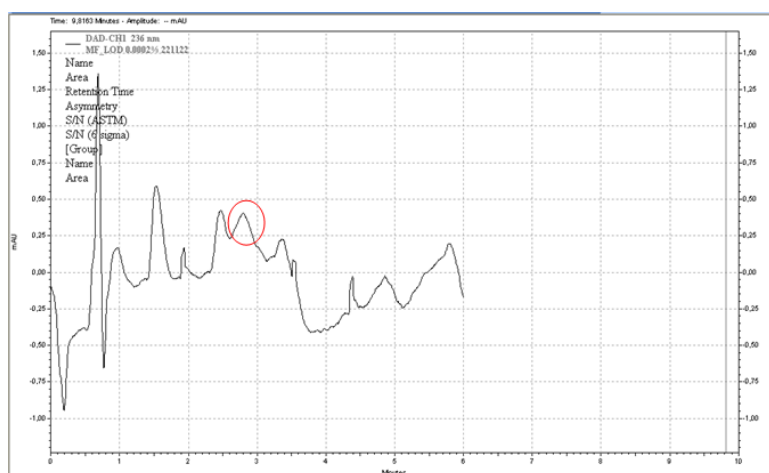
uno de los estándares de metformina usados en el análisis, para posteriormente calcular el %RSD total del estudio de precisión intermedia, realizando la media de los dos valores comentados anteriormente la cual resultó de la siguiente forma: %RSD Total = 0.56. Por tanto, el estudio cumple el criterio de aceptación marcado al ser la desviación estándar relativa menor al 2 %.

#### **4.2.7. Límite de cuantificación**

Como resultado del cálculo del límite de cuantificación, se pudo determinar que el instrumento de medida, en este caso, HPLC, tuvo un límite de detección de metformina en solución de 0.0005 mg/mL, es decir, un 0.25 % del estándar de metformina de 0.2 mg/mL tal y como se puede observar en la tabla del apartado 6. (Anexo 7; Tabla 10).

#### **4.2.8. Límite de detección**

Tras realizar el análisis en HPLC de cada una de las soluciones de metformina preparadas, se pudo comprobar que la mínima concentración detectable por el equipo fue la de 0.1 % respecto a la solución madre de 0.2 mg/mL, o sea, una concentración de 0.0002 mg/mL. Por tanto, el LOD de nuestro estudio se fijó en 0.0002 mg/mL, apreciándose un pequeño pico de área en el cromatograma (Figura 8), el cual no puede ser cuantificado con exactitud y precisión y apenas puede ser distinguido del ruido del equipo.



**Figura 8. Espectrograma de una muestra de MF en solución. LOD.**

### **4.3. Optimización de la formulación mediante diseño experimental**

Tal y como se explicó en el apartado de metodología anterior (3.2 Preparación y Síntesis de Microesferas de PLA cargadas con Metformina), a fin de obtener una formulación de la mayor calidad posible, se llevaron a cabo múltiples estudios preliminares. Finalmente, se planteó un diseño experimental, con el fin de valorar estadísticamente como influían diversos parámetros de la formulación sobre la eficacia de encapsulación de MF.

Para realizar estos estudios fue necesario, en primer lugar, obtener los datos de eficacias de encapsulación (EE) de cada lote incluido en el diseño experimental, los cuales se muestran en la tabla 5.

Número de Experimento	EE (%) Repetición 1	EE (%) Repetición 2
1	30.26	30.99
2	20.20	17.19
3	30.34	31.69
4	32.47	32.83
5	37.46	39.83
6	38.24	38.50
7	29.70	31.72
8	36.71	37.83
9	40.70	40.17

**Tabla 5. Eficacias de encapsulación de lotes elaborados a partir de la matriz ortogonal de Taguchi L9.**

A partir de estos resultados, se hizo posible llevar a cabo un análisis estadístico completo de los mismos. Para ello, se introdujeron los valores de eficacia de encapsulación en el Software DoE Pack y se llevaron a cabo los siguientes análisis estadísticos:

- Análisis de varianza ANOVA
- Análisis de medias marginales ANOM
- Diagrama de Pareto
- Análisis de regresión y superficies de respuesta



Estos estudios nos permitieron calcular la influencia de cada factor en la formulación, cuáles de ellos suponían cambios estadísticamente significativos y cuales no sobre la eficacia de encapsulación, y por tanto, en última instancia, sobre la formulación y el producto final.

#### **4.3.1. Estudio ANOVA: Análisis de la Varianza**

Este estudio nos permite calcular la influencia de cada uno de los factores en la formulación, y por tanto, considerar cuál de ellos supone un cambio estadístico en la respuesta estudiada, en este caso la eficacia de encapsulación.

En la figura 9 observan, nombrados con las letras A-H, los factores y los niveles de cada uno de ellos que fueron estudiados, así como todos los parámetros estudiados en el análisis; entre ellos, se destacan el porcentaje de la contribución del factor a la eficacia de encapsulación de la formulación final y los valores de cada uno de los efectos, denominados I-hat.

Es importante dividir los factores en dos grupos dependiendo de su forma de ser medidos: en los cuatro primeros factores A, B, C y D se compararon dos niveles (inferior y superior), que son representados como +1 y -1. En los últimos cuatro factores E, F, G y H se compararon los valores medios de los extremos frente a los valores del nivel medio.

Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
ANOVA tables for EE (Response Averages) - Alpha level = 0,1							
<b>One-Way ANOVA</b>							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
Between	707,1	8	88,39	69,65 *		<0,001	
Within (error)	11,42	9	1,269				
<b>TOTAL</b>	<b>718,6</b>	<b>17</b>					
<b>Single degree of freedom ANOVA</b>							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
A MF (10 v 40)	262,8	1	262,8	207,1 *	9,36	<0,001	36,6
B NaCl (1 v 5)	83,58	1	83,58	65,86 *	5,278	<0,001	11,6
C Evapor (Camp v Rot 40)	11,58	1	11,58	9,127 *	-1,965	0,014	1,6
D Lavados (1 v 3)	25,64	1	25,64	20,2 *	-2,923	0,002	3,6
E MF (10, 40 v 25)	103,9	1	103,9	81,87 *	5,097	<0,001	14,5
F Lavados (1, 3 v 2)	136,8	1	136,8	107,8 *	-5,848	<0,001	19,0
G NaCl (1, 5 v 3)	23,64	1	23,64	18,62 *	-2,431	0,002	3,3
H Evapor (Camp, Rot 40 v R)	59,16	1	59,16	46,61 *	-3,846	<0,001	8,2
Within (error)	11,42	9	1,269				
<b>TOTAL</b>	<b>718,6</b>	<b>17</b>					
<b>Factorial ANOVA</b>							
Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
MF	366,7	2	183,4	144,5 *		<0,001	
NaCl	107,2	2	53,61	42,24 *		<0,001	
Evapor	70,75	2	35,37	27,87 *		<0,001	
Lavados	162,4	2	81,22	64 *		<0,001	
Within (error)	11,42	9	1,269				
<b>TOTAL</b>	<b>718,6</b>	<b>17</b>					

**Figura 9. Análisis ANOVA.**

Como podemos observar en la imagen (Figura 9), la última columna del gráfico representa el porcentaje de contribución. Los resultados de este análisis de la varianza mostraron los factores responsables de los cambios en la eficacia de encapsulación; así, de mayor a menor contribución a la formulación estos fueron:

1. Cantidad de MF: A (36.6 %) y E (14.5 %)
2. Número de lavados: D (3.6 %) y F (19 %)
3. Cantidad de NaCl: B (11.6 %) y G (3.3 %)
4. Tipo de evaporación: C (1.6 %) y H (8.2 %)

En cuanto a los resultados obtenidos de este análisis, habiéndose fijado el valor de alfa en  $\alpha=0.1$ , el intervalo de confianza del estudio sería un 90 %. Como puede observarse

en el gráfico (Figura 2), atendiendo al valor de P, todos los resultados de cada uno de los factores con sus respectivos niveles tuvieron un valor de P mucho menor al de alfa, por tanto, se pudo confirmar la significación estadística de cada uno de los datos analizados.

#### 4.3.2. Estudio ANOM: Análisis de las medias marginales

Este tipo de análisis nos permitió representar en una misma gráfica (Figura 10) las respuestas medias de cada factor para distintos niveles y comparar el efecto que cada factor de estudio, por separado, ejerce sobre la respuesta que medimos, en este caso, la eficacia de encapsulación.

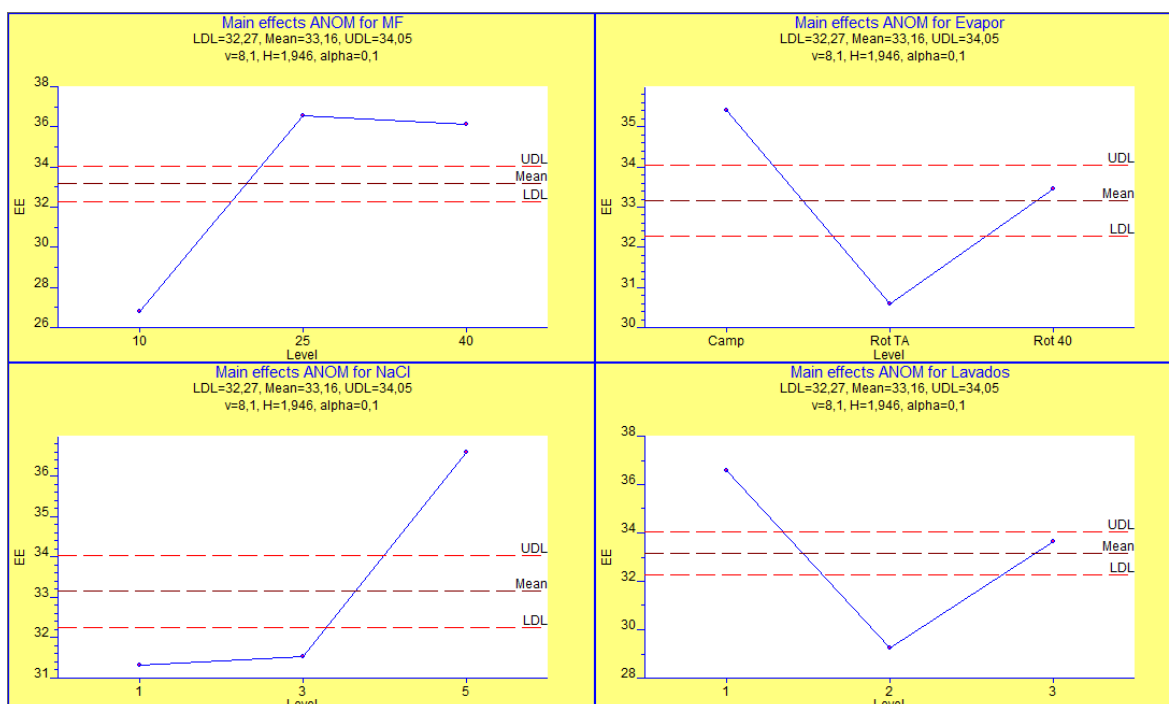


Figura 10. Análisis ANOM.

Como se puede observar en el gráfico, los cuatro factores estudiados fueron cantidad de metformina, tipo de evaporación, cantidad de NaCl y número de lavados. Todos ellos demostraron una respuesta estadísticamente significativa, ya que los valores de todos los factores excedían los límites de confianza establecidos, un límite superior denominado UDL y otro límite inferior denominado LDL, ambos separados de la media por la misma varianza, en positivo y negativo, respectivamente.

En cuanto al primer factor, la cantidad de metformina en la formulación, en la parte superior izquierda de la figura 10 se observa que la eficacia de encapsulación aumentaba notablemente a medida que se aumentaba la dosis del principio activo en la formulación, es decir, a mayor nivel del factor, se alcanzaba mayor resultado. Al llegar

la cantidad de MF a un punto crítico de 25 mg, el cual representaba el nivel medio de los 3 niveles estudiados, la gráfica pasó de ser creciente a mantenerse constante, de forma que a partir de 25 mg no supondría un cambio de efecto en la respuesta estudiada.

Respecto al tipo de evaporación seguido en la elaboración de la formulación, representado en la parte superior derecha de la figura 10 cabe mencionar que el mayor resultado de eficacia de encapsulación se obtuvo con una evaporación en campana a temperatura ambiente, mientras que el menor valor se obtuvo con una evaporación en rotavapor a una temperatura de 40 °C, situándose por tanto el tercer nivel comparado, evaporación en rotavapor a temperatura ambiente, en un nivel cercano a la media.

Con relación al efecto del NaCl en la formulación final, que observamos en la parte inferior izquierda de la figura 10, cabe mencionar que, a mayor cantidad de sal utilizada, la eficacia de encapsulación aumentaba, aunque mínimamente, hasta llegar a un punto crítico situado en el nivel de 3 mg de NaCl, a partir del cual la eficacia de encapsulación aumentó en gran medida hasta llegar al nivel de 5 mg de NaCl. Este resultado se corresponde con la bibliografía consultada en la cual se menciona que la presencia de una sal en la fase acuosa ejercería presión osmótica para contener la MF dentro de la fase acuosa de la emulsión elaborada, impidiendo de esta forma que esta saliese al sobrenadante y por tanto se alcanzaran menores valores de encapsulación (Iqbal et al., 2015).

Finalmente, en el cuadrante inferior derecho de figura 10, el número de lavados de la formulación también mostró diferencias en el efecto que produjo dependiendo de los niveles a los cuales fue estudiado; en este caso se alcanzó la mayor eficacia de encapsulación de MF con un único lavado de la formulación, disminuyendo considerablemente esta si se realizan más lavados sucesivos, ya sean dos o tres, probablemente debido a que estos lavados con agua permiten una solubilización de cierta parte de MF que posteriormente será eliminada disminuyendo, por tanto, los ratios de encapsulación de la misma.

### 4.3.3. Diagrama de Pareto

Basándose en los valores de  $I\text{-hat}$ , este gráfico nos permite diferenciar entre los efectos directamente proporcionales a la respuesta estudiada y aquellos inversamente proporcionales a la misma. (Figura 11).

Para saber la relación de cada factor con la respuesta evaluada, en este caso, la eficacia de encapsulación, se tomaron como efectos directamente proporcionales aquellos con un valor positivo de  $I\text{-hat}$  en el diagrama, y efectos inversamente proporcionales a aquellos que poseen un valor de  $I\text{-hat}$  negativo.

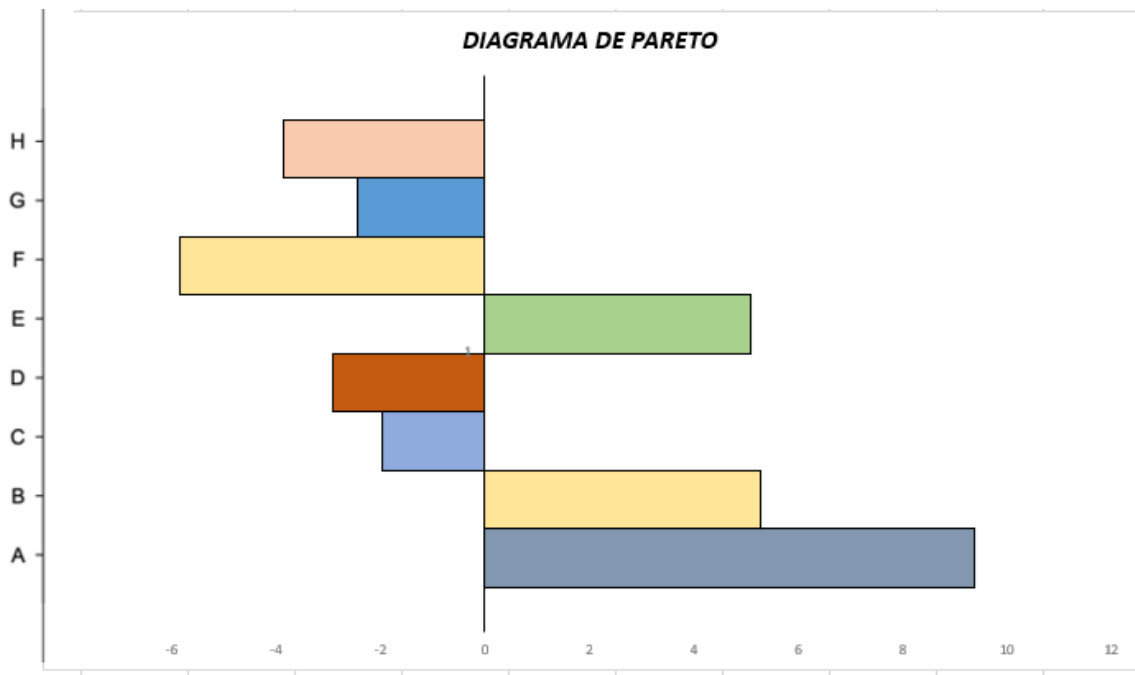


Figura 11. Diagrama de Pareto.

Como se puede observar a simple vista en el diagrama de Pareto, los factores de cantidad de MF ejercen un efecto directamente proporcional, y el número de lavados y proceso de evaporación ejercen un efecto inversamente proporcional, mientras que la cantidad de NaCl muestra resultados algo más ambiguos y que precisan de un estudio y explicación más detallados.

Para la realización de este gráfico, se llevó a cabo una comparación del nivel superior frente al inferior y también una comparación de la media de los niveles inferiores y superiores frente al nivel medio para todas las variables estudiadas, que como ya se han comentado anteriormente, fueron cantidades de MF y NaCl, número de lavados y

proceso de evaporación, cada uno de ellos representados con la letra correspondiente del gráfico ANOVA y ANOM y en este caso, además, con un color.

En cuanto al primer factor, la cantidad de MF se llevó a cabo la comparativa entre los niveles superiores e inferiores del mismo, en este caso 10 y 40 mg respectivamente, y también la comparativa entre el valor de la media entre 10 y 40 y el nivel medio, que en este caso fueron 25 mg. De esta forma, se observa que, al aumentar el nivel del factor, de 10 a 40, se aumentó el efecto proporcionalmente, y de la misma forma, cuando se pasó del valor medio entre los dos niveles (10 mg y 40 mg), y el valor medio (25 mg), el efecto es también positivo. Como podemos observar, sea de una forma u otra, siempre se mantiene una relación directamente proporcional, en la cual a mayor cantidad de fármaco usada en la fórmula, mayor es la eficacia de encapsulación.

El número de lavados es un claro ejemplo de factor con un efecto inversamente proporcional, de forma que mientras más se aumentaron los niveles, en este caso el paso de uno a dos o incluso tres lavados, mayor disminución de efecto se produjo, es decir, se redujo la eficacia de encapsulación.

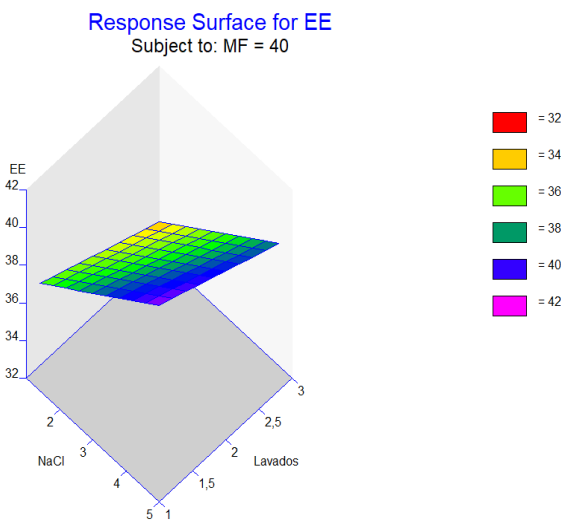
Del mismo modo ocurrió con el proceso de evaporación, al aumentar la temperatura o pasar de un método a otro, menor fue la eficacia de encapsulación; por tanto, se decidió elegir los niveles inferiores de cada uno de estos factores a fin de maximizar la eficacia de encapsulación, un único lavado y evaporación en campana a temperatura ambiente.

Finalmente, en cuanto al NaCl, sin embargo, es un factor algo más complejo en esta formulación ya que cuando se aumenta la cantidad desde un nivel inferior como sería 1 mg hasta un nivel superior que serían 5 mg, el efecto es un incremento en la eficacia de encapsulación; sin embargo, cuando se compara el valor medio de estos dos valores extremos con el nivel medio, que en este caso eran 3 mg, el efecto es una disminución de la eficacia de encapsulación. Por tanto, el incremento o disminución de la eficacia de encapsulación no es proporcional ni tampoco es igual independientemente de la cantidad de MF; este es un caso que debe estudiarse con mayor profundidad, buscando por tanto el nivel óptimo, que no siempre el máximo, para alcanzar el máximo efecto posible buscado. En nuestro caso se seleccionó un nivel de 5 mg al concluirse que era el

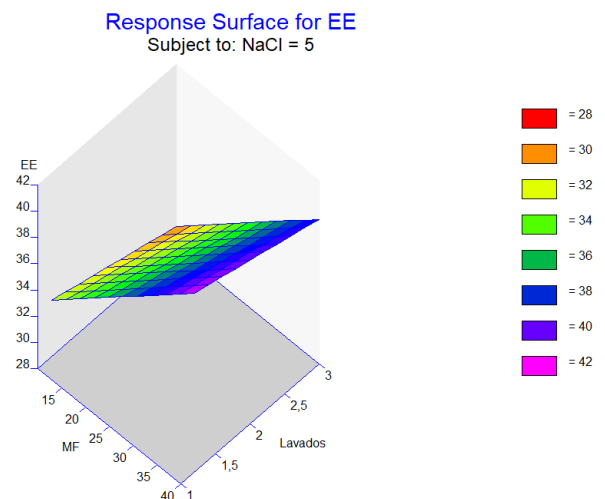
nivel óptimo, pero de la misma forma podría haberse seleccionado el nivel de 3 mg y haberse conseguido buenos resultados.

#### **4.3.4. Análisis de regresión y superficies de respuesta**

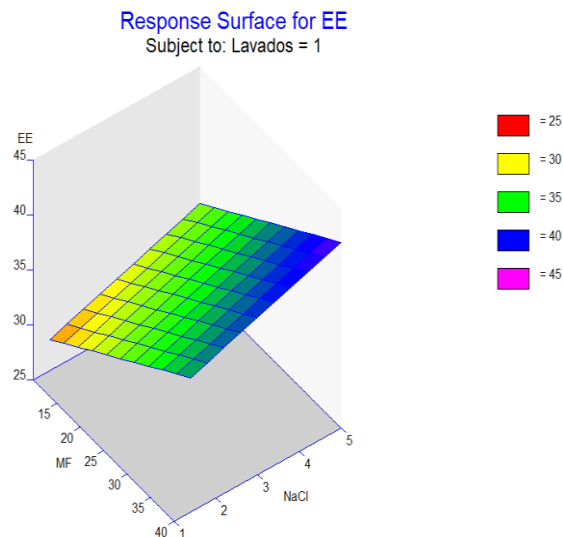
Este tipo de estudio nos permitirá hallar los niveles de cada uno de los factores que optimizan la respuesta buscada, es decir, la eficacia de encapsulación. Para realizar el análisis, se elaboró un mapa tridimensional en el cual se relacionaron dos factores con el efecto, de forma que, tras tres combinaciones de efectos, se habían relacionado todos los factores entre ellos. Así, como puede observarse en los gráficos (Figuras 12, 13 y 14), la parte morada representaba el nivel óptimo del factor a medir en la formulación, permitiéndonos así este estudio encontrar y reflejar visualmente los niveles exactos de cada factor para conseguir optimizar la respuesta al máximo posible.



**Figura 12. Superficie de respuesta para el factor “Cantidad de Metformina”.**



**Figura 13. Superficie de respuesta para el factor “Cantidad de NaCl”.**



**Figura 14. Superficie de respuesta para el factor “Número de lavados”.**

Como se puede observar en los gráficos (Figuras 5, 6 y 7), los niveles óptimos de cada factor fueron 40 mg de MF, 5 mg de NaCl y 1 lavado, con evaporación en campana a temperatura ambiente, resultados que coincidían con todos los estudios llevados a cabo anteriormente, lo que nos permitió confirmar las conclusiones y elaborar el protocolo definitivo de elaboración de microesferas de MF con estos niveles de los factores descritos.

Uno de los puntos positivos del análisis de regresión, es que a partir del gráfico tridimensional puede extraerse una fórmula de regresión a la cual obedece el gráfico. Esta ecuación se obtuvo por medio del software usado hasta el momento, resultando en:  $EE = 24.3 + 0.312MF + 1.32NaCl - 1.46Lavados$

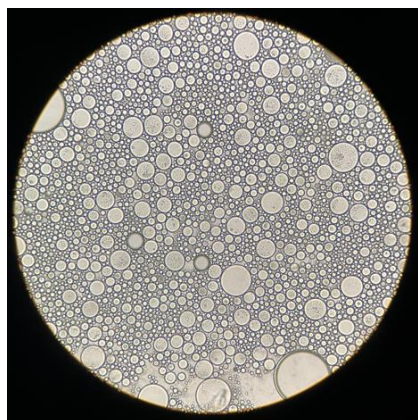
Esta fórmula de regresión nos permite comprender con exactitud el comportamiento de la formulación en términos de eficacia de encapsulación y nos permitió conocer las variables que mayor influencia ejercían sobre el proceso de elaboración de las microesferas de MF y, por tanto, mejorarlas tanto cuanto fue posible, llegando a niveles de eficacia de encapsulación muy cercanos al 50 %.



#### **4.4. Caracterización de las microesferas**

##### **4.4.1. Morfología**

Tras llevar a cabo un estudio visual al microscopio óptico de las microesferas de MF formadas en varias de las etapas de elaboración, se pudo concluir que, tal y como se puede observar en las figuras 15 y 16, las microesferas obtenidas poseían una forma esférica, pero tamaños heterogéneos y diferentes según el lote observado. Ello puede deberse a la diferencia de proporciones en los componentes de la muestra o a la velocidad de agitación, homogeneización de las microesferas, e incluso también debido al método y tiempo de secado, pudiendo formarse microesferas de menor o mayor tamaño, aunque siempre en escala micrométrica, y conservando su forma esférica procedente de las gotículas de doble emulsión.



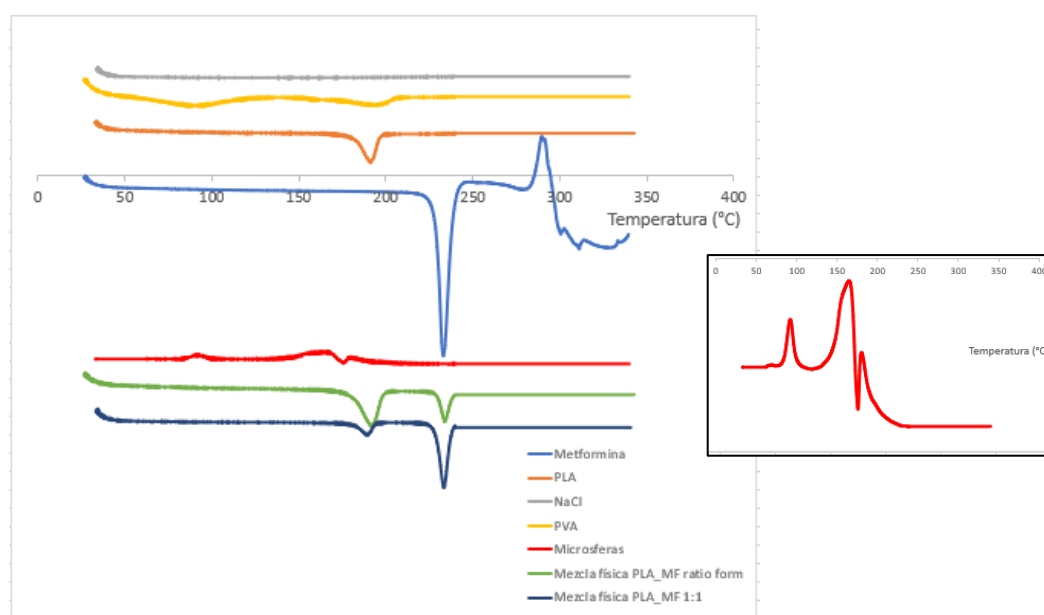
**Figura 15. Microesferas de metformina con objetivo 10x.**



**Figura 16. Microesferas de metformina con objetivo 40x.**

#### 4.4.2. Calorimetría diferencial de barrido

El análisis de los termogramas (Figura 17) obtenidos por DSC se basó principalmente en la búsqueda de picos endotérmicos y exotérmicos y las temperaturas a las cuales estos aparecían junto a la entalpía del proceso en el momento en el que se alcanzaron estos picos, permitiéndonos asegurar la pureza de los compuestos en el caso de las muestras de compuestos únicos, y la existencia de variaciones y aparición o desaparición de características de los compuestos por efectos térmicos en el caso de las muestras compuestas por mezclas de compuestos.



**Figura 17. Termograma de metformina, microesferas, componentes de la formulación y mezclas de componentes.**

En el caso de la muestra de MF, tal y como se observa en el termograma (línea azul claro en (figura 17), esta presentó un pico agudo endotérmico a una temperatura de 234 °C correspondiéndose con una entalpía del proceso de -26 J/g, coincidiendo con la fusión del principio activo, ambos parámetros que se corresponden con los datos fisicoquímicos de la MF pura.

El ácido poliláctico (PLA) (en naranja) del mismo modo, mostró un pico endotérmico a una temperatura de 165 °C, y una entalpía de -11 J/g marcando su punto de fusión, parámetros que también coinciden con los datos bibliográficos del PLA, aunque existan pequeñas variaciones debido a los numerosos tipos de polilácticos por su composición y morfología variable.

En cuanto al NaCl (color gris), cabe mencionar que, al contrario que los dos compuestos anteriores, no mostró ningún pico endotérmico, debido a que el punto de fusión del NaCl es de más de 800 °C, temperatura que se encuentra fuera del rango de estudio de nuestro calorímetro.

Finalmente, para terminar con el análisis de las muestras de compuestos puros, se estudió el termograma de PVA (línea amarilla), el cual presentó 2 picos endotérmicos, uno de ellos a 88 °C y el siguiente a 195 °C, que pueden deberse a la evaporación de la humedad de la muestra (el primer pico) y la fusión del PVA puro (el segundo pico).

Por otro lado, en cuanto a las mezclas de los diferentes componentes de la formulación, también se llevó a cabo un análisis con el fin de determinar la posible existencia del cambio de alguna propiedad física de los materiales por efectos térmicos. Como se puede observar en el termograma (líneas verde y azul oscuro), las mezclas Metformina+PLA, independientemente de la proporción entre ellas, muestran dos picos iguales en sus gráficas, los cuales solo se diferencian en intensidad de pico, la cual sí es debida a la mayor o menor cantidad de cada componente en cada una de las mezclas. Esto nos permite concluir que no existe ninguna interacción entre los dos componentes de la formulación en estado sólido, pues los dos picos que aparecen se corresponden al mismo pico que los compuestos por separado, sin que aparezcan o desaparezcan picos adicionales en el termograma, que sí podrían indicar algún cambio en las propiedades de los elementos de la mezcla.

En cuanto al termograma de las muestras de microesferas (en rojo, y ampliada), existen picos tanto endotérmicos como exotérmicos, por lo que deben existir varios cambios físicos dependientes de la temperatura con respecto a cada uno de los compuestos por separado. En primer lugar, se puede observar un pico exotérmico en torno a los 95 °C, el cual podría deberse a cambios en la morfología de las microesferas, como cristalizaciones o simplemente descomposición de las mismas. Posteriormente, también se puede observar la existencia de varios picos conjuntos cercanos al mismo rango de temperaturas, un pico endotérmico de fusión en torno a los 170 °C que se correspondería con la fusión del compuesto que anteriormente ya sufrió una cristalización, al no compartir temperatura con ningún componente puro en el estudio, o quizás se podría deber a una bajada en el punto de fusión de la metformina y fusión a

esa temperatura como consecuencia de una cristalización resultante de la mezcla de los productos en la formulación.

#### **4.4.3. Microscopía en platina caliente**

Como se comentó previamente en el estudio, una de las utilidades de este proceso es complementar de una forma efectiva los resultados del DSC. Debido a esto, al realizar el análisis de las muestras en microscopía de platina caliente, visualmente, por desaparición de las microesferas en su totalidad, se pudo confirmar que el punto endotérmico situado a los 170 °C en el termograma de las microesferas no se correspondía con la bajada en la temperatura de fusión de la MF por condiciones de cristalización.

Con el fin de confirmar el hecho de que la presencia de ciertos componentes en la fórmula podría alterar las propiedades termodinámicas de MF, se realizó un ensayo de microscopía en platina caliente esta vez de la muestra de mezcla de MF+PLA en proporciones iguales a las de la muestra de microesfera. Como se puede observar en las imágenes, la presencia de PLA no provocó que el fármaco fundiera, ya que a una temperatura de 210 °C la MF aparecía aún en estado sólido, y a 225 °C, punto de fusión de la MF pura, apareció en estado líquido, esto nos confirma que la presencia de PLA no indujo cambios termodinámicos en el principio activo. Con el fin de concretar la razón por la cual existen de este modo puntos anómalos en el termograma de la muestra de microesferas se deberían llevar a cabo estudios de mayor extensión que pudieran confirmar qué componente de la mezcla de ellos en la formulación final sería el responsable de la cristalización de la MF y, por tanto, de sus cambios en el punto de fusión.

### **4.5. Caracterización del hidrogel**

#### **4.5.1. Reología**

En nuestro estudio, se evaluó la reología del gel resultante de combinar Pluronic® F127 e hialuronato sódico. La mezcla formada por ambos geles podría modificar los parámetros de gelificación, entre otros, la temperatura, como se ha demostrado en estudios anteriores (Nascimento et al., 2018). Debido a esto, se hizo necesario llevar a cabo un estudio en mayor profundidad de las características reológicas de los componentes del hidrogel final por separado, del hidrogel compuesto por la mezcla de

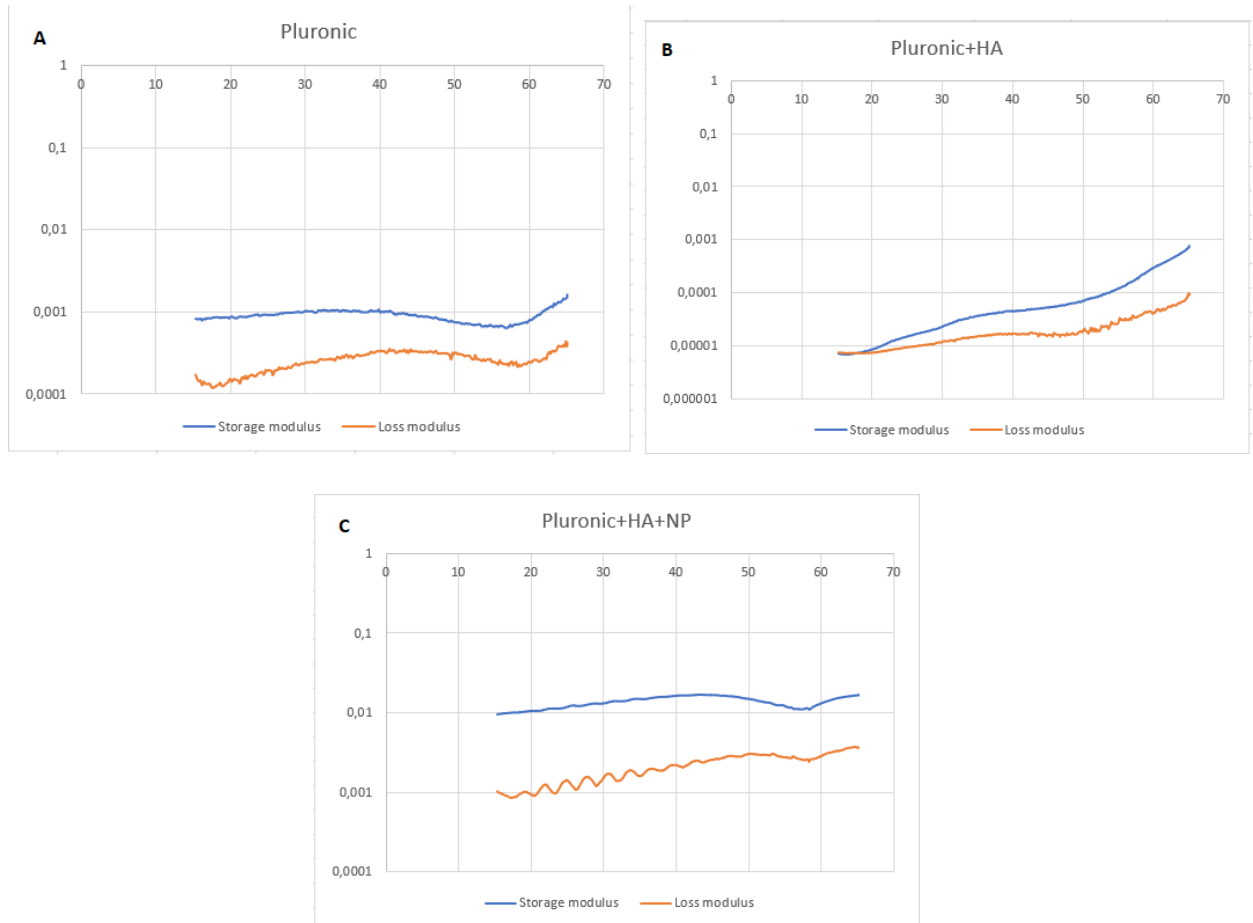
sus componentes, y del hidrogel final junto a las micropartículas como producto final de la formulación.

Aunque hoy en día se están explorando otras propiedades fisicoquímicas para caracterizar el rendimiento potencial de los geles (Fagien et al., 2019), el método elegido para llevar a cabo el estudio reológico de cada uno de estos geles fue el cálculo de la intersección entre el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ) de forma que gráficamente pudiera encontrarse la temperatura en la cual ambos módulos se cruzasen, temperatura a la cual se cumpliría la relación matemática en la cual la tangente entre ambos módulos se iguala a 1, punto en el cual se establece la temperatura de gelificación.

En la figura 18a se puede observar que no existe ningún punto de corte o entrecruzamiento entre los módulos de almacenamiento y pérdida; esto es debido a que, en este caso, el gel está formado únicamente por Pluronic y agua, y la concentración del mismo es tan baja (17 % p/v) que se hace realmente imposible para el hidrogel llegar al punto de gelificación, aunque la temperatura aumente considerablemente, algo que concuerda con los datos que aporta la bibliografía ya que ciertos autores sostienen que la concentración de polímero tiene un efecto positivo sobre la viscosidad, lo que indica que a mayor concentración de polímero, mayor será la viscosidad (Fernández-Romero et al., 2021).

La estructura del pluronic en agua es de tipo micelar, por lo que se necesitan concentraciones relativamente altas para que las micelas se entrecrucen en la solución acuosa hasta llegar a formar enlaces lo suficientemente fuerte como para gelificar. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la temperatura es un factor determinante para la gelificación del Pluronic, siempre que la concentración sea adecuada, está reconocido por diversos autores (Brown et al., 1992) que las soluciones acuosas de Pluronic experimentan una transición de solución a gel medida que aumenta la

temperatura, algo de gran importancia para la encapsulación de fármacos (Moon et al., 2012).



**Figura 18. Módulos de almacenamiento y pérdida de: A) Pluronic + agua. B) Pluronic + HA + agua. C) Pluronic + HA + agua + microesferas.**

En la figura 18b, como se puede apreciar, sí existe un cambio en el sistema, debido a un cruce entre los módulos de almacenamiento y pérdida a una temperatura realmente baja, aproximadamente en torno a los 16 °C. Como se puede comprobar, este gel actuaba de forma contraria a lo esperado de forma que, a medida que la temperatura aumentaba, los módulos  $G'$  y  $G''$  se separaron progresivamente, lo que nos permitió concluir que la unión de estos geles resultaba en un tipo de gel cuya tangente se igualaría a 1 a temperaturas muy bajas, es decir, la temperatura de gelificación no se alcanza a valores de temperatura cercanos a la fisiológica, lo que podría suponer problemas en la administración como sistema de liberación sostenida en la cavidad bucal. Estos cambios

pueden deberse a la gran variabilidad de las propiedades reológicas y químicas de geles de ácido hialurónico, que han sido descritas en estudios anteriores (Fagien et al., 2019) sosteniendo que la reología del gel de hialurónico viene determinada por múltiples factores, incluyendo reacciones de reticulación en gran medida, además del peso molecular del sustrato del ácido hialurónico, la concentración del mismo, y el proceso utilizado para fragmentar el polímero.

En la figura 18c también se puede apreciar que la combinación de Pluronic y HA junto con las micropartículas dan como resultado un tipo de gel muy viscoso y que no alcanza el punto de gelificación ya que no se produce entrecruzamiento de los módulos  $G'$  y  $G''$  en ninguno de los puntos del rango de temperaturas estimadas en el estudio. En la bibliografía (Nascimento et al., 2018) se menciona que la incorporación de hialuronato no modifica la temperatura de gelificación para todos los geles, pero en el caso de Pluronic F127 se observaron temperaturas de gelificación significativamente menores que para el hidrogel de Pluronic puro.

Siendo, por tanto, en este caso mayor aún la dificultad para alcanzar la gelificación del hidrogel se sospechaba de algunas interacciones entre los componentes de las microesferas con el hidrogel, impidiendo su gelificación. Acorde a nuestras sospechas de ciertas interacciones entre las microesferas y el hidrogel, la literatura mostró que al igual que existe un aumento en los valores de viscosidad en estas formulaciones, también existen un aumento de la temperatura de gelificación tras la adición de fármacos (Nascimento et al., 2018), como ocurre en nuestro caso.

#### **4.5.2. pH**

La solución de Pluronic poseía un pH de 6–7, mientras que el Hialuronato Sódico tenía un pH de 7. Lógicamente, la adición de hialuronato de sodio aumentará el pH, aunque este aumento sea mínimo, algo que concordaba con la bibliografía consultada (Fernández-Romero et al., 2021)

Una vez se formó el hidrogel como producto final se realizaron varias mediciones de pH las cuales resultaron en un pH medio de 6.8, algo que cobra sentido cuando atendemos a los valores de cada componente del gel y sus proporciones, 80 % en el caso de Pluronic y 20 % en el caso de Hialuronato Sódico.

### **4.5.3. Mucoadhesividad**

Con el fin de calcular el tiempo de retención del hidrogel formado por la combinación Pluronic + HA, se llevó a cabo el método descrito en la bibliografía, cronometrando el tiempo que tardaba 1 g de gel en fluir desde el centro de la placa de Petri con agar/mucina hasta el extremo de la placa, teniendo en cuenta que existía un flujo continuo por goteo de saliva artificial a 37 °C sobre el gel. Debido a este último parámetro descrito, se explicarían los resultados de la mucoadhesividad de este hidrogel, la cual fue realmente baja en términos de tiempo de retención, no llegando a concluirse 5 min desde el inicio del ensayo cuando el hidrogel coloreado había desaparecido prácticamente de la placa de Petri al encontrarse en un estado de gran fluidez y siendo arrastrado sin dificultad por la saliva artificial. Como se ha comentado, algo a tener en cuenta para este ensayo es que la temperatura de gelificación de la mezcla Pluronic + HA + Agua es realmente baja, y fue suficiente con dejar el hidrogel a temperatura ambiente para que este perdiera en gran parte su consistencia de gel y sus propiedades mucoadhesivas, algo que sin duda fue agravado por la temperatura fisiológica a la que era goteada la saliva artificial.

### **4.5.4. Tiempo de gelificación**

De la misma forma que en el ensayo anterior, las propiedades de gelificación de la mezcla Pluronic + HA + Agua, actuaron en gran medida como factor predisponente para el ensayo del tiempo de gelificación de este hidrogel.

A pesar de las propiedades termodinámicas del gel Pluronic puro, el cual sufre una gelificación a temperatura y pH casi fisiológicos (Wen et al., 2020) (siempre que este mismo se encuentre a concentración adecuada), las propiedades gelificantes de la mezcla distaban mucho de las de sus componentes por separado.

En este ensayo se introdujeron los viales con hidrogel en blanco, hidrogel con microesferas e hidrogel con MF, resultando en todos ellos que a 37 °C a los que se encontraba el baño termostatzado, los hidrogeles se hicieron más viscosos, aumentándose por tanto en gran medida el tiempo de gelificación, tanto que podría considerarse infinito, o gelificación prácticamente nula. Es decir, debido a la mezcla de geles en la formulación el resultado de este ensayo fue justo el contrario al esperado, planteándose así la cuestión de si este hidrogel debería utilizarse para administración



en la mucosa bucal con estas características, o si por el contrario debería cambiarse la composición, o en su defecto la concentración de sus componentes para conseguir una gelificación más eficaz a temperaturas fisiológicas.

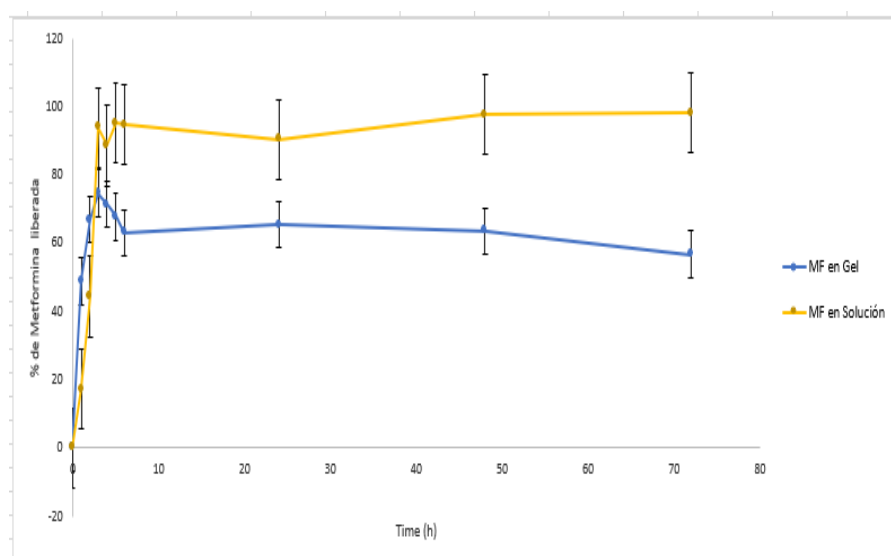
#### **4.6. Estudio de permeación *in vitro***

Con el fin de conocer la velocidad de liberación del principio activo desde la formulación final hasta su punto de acción, y su capacidad para atravesar membranas, como ocurriría en el cuerpo humano con la mucosa bucal, se diseñó el estudio de permeación en el cual se consiguió una aproximación bastante acertada de lo que ocurre fisiológicamente, a partir del uso de celdas de difusión de Franz, midiendo el paso o liberación del fármaco a través de una membrana artificial *in vitro*.

Tras recoger cada una de las muestras de tampón de la celda aceptora del instrumento, se llevaron al HPLC obteniéndose los resultados de área a distintos tiempos dependiendo de la concentración de cada muestra.

A partir de estos datos se elaboraron distintas gráficas para representar la liberación de la metformina a lo largo del tiempo de cada fórmula, permitiéndonos así comparar la liberación de la metformina en solución, la metformina en el hidrogel y la metformina en microesferas dispersas en el hidrogel.

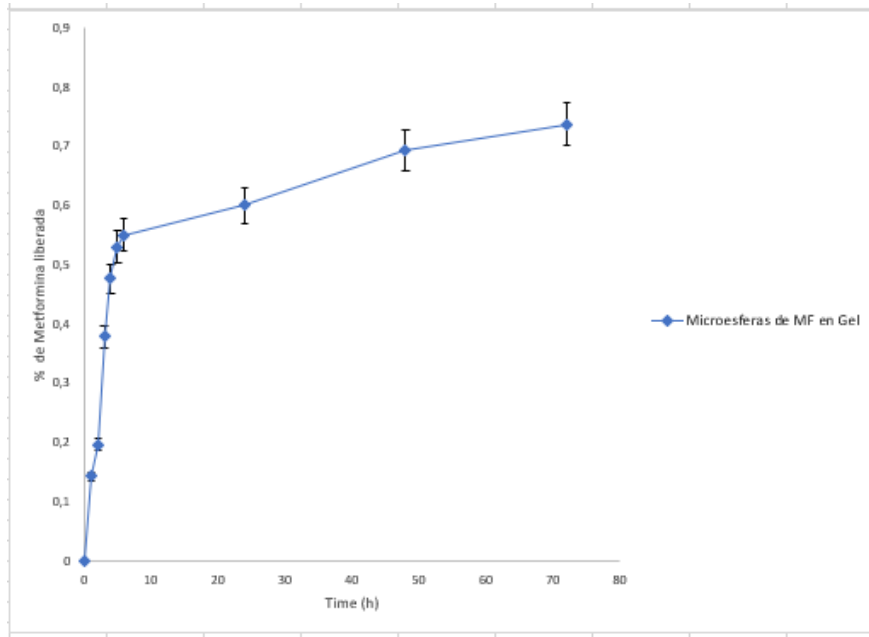
En la figura 19 podemos observar la comparativa en los perfiles de liberación de la metformina en gel y en solución.



**Figura 19. Perfiles de liberación de metformina en gel y en solución.**

os resultados obtenidos nos permitieron concluir que mientras la MF en solución tiene una liberación y permeación a través de la membrana bastante rápida, unas 5 h aproximadamente, la liberación y permeación en el hidrogel fue mucho más sostenida en el tiempo, liberándose del gel aproximadamente la mitad de principio activo en el mismo tiempo, en torno a un 60-70 % de MF liberada en las 5 primeras horas, manteniéndose la liberación durante las próximas horas de manera muy gradual, resultados que sugieren un efecto eficaz en cuanto a la liberación prolongada por parte del hidrogel, uno de los principales objetivos perseguidos con el uso del hidrogel en la formulación final. Al igual que con otros muchos principios activos, la incorporación de MF en hidrogeles de hialuronato provoca una prolongación en la liberación del fármaco debido a la formación de una red polimérica más cerrada (Nascimento et al., 2018). De esta forma se consigue una sinergia en la prolongación de la liberación del fármaco, ya que el efecto del hidrogel se suma al efecto de la microcápsula que contiene la MF, tal y como se menciona más adelante en este mismo apartado.

En la figura 20 podemos observar que, en el caso de la liberación y permeación a través de la membrana de la MF incorporada en las microesferas dispersas en el hidrogel, esta es mucho más lenta y sostenida en el tiempo, tanto que los valores de permeación llegan a ser diez veces inferiores a las formulaciones estudiadas en el gráfico anterior (Figura 15) , algo que dista mucho de lo descrito en la bibliografía hasta el momento sobre las formulaciones de MF con recubrimiento polimérico, ya que en la mayoría de formulaciones descritas no se consigue retrasar la liberación en gran medida en comparación con la MF solución. Esto es debido a que la mayoría de las formulaciones descritas están formadas por polímeros de recubrimiento naturales como alginatos, los cuales no poseen una liberación regular, ya que en dependencia del pH el polímero puede sufrir contracción o hinchamiento, provocando respectivamente una respuesta más lenta o más rápida (Ghumman et al., 2020), o por sistemas liposomales los cuales presentan sensibilidad a los cambios de pH y pueden dar lugar a huecos en la estructura en los cuales fluye el fármaco hacia el exterior (Maestrelli et al., 2017)



**Figura 20. Perfil de liberación de metformina en microesferas incorporadas en gel.**

Es por esto que la formulación elaborada supone una ventaja en cuanto a la liberación prolongada de metformina, ya que ésta no llega a liberar más de un 1 % de la metformina contenida en la formulación dentro de las primeras 70 horas de estudio, lo que indica que se produce una sinergia en la prolongación de la liberación por parte de las microesferas y del hidrogel. Tal y como muestra el gráfico, en comparación con las formulaciones anteriores en las cuales se llegó a liberar más de la mitad de MF en las primeras 10 horas de estudio, en este caso no llega a liberarse más de un 0.5 % de la MF total, lo que nos indica que el propósito de retardar la liberación del gel fue alcanzado con éxito por medio de la unión de las dos formulaciones, algo que cobraría aún más sentido en el caso de la aplicación de esta formulación en estructuras fisiológicas debido a la facilidad para liberar el principio activo en pequeñas cantidades durante largos periodos de tiempo.

## **5. CONCLUSIONES**

- 1)** La formulación desarrollada de microesferas de PLA cargadas con MF fue optimizada en términos de eficacia de encapsulación mediante el uso de un diseño experimental que resultó en el uso de 40 mg de MF, 5 % p/v de NaCl, evaporación de DCM en campana a temperatura ambiente y un lavado.
- 2)** Tanto la formulación de microesferas poliméricas como la formulación del hidrogel Pluronic/Hialurónico permitieron alcanzar una liberación prolongada de MF a lo largo del tiempo por separado y también actuaron de manera sinérgica.
- 3)** El hidrogel Pluronic/Hialurónico no consiguió actuar como agente mucoadhesivo; por tanto, su uso debería limitarse en la cavidad bucal y otras mucosas, o en su defecto deberían añadirse agentes con mayor adhesividad a la formulación.
- 4)** La caracterización de la formulación de microesferas mostró una formulación estable en cuanto a la morfología de las mismas; sin embargo, se descubrieron fenómenos de recristalización de MF en el estudio térmico, y no se alcanzaron eficacias de encapsulación óptimas.
- 5)** La validación del método analítico fue exitosa y pudo demostrarse la idoneidad del método analítico de metformina mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Bouriche S, Alonso-García A, Cárceles-Rodríguez CM, Rezgui F, Fernández-Varón E. An in vivo pharmacokinetic study of metformin microparticles as an oral sustained release formulation in rabbits. *BMC Vet Res*. 2021; 17(1): 315.
- Ci L, Huang Z, Liu Y, Liu Z, Wei G, Lu W. Amino-functionalized poloxamer 407 with both mucoadhesive and thermosensitive properties: preparation, characterization and application in a vaginal drug delivery system. *Acta Pharm Sin B*. 2017; 7(5): 593-602.
- Cortizo AM, Sedlinsky C, McCarthy AD, Blanco A, Schurman L. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol*. 2006; 536(1-2): 38-46.
- Crotts G, Park TG. Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues. *J Microencapsul*. 1998; 15(6): 699-713.
- Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010; 3(11): 1451-1461.
- Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *J Liposome Res*. 2008; 18(3): 159-173.
- Fagien S, Bertucci V, von Grote E, Mashburn JH. Rheologic and Physicochemical Properties Used to Differentiate Injectable Hyaluronic Acid Filler Products. *Plast Reconstr Surg*. 2019; 143(4): 707e-720e.
- Fernández-Romero AM, Maestrelli F, García-Gil S, Talero E, Mura P, Rabasco A, et al. Preparation, Characterization and Evaluation of the Anti-Inflammatory Activity of Epichlorohydrin- $\beta$ -Cyclodextrin/Curcumin Binary Systems Embedded in a Pluronic<sup>®</sup>/Hyaluronate Hydrogel. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(24): 13566.
- Fullerton MD, Galic S, Marcinko K, Sikkema S, Pulinilkunnil T, Chen ZP, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med*. 2013; 19(12): 1649-1654.

- Galindo-Rodriguez SA, Allemann E, Fessi H, Doelker E. Polymeric nanoparticles for oral delivery of drugs and vaccines: a critical evaluation of in vivo studies. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2005; 22(5): 419-464.
- Gao Y, Xue J, Li X, Jia Y, Hu J. Metformin regulates osteoblast and adipocyte differentiation of rat mesenchymal stem cells. *J Pharm Pharmacol.* 2008; 60(12): 1695-1700.
- Ghumman SA, Noreen S, Tul Muntaha S. Linum usitatissimum seed mucilage-alginate mucoadhesive microspheres of metformin HCl: Fabrication, characterization and evaluation. *Int J Biol Macromol.* 2020; 155: 358-368.
- Hardie DG. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 185-210.
- Houshmand B, Tabibzadeh Z, Motamedian SR, Kouhestani F. Effect of metformin on dental pulp stem cells attachment, proliferation and differentiation cultured on biphasic bone substitutes. *Arch Oral Biol.* 2018; 95: 44-50.
- Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation. *Int J Pharm.* 2015; 496(2): 173-190.
- Jung YS, Park W, Park H, Lee DK, Na K. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. *Carbohydr Polym.* 2017; 156: 403-408.
- Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Yamauchi M, Sugimoto T. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 375(3): 414-419.
- Khalid S, Abbas G, Hanif M, Shah S, Shah SNH, Jalil A, et al. Thiolated sodium alginate conjugates for mucoadhesive and controlled release behavior of metformin microspheres. *Int J Biol Macromol.* 2020; 164: 2691-2700.
- Kumar A, Singh P, Nanda A. Hot stage microscopy and its applications in pharmaceutical characterization. *Appl Microsc.* 2020; 50(1): 12.
- Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010; 75(1): 1-18.

- Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: state of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm.* 2008 ;363(1-2): 26-39.
- Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51(7): 2074-2081.
- Nakamura F, Ohta R, Machida Y, Nagai T. In vitro and in vivo nasal mucoadhesion of some water-soluble polymers. *Int J Pharm.* 1996; 134(1-2): 173-181.
- Nakhare S, Vyas SP. Preparation and characterization of multiple emulsion based systems for controlled diclofenac sodium release. *J Microencapsul.* 1996; 13(3): 281-292.
- Nascimento MHM, Franco MKKD, Yokaichyia F, de Paula E, Lombello CB, de Araujo DR. Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: Influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. *Int J Biol Macromol.* 2018; 111: 1245-1254.
- Okochi H, Nakano M. Preparation and evaluation of w/o/w type emulsions containing vancomycin. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000; 45(1): 5-26.
- Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000; 348(3): 607-614.
- Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J.* 2015; 471(3): 307-322.
- Qu L, Dubey N, Ribeiro JS, Bordini E, Ferreira JA, Xu J, et al. Metformin-loaded nanospheres-laden photocrosslinkable gelatin hydrogel for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2021; 116: 104293.
- Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release.* 2003; 90(3): 261-280.
- Snima KS, Pillai P, Cherian AM, Nair SV, Lakshmanan VK. Anti-diabetic drug metformin: challenges and perspectives for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2014; 14(8): 727-736.

- Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond)*. 2012; 122(6): 253-270.
- Wang S, Xia Y, Ma T, Weir M, Ren K, Reynolds MA, et al. Novel metformin-containing resin promotes odontogenic differentiation and mineral synthesis of dental pulp stem cells. *Drug Deliv Transl Res*. 2019; 9(1): 85-96.
- Wen Q, Zhang Y, Luo J, Xiong K, Lu Y, Wu Z, et al. Therapeutic efficacy of thermosensitive Pluronic hydrogel for codelivery of resveratrol microspheres and cisplatin in the treatment of liver cancer ascites. *Int J Pharm*. 2020; 582: 119334.
- Ye M, Kim S, Park K. Issues in long-term protein delivery using biodegradable microparticles. *J Control Release*. 2010; 146(2): 241-260.
- Zheng L, Li C, Huang X, Lin W, Yang F, Chen T. Thermosensitive hydrogels for sustained-release of sorafenib and selenium nanoparticles for localized synergistic chemoradiotherapy. *Biomaterials*. 2019; 216: 119220.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001; 108(8): 1167-1174.



## 7. ANEXO 1

-Tabla 1:

	Área
Repetición 1	27033202
Repetición 2	27354641
Repetición 3	26929175
Repetición 4	27267964
Repetición 5	27318576
Repetición 6	26650991

Tabla 1. Repeticiones de medidas de área en HPLC. System suitability.

-Tabla 2:

MUESTRA	ÁREA
Solución NaCl Repetición 1	0
Solución NaCl Repetición 2	0
Solución PVA Repetición 1	0
Solución PVA Repetición 2	0
Solución PLA Repetición 1	0
Solución PLA Repetición 2	0
Solución Span 80 Repetición 1	0
Solución Span 80 Repetición 2	0

Tabla 2. Medidas de área de ensayo de especificidad o selectividad en HPLC de los distintos componentes de la formulación.

**-Tabla 3:**

<b>Muestra</b>	<b>Concentración</b>
<b>Estándar Metformina 0.1 mg/mL</b>	12463500
<b>Degradación Ácida</b>	12837310
<b>Degradación Básica</b>	12223369
<b>Degradación oxidativa</b>	12928893
<b>Degradación solar</b>	12232351
<b>Degradación UV</b>	11882974

**Tabla 3. Comparativa de áreas en HPLC entre muestra de metformina estándar, y muestras bajo condiciones de degradación forzada.**

**-Tabla 4:**

<b>Niveles</b>	<b>Muestra</b>	<b>Área</b>
50%	0.1mg/mL Repetición 1	13977774
	0.1mg/mL Repetición 2	13691793
	0.1mg/mL Repetición 3	14182873
75%	0.15mg/mL Repetición 1	19132178
	0.15mg/mL Repetición 2	20961900
	0.15mg/mL Repetición 3	20245254
100%	0.2mg/mL Repetición 1	27481874
	0.2mg/mL Repetición 2	27765444
	0.2mg/mL Repetición 3	27181539
125%	0.25mg/mL Repetición 1	33420830
	0.25mg/mL Repetición 2	34300196
	0.25mg/mL Repetición 3	33860513
150%	0.3mg/mL Repetición 1	40969088
	0.3mg/mL Repetición 2	40084023
	0.3mg/mL Repetición 3	41314518

**Tabla 4. Medidas de área en HPLC. Cálculo de linealidad a partir de distintas concentraciones de muestra en varios niveles.**

**-Tabla 5:**

Niveles	Muestra	Área
0.5%	0.001 mg/mL Repetición 1	123244
	0.001 mg/mL Repetición 2	125606
	0.001 mg/mL Repetición 3	121367
0.75%	0.0015 mg/mL Repetición 1	209803
	0.0015 mg/mL Repetición 2	202324
	0.0015 mg/mL Repetición 3	205924
1%	0.002 mg/mL Repetición 1	264782
	0.002 mg/mL Repetición 2	268846
	0.002 mg/mL Repetición 3	263084
1.25%	0.0025 mg/mL Repetición 1	342528
	0.0025 mg/mL Repetición 2	334312
	0.0025 mg/mL Repetición 3	332014
1.50%	0.003 mg/mL Repetición 1	401018
	0.003 mg/mL Repetición 2	429655
	0.003 mg/mL Repetición 3	409658

**Tabla 5. Medidas de área en HPLC. Cálculo de linealidad baja a partir de distintas concentraciones de muestra en varios niveles.**

**-Tabla 6:**

<b>Estándar 0.2mg/mL</b>	<b>Área</b>
Repetición 1	27404968
Repetición 2	27337588
Repetición 3	27304312
Repetición 4	27630869
Repetición 5	27110236
Repetición 6	27340482
Repetición 7	27302209
Repetición 8	27804728
Repetición 9	27349307
Repetición 10	27028040
Media	27361274
Desviación Estándar	224395
% RSD	0,82

**Tabla 6. Medidas de área en HPLC de una misma muestra pinchada diez veces**

**-Tabla 7:**

<b>Niveles</b>	<b>Repetición</b>	<b>Concentración</b>	<b>Área</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación</b>	<b>%RSD</b>
<b>50%</b>	1	0.1 mg/mL	13066566	12981104	93276	0.72
	2	0.1 mg/mL	12995142			
	3	0.1 mg/mL	12881605			
<b>100%</b>	1	0.2 mg/mL	26901213	266447402	420733	1.57
	2	0.2 mg/mL	26879247			
	3	0.2 mg/mL	26161747			
<b>150%</b>	1	0.3 mg/mL	37759704	37061398	1250791	3.3
	2	0.3 mg/mL	37807122			
	3	0.3 mg/mL	35617368			
				<b>Media %RSD</b>	<b>1.86</b>	

**Tabla 7. Medidas de área en HPLC de muestras de estándar de metformina a distintos niveles por triplicado.**

**-Tabla 8:**

<b>Estándar Metformina 1</b>		
	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>
<b>Analista 1</b>	29644401	29862107
<b>Analista 2</b>	29509833	29583142
<b>Media</b>	29649871	
<b>Desviación estándar</b>	151808	
<b>%RSD</b>	0.51	

**Tabla 8. Comparación de medidas de estándares de metformina entre diferentes analistas, diferentes días y diferentes muestras**

**-Tabla 9:**

<b>Estándar Metformina 2</b>		
	<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>
<b>Analista 1</b>	25820961	25927113
<b>Analista 2</b>	25601425	25624266
<b>Media</b>	25743441	
<b>Desviación Estándar</b>	157179	
<b>%RSD</b>	0.61	

**Tabla 9. Comparación de medidas de estándares de metformina entre diferentes analistas, diferentes días y diferentes muestras**

**-Tabla 10:**

<b><u>Niveles</u></b>	<b><u>Repetición</u></b>	<b><u>Concentración</u></b>	<b><u>Área</u></b>	<b><u>Factor de respuesta</u></b>
<b>1%</b>	1	0.002 mg/mL	263084	131542000
	2	0.002 mg/mL	268846	134423000
	3	0.002 mg/mL	264782	132391000
<b>* 0.75%</b>	1	0.0015 mg/mL	205924	137282666,7
	2	0.0015 mg/mL	202324	134882666,7
	3	0.0015 mg/mL	209803	139868666,7
<b>0.5%</b>	1	0.001 mg/mL	121367	121367000
	2	0.001 mg/mL	125606	125606000
	3	0.001 mg/mL	143244	143244000
<b>0.25%</b>	1	0.0005 mg/mL	0	0
	2	0.0005 mg/mL	0	0
	3	0.0005 mg/mL	0	0
			Media	133400777
			Desviación Estándar	6773825
			% RSD	5

**Tabla 10. Resultados de áreas en cálculo de límites de cuantificación en HPLC.**

- **Tabla 11:**

<u>Concentración</u> <u>(mg/mL)</u>	<u>Área</u>	<u>Factor de</u> <u>Respuesta</u>	<u>Media</u>	<u>Desviación</u>	<u>%RSD</u>
0.1	13977774	139777740	<u>139508133,3</u>	2466476,23	1,76
0.1	13691793	136917930			
0.1	14182873	141828730			
0.15	19132178	127547853,3	<u>133865182,2</u>	5844356,99	4,36
0.15	20861900	139079333,3			
0.15	20245254	134968360			
0.2	27481874	137409370	137381428,3	1459963,05	1,06
0.2	27765444	138827220			
0.2	27181539	135907695			
0.25	33420830	133683320	135442052	1758732	1,29
0.25	34300196	137200784			
0.25	33860513	135442052			
0.3	40969088	136563626,7	135964032,2	2115542,08	1,55
0.3	40084023	133613410			
0.3	41314518	137715060			
			<b>Media %RSD</b>		<b>2%</b>

**Tabla 11. Cálculo de %RSD total. Evaluación del Test de la Pendiente para la Linealidad.**



**-Tabla 12:**

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>Área</b>	<b>Factor de Respuesta</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación</b>	<b>%RSD</b>
0,001	123244	123244000	123405666,7	2124119,19	1,72
0,001	125606	125606000			
0,001	121367	121367000			
0,0015	209803	139868666,7	137344666,7	2493578,152	1,81
0,0015	202324	134882666,7			
0,0015	205924	137282666,7			
0,002	264782	132391000	132785333,3	1480427,078	1,11
0,002	268846	134423000			
0,002	263084	131542000			
0,0025	342528	137011200	134513866,7	2211048,958	1,64
0,0025	334312	133724800			
0,0025	332014	132805600			
0,003	401018	133672666,7	137814555,6	4896346,669	3,55
0,003	429655	143218333,3			
0,003	409658	136552666,7			
			<b>Media %RSD</b>		<b>1,64%</b>

**Tabla 12. Cálculo de %RSD total. Evaluación del Test de la Pendiente para la Linealidad Baja.**