



**FORMULACIÓN DE  
MICROPARTÍCULAS DE  
METFORMINA A PARTIR DE  
BIOPOLÍMEROS Y FIJADAS  
EN GELES  
BIODEGRADABLES.  
APLICACIÓN EN LA  
MEDICINA REGENERATIVA**

**Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla  
María González Boronat  
Curso 2021/2022**



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA**

**Grado en Farmacia  
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**FORMULACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE  
METFORMINA A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS Y FIJADAS  
EN GELES BIODEGRADABLES. APLICACIÓN A LA  
MEDICINA REGENERATIVA**

**ALUMNA: María González Boronat**

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

**TIPO DE PROYECTO: Experimental**

**PRESENTACIÓN: Facultad de Farmacia**

**FECHA: julio de 2022**

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo de investigación no podría haberse llevado a cabo sin la intervención, interés y dedicación constante de mi tutora la doctora D<sup>a</sup>. María Luisa González Rodríguez, a quien agradezco todo ello y el haber despertado en mí, anteriormente, como profesora, motivación hacia la Tecnología farmacéutica. Mi reconocimiento también para el doctor D. Antonio María Rabasco Álvarez, con quien inicié mi trabajo en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica el curso anterior y para el doctor D. Juan Manuel Ginés Dorado por su colaboración en el estudio de microscopía de platina caliente. A todos ellos, mi agradecimiento y admiración por el trabajo realizado y el tiempo compartido conmigo.

Agradecer también a Ana Fernández Romero por su participación en el trabajo de investigación y, por supuesto, el apoyo que mi familia y amigos me han brindado durante todo este proceso. Gracias a todos ellos, su ayuda y motivación han sido fundamentales para lograr el objetivo que marcamos al inicio del curso.

## **RESUMEN**

La metformina, por su efecto hipoglucemiante, se emplea comúnmente en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2. Asimismo, se ha demostrado que posee un efecto osteogénico, al promover la diferenciación de células madre mesenquimales y los preosteoblastos, resultando útil en el tratamiento de la pérdida ósea por periodontitis.

Con el objetivo de alcanzar estrategias mínimamente invasivas que posibiliten la reconstrucción de los defectos óseos, se planteó su encapsulación en microsferas de PLA mediante el método de la doble emulsión y extracción de solvente y, estas, a su vez, incorporarlas en un hidrogel para prolongar el tiempo de liberación de la metformina en la región periodontal. Para optimizar la eficacia de encapsulación, se aplicó la metodología del *Quality-by-Design* (matriz de Taguchi L9) para estudiar la influencia de cuatro variables a tres niveles: cantidad de metformina en la fase acuosa, cantidad de NaCl, proceso de evaporación y número de lavados. Se caracterizó la formulación optimizada en términos de morfología, eficacia de encapsulación y compatibilidad fármaco-excipientes.

El gel se formuló con Pluronic® F127, hidroxipropilmetilcelulosa, propilenglicol y quitosano, al que se incorporaron las micropartículas con la formulación optimizada. Se realizaron ensayos de pH, mucoadhesividad, reología y tiempo de gelificación. Finalmente, se realizaron estudios de liberación y permeación *in vitro*.

El análisis estadístico de los resultados de la matriz estableció la composición de las microsferas en 40 mg de metformina y 25 mg de NaCl; además, la evaporación del disolvente se realizaría en campana a temperatura ambiente y la muestra se sometería a un proceso de lavado. Se consiguió una eficacia de encapsulación del 47 %. El estudio térmico de las microsferas reveló una interacción del fármaco con algún componente de la formulación, causando una aparente cristalización y una disminución en el valor de encapsulación. El análisis reológico del gel mostró una disminución de la viscosidad con la temperatura, por coexistencia de diferentes geles que podrían enmascarar el efecto termosensible del Pluronic®. La metformina experimentó una liberación lenta, ampliando así la duración de su actividad.

**PALABRAS CLAVE:** Metformina, doble emulsión, microsferas, hidrogel, periodontitis

## ÍNDICE

Índice de Abreviaturas. . . . .	4
Índice de Figuras y Tablas. . . . .	4
1. Introducción . . . . .	6
2. Objetivos . . . . .	8
3. Metodología . . . . .	8
3.1. Puesta a punto del método analítico de MF por HPLC. . . . .	8
3.2. Elaboración de las micropartículas . . . . .	9
3.3. Diseño de experimentos (DoE). . . . .	10
3.4. Caracterización de las micropartículas . . . . .	11
3.4.1. Morfología . . . . .	11
3.4.2. Eficacia de encapsulación. . . . .	12
3.4.3. Análisis térmico . . . . .	12
3.4.3.1. Calorimetría diferencial de barrido. . . . .	12
3.4.3.2. Microscopia en platina caliente . . . . .	13
3.5. Formulación y caracterización del gel. . . . .	13
3.5.1. Composición del gel . . . . .	13
3.5.2. Formulación de micropartículas en gel. . . . .	14
3.5.3. Caracterización de micropartículas en geles. . . . .	15
3.5.3.1. Estudio reológico . . . . .	15
3.5.3.2. pH . . . . .	15
3.5.3.3. Estudio de mucoadhesividad. . . . .	15
3.5.3.4. Tiempo de gelificación. . . . .	16
3.6. Estudio de permeación in vitro. . . . .	16
4. Resultados y Discusión. . . . .	17
4.1. Estudios preliminares sobre la formulación de micropartículas. . . . .	17
4.1.1. Efecto de la ratio PLA/PLGA . . . . .	17
4.1.2. Presencia de trehalosa . . . . .	19
4.2. Diseño de experimentos. . . . .	19
4.2.1. Análisis de la varianza (ANOVA) . . . . .	20
4.2.2. Análisis de las medias marginales (ANOM) . . . . .	21
4.2.3. Diagrama de Pareto . . . . .	23
4.2.4. Análisis de regresión y superficies de respuesta . . . . .	24

4.3. Caracterización de las microsferas . . . . .	26
4.3.1. Morfología . . . . .	26
4.3.2. DSC y HSM. . . . .	26
4.4. Caracterización del hidrogel . . . . .	30
4.4.1. Reología. . . . .	30
4.4.2. pH. . . . .	33
4.4.3. Mucoadhesividad. . . . .	33
4.4.4. Tiempo de gelificación . . . . .	33
4.5. Estudios de permeación in vitro. . . . .	34
5. Conclusiones. . . . .	35
6. Bibliografía. . . . .	36

## **ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

- DCM: Diclorometano
- DM2: Diabetes mellitus 2
- DoE: Diseño de Experimentos
- DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido
- EE: Eficacia de Encapsulación
- FDA: Food and Drug Administration
- HPLC: High Performance Liquid Chromatography
- HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa
- HSM: Microscopía de platina caliente
- MF: Metformina
- MP: Micropartículas
- PG: Propilenglicol
- PLA: Ácido poliláctico
- PLGA: Poliácido láctico-co-glicólico.
- PVA: Acetato de polivinilo

## **ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS**

- Figura 1. Preparación de las microsferas por el método de la doble emulsión y extracción del solvente. MF (metformina), PLA (ácido poliláctico), DCM (diclorometano) y PVA (acetato de polivinilo).
- Figura 2. Composición final del gel.
- Figura 3. Equipo para el desarrollo del ensayo de mucoadhesividad.
- Figura 4. Celdas de difusión de Franz.
- Figura 5. Micropartículas variando la ratio PLA/PLGA observadas con microscopio óptico con objetivo x10.
- Figura 6. Cromatograma del estándar de metformina obtenido por HPLC.
- Figura 7. Análisis de la varianza (ANOVA) de los experimentos realizados.
- Figura 8. Gráficos de Análisis de las Medias (ANOM) correspondientes a la EE con respecto a la cantidad de MF (A), proceso de evaporación (B), cantidad de NaCl (C) y número de lavados (D).
- Figura 9. Efecto osmótico del NaCl en la fase acuosa de la emulsión.
- Figura 10. Diagramas de Pareto que recogen los efectos I-hat. MF (10 y 40 mg) (A), NaCl 1 y 5 % p/v (B), proceso de evaporación (Campana y Rotavapor a 40 °C) (C), número de lavados (1 y 3) (D), MF (10, 40 y 25 mg) (E), número de

- lavados (1, 3 y 2) (F), NaCl (1, 3 y 5 % p/v) (G), proceso de evaporación (Campana, Rotavapor a 40 °C y Rotavapor a temperatura ambiente) (H).
- Figura 11. Superficies de respuesta de las variables: Cantidad de MF (A), Cantidad de NaCl (B) y Número de lavados (C).
  - Figura 12. Micropartículas con microscopio óptico con los objetivos x10, x40 y x100.
  - Figura 13. Termogramas de Metformina, PLA, NaCl, PVA, microsferas, mezcla física PLA y MF en la proporción real de la muestra y PLA y MF en proporción 1:1.
  - Figura 14. HSM. Fusión de las microsferas a la temperatura de 170°C.
  - Figura 15. HSM de la mezcla metformina y PLA en la proporción de la mezcla física. Metformina y PLA en contacto a 210°C (A). Metformina prácticamente fundida a 225°C (B).
  - Figura 16. HSM. Recristalización de las microsferas a la temperatura de 123°C.
  - Figura 17. Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) para Pluronic<sup>®</sup> + Agua (a), Pluronic<sup>®</sup> + HPMC + Agua (b), Pluronic<sup>®</sup> + HPMC + PG + Agua (c), Pluronic<sup>®</sup> + HPMC + PG + Chitosano (d), Pluronic<sup>®</sup> + HPMC + PG + Chitosano + MP (e).
  - Figura 18. Método de inversión empleado en el ensayo de tiempo de gelificación. Imagen de la izquierda: gel en nevera. Imagen de la derecha: gel a 37 °C.
  - Figura 19. Comparación de los perfiles de liberación de la solución de metformina con respecto al gel con metformina.
  - Figura 20. Comparación de los perfiles de liberación de las micropartículas y las micropartículas incorporadas en el gel.
  - Tabla 1. Experimentos correspondientes a la matriz ortogonal de Taguchi L9.  
TA: temperatura ambiente.
  - Tabla 2. Resultados de eficacia de encapsulación obtenidos por el DoE.



## 1. INTRODUCCIÓN

Metformina (MF), perteneciente al grupo de las biguanidas, se trata del fármaco más común en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), gracias a su efecto hipoglucemiante. El mecanismo de acción de este fármaco consiste en la reducción de la producción de glucosa hepática (gluconeogénesis), significativamente elevada en este tipo de diabetes, ya que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria (Viollet et al., 2012) y, en consecuencia, la fosforilación oxidativa. Esto produce un aumento de la ratio AMP/ATP que activa, a su vez, a la proteína quinasa activada por monofosfato de adenina (AMPK) del hígado, enzima importante en el control metabólico (Towler y Hardie, 2007).

Los mecanismos dependientes de AMPK contribuyen a la inhibición de mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), proteína que ayuda a controlar funciones celulares, a la activación de PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator- activated receptor  $\gamma$  y coactivator 1 $\alpha$* ), proteína involucrada en la regulación transcripcional de muchos genes, y regulan la transcripción mediante modificaciones de DNA/Histona y miRNAs. La inhibición también conduce a efectos AMPK independientes que incluyen la reducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), productos finales de glicación avanzada y, por lo tanto, a una reducción del daño macromolecular (Kulkarni et al., 2020). A su vez, la MF aumenta la captación y utilización de glucosa por parte del músculo esquelético y disminuye la absorción de hidratos de carbono. Como mecanismos secundarios, la MF incrementa la oxidación de ácidos grasos y disminuye los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos.

Entre las posibles aplicaciones, además del tratamiento de la DM2, la MF se utiliza en el tratamiento de otros síndromes asociados con resistencia a la insulina, tales como el síndrome del ovario poliquístico, la hepatopatía grasa no alcohólica, la diabetes gestacional y ciertas formas de pubertad prematura (Rang y Dale, 2016). Cabría mencionarse también que algunos estudios han demostrado que este fármaco tiene un efecto osteogénico al promover la diferenciación de células madre mesenquimales y los preosteoblastos. En concreto, se sabe que induce la diferenciación de osteoblastos mediante la activación de la vía de señalización de la quinasa activada por AMP (Houshmand et al., 2018; Zhang et al., 2020). Además, facilita la formación del hueso al promover la actividad de la fosfatasa alcalina y la formación de colágeno (Lamia et al., 2004; Cortizo et al., 2006; Jang et al., 2011).

La restauración de defectos óseos craneomaxilofaciales causados por traumatismos, enfermedades o resección de tumores continúa siendo un importante desafío en clínica (Greenwald et al., 2001; Loi et al., 2016). Asimismo, la pérdida ósea debido a la enfermedad periodontal se considera un subconjunto de este tipo de lesiones.

A lo largo de los años, se han evaluado numerosas alternativas terapéuticas para promover la reconstrucción de defectos óseos alveolares, como el injerto óseo autógeno, combinado con una membrana de regeneración ósea controlada (Qu et al., 2019), el uso de derivados de plaquetas, de biomateriales, etc., y el desarrollo de técnicas quirúrgicas. Si bien el uso de hueso autógeno se ha considerado como “goldstandard” para soportar las membranas, este se asocia, sin embargo, a una elevada tasa de complicaciones, sobre todo en pacientes de edad avanzada (Qu et al., 2019) y problemas asociados a las propias membranas.

Debido al crecimiento de la población anciana, es fundamental ampliar el arsenal quirúrgico para atender estrategias mínimamente invasivas que promuevan de manera confiable la reconstrucción de los defectos óseos. La mucosa oral presenta una estructura funcional y anatómica muy diferente a la de la piel. Sus condiciones de humedad, permeabilidad y motilidad dificultan la aplicación de tratamientos y, por tanto, se precisan de vehículos adecuados para ser aplicados en dicha región. De ahí, la necesidad de un biomaterial con propiedades mecánicas y biológicas adecuadas que ofrezca un efecto biomimético que favorezca la adhesión, supervivencia y diferenciación celular (Place et al., 2009; Qu et al., 2019).

En términos generales, los hidrogeles constituyen estructuras blandas y porosas basadas en redes de polímeros naturales y/o sintéticos con alto contenido de agua que imitan la matriz extracelular (Lutolf y Hubbell, 2005; Huang et al., 2019). Además, su alto grado de flexibilidad, baja toxicidad, biodegradabilidad y el hecho de presentar estructuras fácilmente modificables, particularmente con biomoléculas que exhiben propiedades regenerativas, hacen que esta clase de biomateriales sea muy atractiva para la ingeniería de tejidos óseos (Ribeiro et al., 2020; Dubey et al., 2020). La dificultad se presenta al intentar añadir MF, debido a sus problemas de estabilidad. No obstante, el aspecto más desafiante es ofrecer un sistema reservorio localizado y un sistema de liberación controlada de este fármaco para evitar la rápida liberación de MF en el sitio del hueso afectado y asegurar que el fármaco se libere en cantidades muy pequeñas en el lugar de acción (Rao et al., 2013; Pankaj et al., 2018).

## **2. OBJETIVOS**

En base a lo anteriormente descrito, el objetivo general del trabajo es desarrollar una forma de administración local que permita liberar MF a una velocidad muy lenta desde la estructura de la microesfera incluida en el hidrogel. Se opta, para ello, por la formulación de un hidrogel híbrido, de formación *in situ*, a base de biopolímeros hidrófilos biocompatibles, cargado con microsferas de ácido poliláctico (PLA) que contienen la MF, que facilite la obtención de un sistema que permita la liberación a nivel de la mucosa alveolar y del folículo dental para promover la regeneración ósea.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

- Obtener y caracterizar una formulación de microsferas de PLA que contenga una dosis de MF capaz de encapsular el fármaco y liberar el fármaco a velocidad lenta durante un periodo de tiempo prolongado.
- Formular y caracterizar un gel hidrófilo a base de Pluronic® F127, HPMC, quitosano y propilenglicol, con el fin de obtener un gel de formación *in situ*, capaz de retener la formulación en el tejido alveolar.
- Obtener y caracterizar una formulación de microsferas en gel capaz de controlar la liberación de MF durante periodos de tiempo prolongados.

## **3. METODOLOGÍA**

### **3.1. PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO ANALÍTICO DE MF POR HPLC**

La MF se cuantificó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). El análisis se llevó a cabo utilizando un equipo Hitachi Elite LaChrom. La columna empleada fue LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 125-4. La fase móvil estaba constituida por una solución tampón PBS de dihidrogenofosfato de potasio ajustada a pH 6,8 (0,02 M) y acetonitrilo, en proporción 30:70. El flujo se fijó en 1,5 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 µL.

Para la cuantificación de MF, las muestras se filtraron utilizando filtros de 0,45µm (Whatman<sup>TH</sup>) y se introdujeron posteriormente en viales de HPLC topacio, comparando las áreas de los distintos picos con el área del pico obtenido en una solución estándar de concentración conocida (50 µg/mL).

### **3.2. ELABORACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS**

El objetivo principal de los sistemas de liberación de fármacos es liberar la cantidad deseada de fármaco en un lugar específico del organismo durante el periodo de tiempo deseado. Una de las aproximaciones es el empleo de micropartículas portadoras de fármaco. Estas micropartículas ofrecen gran efectividad, menor toxicidad y mejor estabilidad que formas convencionales (Naha et al., 2008).

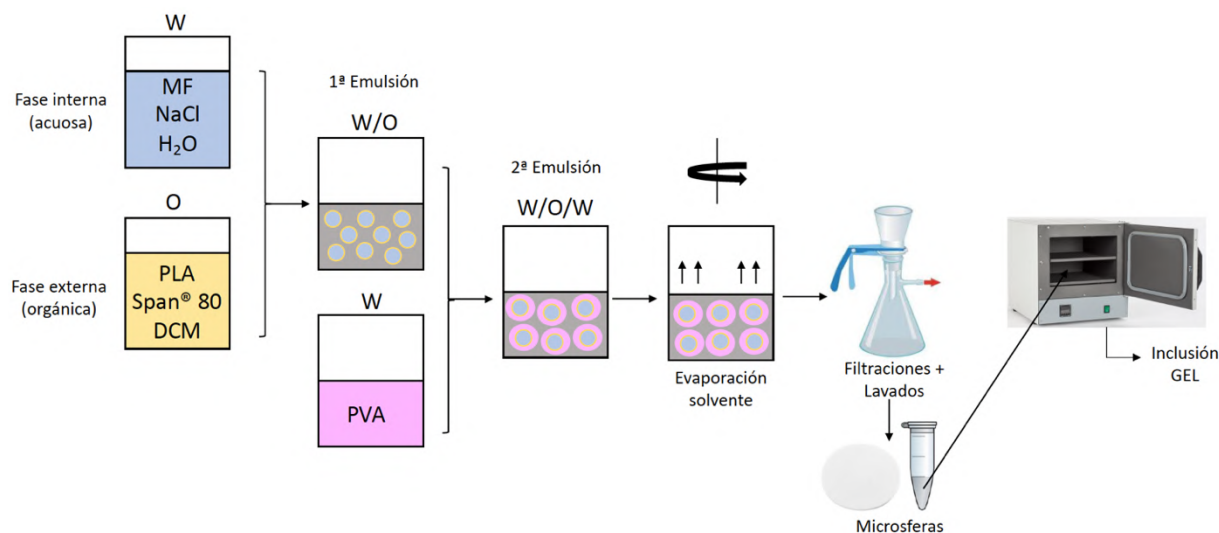
El método de la emulsión O/W y extracción de solvente es comúnmente usada para encapsular fármacos lipófilos mediante técnicas de microencapsulación. Sin embargo, este método no es eficaz para el atrapamiento de fármacos hidrófilos, como es el caso de nuestro fármaco MF, debido a su rápida disolución en la fase continua acuosa. Este problema se puede solventar a través del método de la doble emulsión y extracción del solvente (Giri K et al., 2012), dando lugar a emulsiones del tipo W/O/W.

Para la preparación de las microsferas, se procedió a disolver 100 mg de PLA Resomer<sup>®</sup> L207S en 5 mL de diclorometano (DCM), seguido de 50  $\mu$ L del emulgente Span<sup>®</sup> 80 (A). Por otro lado, se disolvieron 40 mg de MF y 25 mg de NaCl en 500  $\mu$ L de agua purificada (B). Se añadieron mediante goteo 0,5 mL de la solución (B) sobre la fase orgánica (A) y se emulsionó en Ultraturrax a 9000 rpm durante 1 minuto, formándose la primera emulsión W/O. Se utilizó un baño de hielo durante el proceso de agitación. La estabilidad de la primera emulsión es un requisito previo indispensable para conseguir una doble emulsión W/O/W estable (Kanouni et al., 2002).

Para llevar a cabo la segunda emulsión, también inmersa en baño de hielo, se dispersó la emulsión anterior W/O sobre 7,5 mL de una solución acuosa de alcohol polivinílico (PVA, 85-90 % hidrólisis, MW3 30000-70000) al 2 % p/v, previamente ajustada a pH 4, usando homogeneizador IKA a 1000 rpm durante 2 minutos. Posteriormente, se diluyó la emulsión anterior en 10 mL de solución de PVA y se vertió en un vaso de precipitado de 100 mL con agitador magnético.

El DCM se evaporó en la campana con ayuda de un agitador (IKA<sup>®</sup> RT1 Werke) a temperatura ambiente a una velocidad de 400 rpm. Una vez evaporado este, se procedió a la filtración con kitasato. En primer lugar, se llevó a cabo una filtración grosera y se recogió el producto retenido en el filtro. El líquido filtrado se volvió a pasar a través de un filtro de tamaño de partícula 0,45  $\mu$ m y el nuevo líquido de filtrado se recogió para posterior estudio en el HPLC. Por último, el filtro anterior se lavó con 10 mL de agua purificada. Se recuperó de nuevo el líquido filtrado, correspondiente al lavado, para

estudio en HPLC. El producto sólido obtenido, junto con el recogido del primer filtro, se introdujo en eppendorf y se sometió a secado en estufa durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, se observó la formación de las microsferas al microscopio óptico. En la Figura 1, se recoge una representación esquemática del proceso de obtención.



**Figura 1.** Preparación de las microsferas por el método de la doble emulsión y extracción del solvente. MF (metformina), PLA (ácido poliláctico), DCM (diclorometano) y PVA (acetato de polivinilo).

En este estudio, se llevaron a cabo estudios preliminares introduciendo diferentes variables en la formulación. Entre otras, las variables estudiadas fueron la combinación del PLA con un polímero más hidrófilo que este, el PLGA, la liofilización como proceso de obtención del producto sólido, y la utilización de trehalosa como crioprotector en la etapa de liofilización.

### **3.3. DISEÑO DE EXPERIMENTOS (DoE)**

La preparación de sistemas de administración de fármacos en formulaciones microparticulares implica el manejo y la optimización de un gran número de factores. En este estudio, se aplicó el diseño de experimentos (DoE), herramienta estadística para la optimización de la formulación, que permitió la variación de distintos factores simultáneamente identificando cuáles influían y en qué medida lo hacían, reduciendo el número de ensayos experimentales y el tiempo necesario (González-Rodríguez et al.,

2012) con el objetivo de optimizar la eficacia de encapsulación (EE) del fármaco. El software utilizado fue DoEPack.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de cribado de distintos factores, seleccionando una matriz ortogonal de Taguchi L9, con el fin de conocer aquellos factores que influían significativamente en las respuestas seleccionadas. En nuestro caso, las variables estudiadas fueron: cantidad de MF, cantidad de NaCl, proceso de evaporación del DCM y número de lavados, a tres niveles cada uno. Con esta herramienta, se reduce el número de experimentos de 81 que supondría un diseño factorial completo, a 9, cuyos experimentos a realizar quedan recogidos en la tabla 1.

<b>Experimento</b>	<b>MF (mg)</b>	<b>NaCl (%)</b>	<b>Proceso Evaporación</b>	<b>Número Lavados</b>
1	10	1	Campana	1
2	10	3	Rotavapor TA	2
3	10	5	Rotavapor 40	3
4	25	1	Rotavapor TA	3
5	25	3	Rotavapor 40	1
6	25	5	Campana	2
7	40	1	Rotavapor 40	2
8	40	3	Campana	3
9	40	5	Rotavapor TA	1

**Tabla 1.** Experimentos correspondientes a la matriz ortogonal de Taguchi L9. TA: temperatura ambiente.

Tras la realización de los experimentos, los datos fueron tratados realizando análisis de la varianza (ANOVA), de las medias marginales (ANOM), de regresión y superficies de respuesta y mediante el diagrama de Pareto.

### **3.4. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS**

#### **3.4.1. Morfología**

La forma y la superficie de las microsferas se examinaron mediante el microscopio óptico Olympus BH-2. La observación de las microsferas se realizó dispersando estas en una gota de agua, tras secado en estufa durante 24 °C con el objetivo de 10x, 40x y 100x.

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

La EE se obtuvo mediante el estudio del líquido filtrado por la técnica de HPLC. Se determinó la cantidad no encapsulada de MF y, por diferencia con respecto a la cantidad inicial añadida, se estimó la cantidad encapsulada expresada en porcentaje.

### **3.4.3. Análisis térmico**

El análisis térmico comprende el estudio de evolución de las propiedades de una muestra cuando es sometida a altas temperaturas. Los métodos térmicos se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica para detectar incompatibilidades entre fármaco y excipiente y para valorar la pureza de muestras de fármacos.

#### **3.4.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*) es una técnica que detecta transiciones endotérmicas y exotérmicas, así como la determinación de temperaturas de transformación y la entalpía de sólidos y líquidos en función de la temperatura. En este ensayo, tanto la muestra como la referencia se mantienen a la misma temperatura y se miden las diferencias entre la cantidad de calor aportado a una sustancia y su referencia en función de la temperatura de la muestra cuando ambas están sometidas a un programa de temperatura controlado.

Mediante los termogramas obtenidos, es posible caracterizar el comportamiento térmico de la materia. Los picos generados son el resultado tanto de cambios físicos como de reacciones químicas inducidas por los cambios de temperatura en la muestra. Las áreas de dichos picos en los termogramas dependen fundamentalmente de la masa de la muestra y de la entalpía del proceso que haya tenido lugar (Arroyo-García, 2018).

Para ello, se empleó un calorímetro diferencial de barrido (DSC-131 Setaram, France). Los pesos de las muestras se situaban en el rango comprendido entre 5 y 10 mg. Estas se introdujeron en crisoles de aluminio, cuyas tapas fueron ligeramente perforadas con el fin de facilitar la salida del gas durante el calentamiento. El análisis térmico se realizó bajo atmósfera de aire estática, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, en un intervalo máximo de temperaturas de 30 a 350 °C.

Las muestras para analizar fueron MF, PLA, NaCl, PVA, mezcla física de MF y PVA y MF y PLA en proporción al 50 %, mezcla física de MF y PLA en la proporción de la formulación, mezcla física de MF, PLA y NaCl al 33 % cada componente y, por último, microsferas.

#### **3.4.3.2. Microscopía en platina caliente (HSM)**

Esta técnica, de carácter complementario, se basa en el calentamiento gradual de la muestra en estudio mediante una platina caliente que va aumentando la temperatura a una velocidad constante, mientras la muestra se visualiza al microscopio óptico. Gracias a esta técnica, se puede observar el comportamiento de los sólidos con la temperatura y esclarecer algún fenómeno recogido en el DSC.

Para la realización de estas pruebas, se colocó en un portaobjetos una pequeña cantidad del producto para analizar y se procedió a su calentamiento. El estudio se realizó teniendo en cuenta los picos, tanto endotérmicos como exotérmicos, que aparecieron en los termogramas del DSC para buscar una explicación a los fenómenos que pudieran estar ocurriendo (Fernández-Romero et al., 2018). Asimismo, y en base a los DSC obtenidos, se realizó una prueba de determinación de agua presente en las microsferas dado que el proceso de elaboración fue en presencia de agua.

De esta técnica, al igual que de la del DSC, se intentó averiguar las temperaturas a las que funden los distintos compuestos, así como su comportamiento cuando contactan entre ellos.

### **3.5. FORMULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL GEL**

#### **3.5.1. Composición del gel**

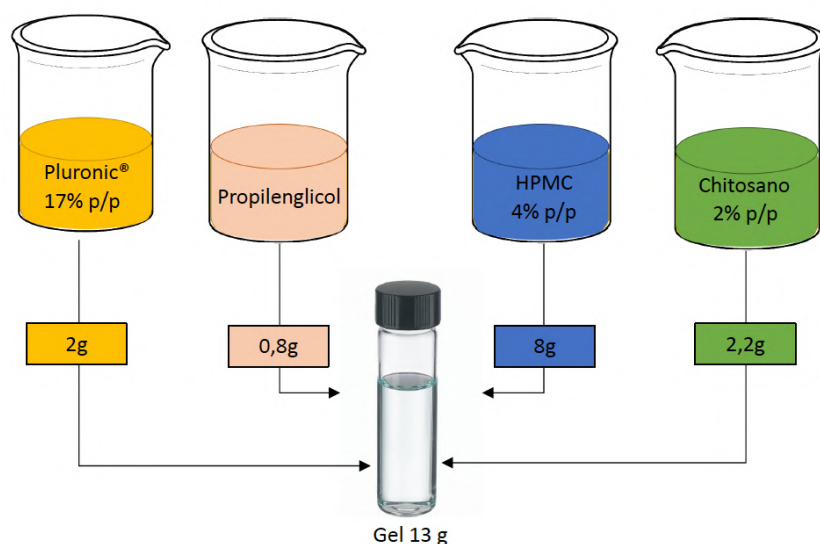
Basándose en estudios anteriores, la composición que se utilizó para elaborar el hidrogel fue: HPMC, chitosano, Pluronic® F127 y propilenglicol. Tanto Pluronic® como el chitosano poseen capacidad mucoadhesiva, ventaja para la administración de la MF en la mucosa bucal. El HPMC se incluyó como agente gelificante para aumentar la



consistencia. Además, se añadió un plastificante, el propilenglicol para aportar flexibilidad a la formulación.

Para garantizar la mucoadhesividad del gel, se añadió chitosano a una concentración del 2 % p/v. El chitosano se disuelve en medio ácido, por lo que se añadió ácido acético al 1 % para facilitar su disolución. Tras estudios previos, se determinó que la cantidad de chitosano que se añadió al gel sería de 2,2 gramos (Aretio, 2019).

Para la preparación del gel, se pesó en vaso de precipitado 8 g de HPMC al 4 % p/v, 2 g de Pluronic® al 17 % p/v, 0,8 g de propilenglicol y 2,2 g de chitosano de alta viscosidad al 2 % p/p. Para la disolución del Pluronic®, se usó un baño con hielo, ya que geles preparados con este polímero disminuyen su viscosidad en frío, de igual manera que esta aumenta con el incremento de la temperatura. Todas las disoluciones madre se prepararon con agua purificada. A continuación, se agitó la mezcla durante 3 horas para que se interpusieran todos los componentes. Se obtuvo un gel de 13 gramos (Figura 2).



**Figura 2.** Composición final del gel.

### 3.5.2. Formulación de micropartículas en gel

Una proporción fija en peso de micropartículas (35 mg en 1,3 g de gel) se incorporó en el gel de Pluronic® en frío, por ser este el gel de menor viscosidad y en el que la interposición de las microsferas era más homogénea. Una vez agitada la mezcla en vortex, y adecuadamente incorporadas las microsferas en el gel, se adicionaron sucesivamente el propilenglicol, chitosano y HPMC.

### 3.5.3. Caracterización de micropartículas en geles

#### 3.5.3.1. Estudio reológico

Para analizar más a fondo la fórmula optimizada y la interacción entre los componentes del gel, se calcularon los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ). Las muestras fueron analizadas en un reómetro (Discovery HR-3 hybrid rheometer, TA Instruments, New Castle, DE, USA) de placas paralelas de 40 mm de diámetro. Las condiciones fijadas fueron: rango de temperatura 15-65 °C, velocidad 2 °C/min, frecuencia 1 Hz y estrés oscilatorio 0,1 %. Otra función usada para describir el comportamiento viscoelástico de materiales es la tangente del ángulo de desfasamiento, denominada tangente  $\delta$ . La  $\tan \delta$  indica la relación entre la porción viscosa y elástica de la muestra y su fórmula es:  $\tan(\delta) = G''/G'$  (Martínez Pacheco, 2016).

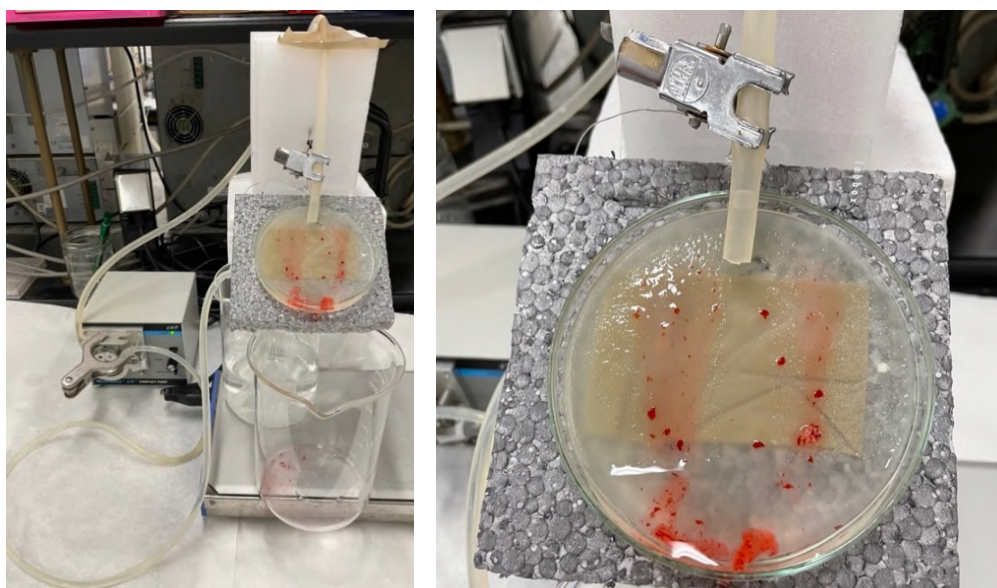
Cuando  $G'$  y  $G''$  se cruzan y  $\tan \delta$  es 1, esto se traduce en un cambio de las propiedades elásticas y viscosas de la muestra. El sólido se vuelve más viscoso que elástico.

#### 3.5.3.2. pH

Se midió el pH a las formulaciones obtenidas utilizando un pHmetro (pH/ORP Edge Dedicated).

#### 3.5.3.3. Estudios de mucoadhesividad

Se confeccionó un dispositivo de laboratorio para tal fin, basándonos en un esquema aportado por Nakamura (1996), que se recoge en la Figura 3.



**Figura 3.** Equipo para el desarrollo del ensayo de mucoadhesividad.

Para ello, se preparó una solución caliente de agar/mucina al 1 % y al 2 % p/p respectivamente en buffer fosfato ajustado a pH 6. La solución, aún caliente, se extendió sobre una placa de Petri (0,25 g/cm<sup>3</sup>). Estas se dejaron enfriar a temperatura 4-8 °C durante 3 horas. Una vez enfriadas, se equilibraron durante 1 hora a 22 °C y 79 % de humedad relativa mediante una solución de sulfato amónico saturada en una cámara.

Uno de los extremos de un tubo de silicona se introdujo en un vaso de precipitado, que contenía saliva artificial (19 mg/L MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 2240 mg/L KCl, 103mg/L CaCl<sub>2</sub> y 544 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub>, todo llevado a pH 7). Se hizo recircular la saliva artificial con ayuda de una bomba peristáltica haciendo que esta cayera en la parte superior de la placa. La placa de Petri se mantuvo con un ángulo de 45 ° apoyada en una plataforma de polispan. El gel fue colocado a una altura a la que era humedecido por la saliva artificial en todo momento, con espacio suficiente para recorrer y que por gravedad se fuera desplazando por la placa. Se coloreó el gel con rojo cochinilla para poder apreciar el recorrido de este por la placa y visualizar el fin del ensayo. Se calculó el tiempo en el que el gel desaparecía. El potencial de adhesión es inversamente proporcional al desplazamiento del gel.

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

Con el fin de comprender el efecto de la viscosidad del Pluronic<sup>®</sup> con la temperatura en presencia del resto de los componentes del gel, se determinó el tiempo de gelificación del sistema por el método de inversión. Para ello, se colocó 1 gramo de la muestra del gel (gel blanco, gel con MF y gel con microsferas) en un vial. Se preparó un baño termostatzado a 37 °C para simular la temperatura fisiológica. Se introdujeron los viales y se fueron sacando cada 5 segundos, dejando estabilizar la muestra unos segundos para que recuperara la temperatura ambiente y se invertían para ver si el gel se desplazaba o se quedaba en el fondo del vial. Se calculó el tiempo que tardaba el gel en gelificar, manteniéndose en el fondo del vial.

### **3.6. ESTUDIO DE PERMEACIÓN *IN VITRO***

La finalidad de los estudios de permeación *in vitro* fue determinar la cantidad de MF (%) que difundía a través de las micropartículas y del gel para permear a través de la membrana colocada en el dispositivo de permeación. Este ensayo se llevó a cabo en celdas de difusión de Franz (Mura et al., 2007) dispuestas en un equipo de permeación, como se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Celdas de difusión de Franz.

Para imitar las condiciones del epitelio de la mucosa bucal, se emplearon membranas sintéticas de nitrato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  previamente hidratadas con tampón PBS de dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato de disodio pH 7,4 estabilizadas durante 1 hora. Pasado el tiempo, los compartimentos receptores se llenaron con la solución PBS sellándolos con parafilm para así evitar la pérdida de humedad. Se mantuvieron a 37 °C en agitación continua.

Se incorporaron 35 mg de micropartículas en 1,3 gramos de gel. La preparación se colocó en el compartimento donador y, a intervalos tiempo predeterminados (1, 2, 3, 4, 5, 6 y 24 horas), se tomaron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$ , se repuso dicho volumen con tampón. Posteriormente, el contenido en MF se cuantificó por HPLC.

Las muestras analizadas fueron: hidrogel con MF, hidrogel con las micropartículas y una solución de MF como control.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

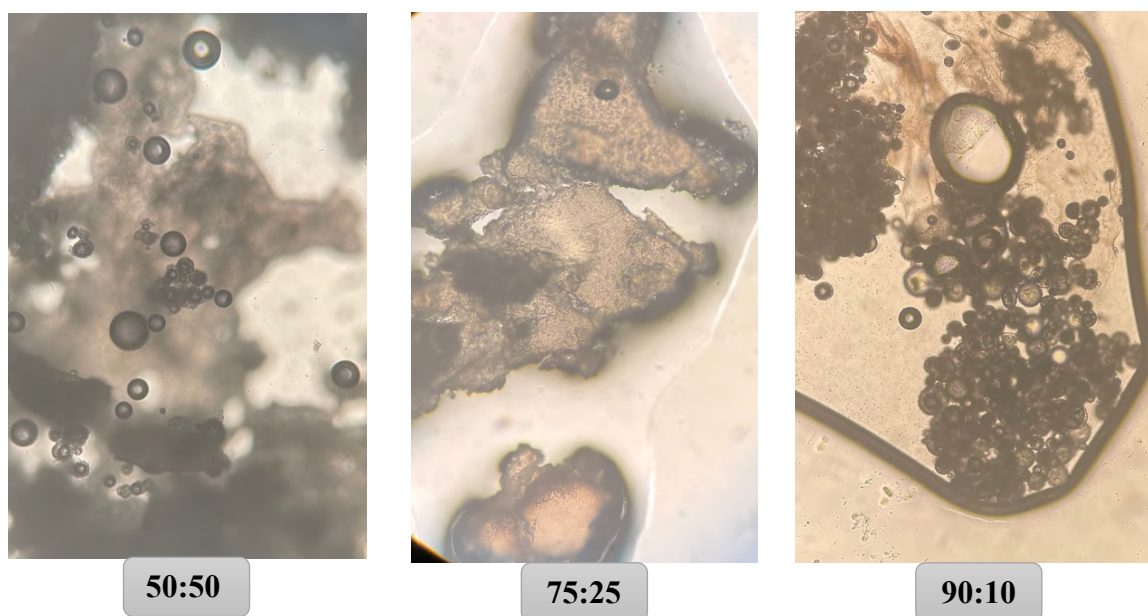
### **4.1. ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA FORMULACIÓN DE MICROPARTÍCULAS**

#### **4.1.1. Efecto de la ratio PLA/PLGA**

Al comienzo de nuestro estudio, se seleccionó como polímero el PLA, por sus propiedades y por la experiencia que tenía el grupo de investigación. El PLA se trata de un polímero hidrófobo que podría servir para nuestro fin ya que liberaría MF de forma

muy lenta. No obstante, con el fin de aumentar la hidrofilia de la estructura microparticulada, se añadió PLGA (Resomer 752S) y se estudió el efecto de la ratio PLA/PLGA. Ambos polímeros son no tóxicos, biodegradables y biocompatibles, aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA). La mayor EE se obtuvo cuando la relación PLA/PLGA era de 1/1 e iba disminuyendo con el incremento de la proporción PLA/PLGA (Liu et al., 2006). Debido a la lenta degradación, se varió la ratio PLA/PLGA a 50:50 y 75:25. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los deseados y se probó con la ratio PLA/PLGA 90:10, sin obtener tampoco valores deseados de EE. Como el PLGA es más hidrófilo que el PLA, los fármacos hidrófilos tienden a localizarse en la fase interna del PLGA, mientras que la fase externa del PLA forma una pared hidrófoba que retarda la salida de los fármacos, mejorando así la eficacia de encapsulación de fármacos poco solubles. Al contrario de lo que obtuvieron los autores (Liu et al., 2006) para fármacos solubles en agua, en los que el empleo de PLGA mejoraba la EE; en el caso de la MF, menos soluble en agua, se procedió al empleo del polímero PLA sin combinación.

En la Figura 5, se muestran distintas fotografías de los lotes en función de la ratio PLA/PLGA. Se observaron diferencias entre los lotes de forma que la presencia del PLGA indujo a la formación de estructuras agregadas, mientras que la ratio 90:10 dio lugar a micropartículas esféricas más parecidas a las obtenidas en ausencia del PLGA.



**Figura 5.** Micropartículas variando la ratio PLA/PLGA observadas con microscopio óptico con objetivo x10.

#### 4.1.2. Presencia de trehalosa

En una etapa previa del trabajo, las micropartículas se congelaban y eran liofilizadas a -80 °C durante 24 horas. Para ello, se añadió trehalosa como crioprotector en la fase acuosa de la primera emulsión. La trehalosa es considerada un excipiente estabilizador eficiente (Sánchez et al., 1999). Diversos autores han demostrado que sustancias hidrofílicas como la trehalosa aumentaron significativamente la eficacia de encapsulación de vacunas proteicas (Johansen et al., 1999). Sin embargo, tras ensayos realizados posteriormente secando las micropartículas en estufa, se obtenían lotes de micropartículas con mayor EE en comparación con los lotes liofilizados con trehalosa, por lo que este método se abandonó.

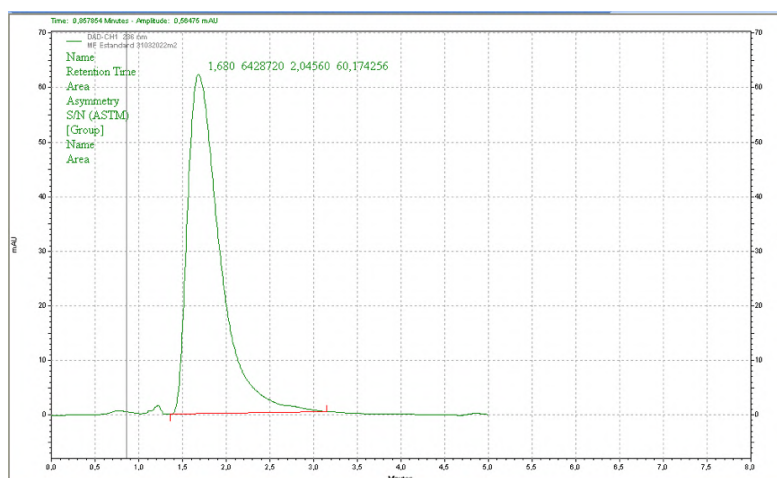
#### 4.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Con el fin de dilucidar la influencia de determinados factores relacionados con la composición y elaboración de las microsferas sobre la EE, se realizaron los experimentos derivados de la matriz de Taguchi expuesta en la Tabla 1 del apartado de Metodología, y se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 2.

	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6	Exp 7	Exp 8	Exp 9
EE Rep. 1	30,26	20,20	30,34	32,47	37,46	38,24	29,70	36,71	40,70
EE Rep. 2	30,99	17,19	31,69	32,83	39,83	38,50	31,72	37,83	40,17

**Tabla 2.** Resultados de eficacia de encapsulación obtenidos por el DoE.

A título de ejemplo, se recoge un cromatograma correspondiente a una solución de MF 50 µg/mL (Figura 6).



**Figura 6.** Cromatograma del estándar de metformina obtenido por HPLC.

A continuación, se procedió al análisis de la varianza (ANOVA) y al análisis de las medias (ANOM) para determinar qué factores ejercieron una influencia estadísticamente significativa sobre la respuesta en evaluación (EE).

A la hora de la determinación de qué factores resultaban significativos para cada una de las cuatro variables estudiadas, se establecieron límites de confianza, uno inferior (LDL) y otro superior (UDL). Cualquier valor que se situara fuera de dicho margen fue considerado influyente en la respuesta evaluada.

#### 4.2.1. Análisis de la varianza (ANOVA)

Con este análisis, se extrae información interesante en lo relativo a si los factores estudiados afectan de manera estadísticamente significativa a la respuesta estudiada, la EE. En la Figura 7 se recogen los datos del análisis.

Source	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P-value	% contrib
ANOVA tables for EE (Response Averages) - Alpha level = 0,1							
One-Way ANOVA							
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>					
Single degree of freedom ANOVA							
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>					
Factorial ANOVA							
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 7.** Análisis de la varianza (ANOVA) de los experimentos realizados.

La nomenclatura de los distintos factores aparece en la primera columna (A – H). En la segunda columna, se describen los factores analizados cuando se comparan los niveles -1 frente a +1 (A, B, C y D) y cuando se comparan los valores medios de los extremos frente al nivel medio (E, F, G y H). Además de los parámetros propios de un análisis ANOVA, aparecen en la tabla los valores de los efectos (I-hat), los cuales se

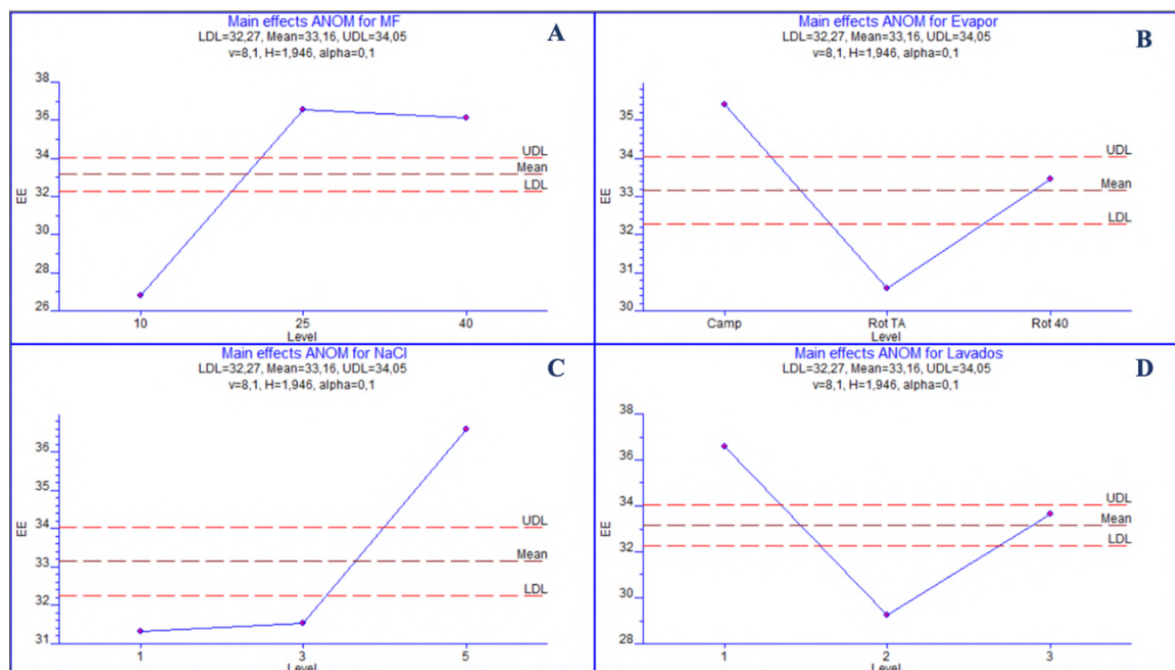
representarán gráficamente para su mejor comprensión, y el porcentaje de contribución de cada uno de los factores sobre la EE.

Los resultados del ANOVA obtenidos muestran que la cantidad de MF se convierte en el factor que más contribuye a la variación de la EE, con un porcentaje del 36,6 % (A) y 14.5 % (E), seguida de la cantidad de NaCl al analizar los niveles extremos (11,6 %), el número de lavados teniendo en cuenta el nivel central (19 %) y, por último, del tipo de evaporación.

#### 4.2.2. Análisis de las medias marginales (ANOM)

La representación de las medias marginales (ANOM) muestra la respuesta promedio para cada nivel de cada factor en el mismo gráfico, proporcionando una visión rápida y aproximada del efecto que cada factor tiene, de forma aislada, en el proceso (Figura 8). Este estudio se ha realizado para las cuatro variables analizadas.

Según el ANOM que se muestra en la Figura 8, los cuatro factores estudiados tuvieron significación estadística en la respuesta evaluada, ya que los valores obtenidos se encontraban fuera de los límites de error establecidos en el diseño.

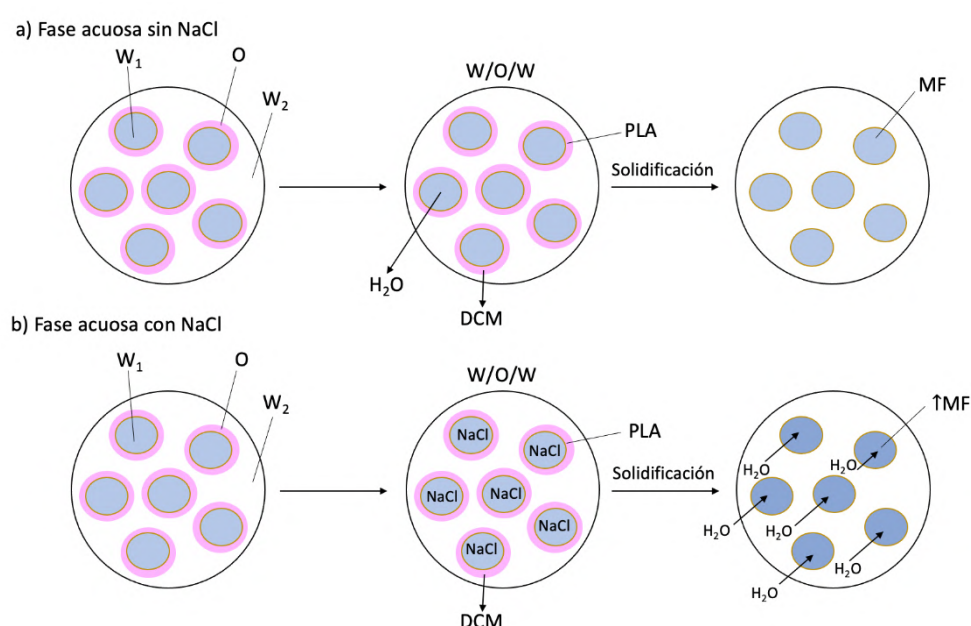


**Figura 8.** Gráficos de Análisis de las Medias (ANOM) correspondientes a la EE con respecto a la cantidad de MF (A), proceso de evaporación (B), cantidad de NaCl (C) y número de lavados (D).



Con respecto a la **cantidad de MF**, la EE aumentó a medida que aumentaba la cantidad del fármaco añadida hasta el valor del nivel medio (25 mg). A partir de ahí, se mantuvo constante (Figura 8A).

Se observó cómo la presencia de **NaCl** y el aumento de la cantidad de este mejoraba la EE. Tal y como se aprecia en la Figura 8C, el valor de la respuesta aumentó significativamente cuando la concentración de NaCl era del 5 % p/v. La adición del NaCl a la formulación se justifica debido a que la presencia de una sal en la fase acuosa de la primera emulsión facilitaría, por un efecto osmótico, la permanencia de la MF en el interior de las gotículas de la primera emulsión (Figura 9).



**Figura 9.** Efecto osmótico del NaCl en la fase acuosa de la emulsión.

En relación al proceso de **evaporación** del DCM, la mayor EE se obtuvo cuando este se realizó en campana a temperatura ambiente, en consonancia a la bibliografía consultada (Cui et al., 2005; Wu et al., 2008; Kamali et al., 2020), seguida del rotavapor a 40 °C y del rotavapor a temperatura ambiente (Figura 8B).

Con respecto al **número de lavados** de las formulaciones para eliminar el exceso de PVA, tal y como se aprecia en la Figura 8D, la mayor EE se obtuvo con un lavado. Autores como (Rosca et al., 2004) llevan a cabo este método de extracción de solvente mediante un solo lavado, aunque otros autores realizan varios lavados para sus estudios (Giri et al., 2012) ya que concluyen que de esta manera se consigue una mayor

disminución del contenido en PVA (Zambaux et al., 1998). En nuestro caso, el excesivo lavado de las micropartículas ocasiona pérdida de MF al ser un fármaco hidrosoluble.

#### 4.2.3. Diagrama de Pareto

Con el fin de explicar los efectos sobre las respuestas estudiadas, se obtuvieron los gráficos de Pareto. La Figura 10 muestra los efectos directamente proporcionales (valores de  $I\text{-hat}$  positivos) y los efectos inversamente proporcionales (valores de  $I\text{-hat}$  negativos). Como el objetivo era maximizar la EE de la MF, se seleccionó el nivel más alto de los efectos positivos y el nivel más bajo de los efectos negativos.

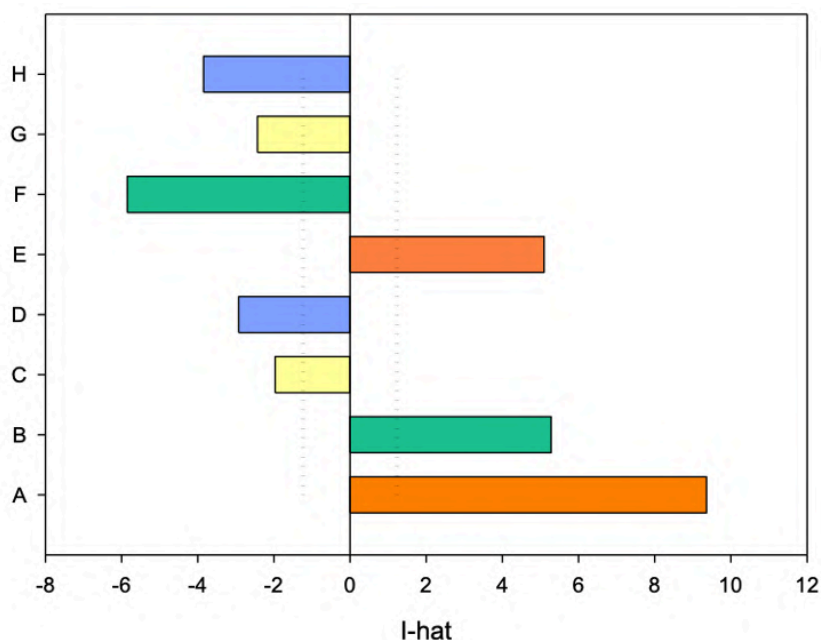
Se realizó la comparativa del nivel inferior frente al nivel superior y de la media de los niveles inferiores y superiores frente al valor medio, para cada una de las cuatro variables estudiadas: cantidad de MF (naranja), cantidad de NaCl (verde), proceso de evaporación (amarillo) y número de lavados (azul).

Con respecto a la cantidad de MF, se representó la cantidad de MF cuando se compara el nivel inferior 10 mg y el superior 40 mg (Figura 10A) y la cantidad de MF cuando se compara el valor medio de 10 y 40 frente al valor medio de 25 (Figura 10E), y así, con el resto de factores estudiados (Figura 10). Para maximizar la EE, se eligieron los valores mayores de MF, ya que se trata de un efecto positivo. En el factor A, cuando se pasa del nivel de 10 al de 40, se aumenta el efecto; sin embargo, cuando se pasa del valor medio entre los dos niveles opuestos y el nivel medio, el efecto es también positivo. La relación es siempre positiva, es decir, a mayor cantidad de metformina, mayor es la EE. Este efecto ha sido observado tanto en el ANOVA (Figura 7) como en el ANOM (Figura 8).

En relación al NaCl, se obtienen efectos contrarios. Por un lado, cuando se pasa del nivel inferior (1 % p/v) al superior (5 % p/v), el efecto es positivo, aumenta la EE. Por otro lado, cuando se compara el valor medio de estos dos valores frente al nivel medio (3 % p/v), el efecto es negativo. El efecto de incremento de la EE no está tan claro y, por ello, para maximizar este efecto se podría haber seleccionado 3 y 5 % p/v. Finalmente se seleccionó 5 % p/v.

En cuanto al número de lavados y al proceso de evaporación, resultaron ser efectos negativos. Ambos factores presentaron una relación inversa, es decir, a mayor número de lavados menor es la EE y al igual ocurre con el proceso de evaporación. Para maximizar

la EE, se escogieron los niveles inferiores, el menor número de lavados, solo uno, y evaporación en campana.

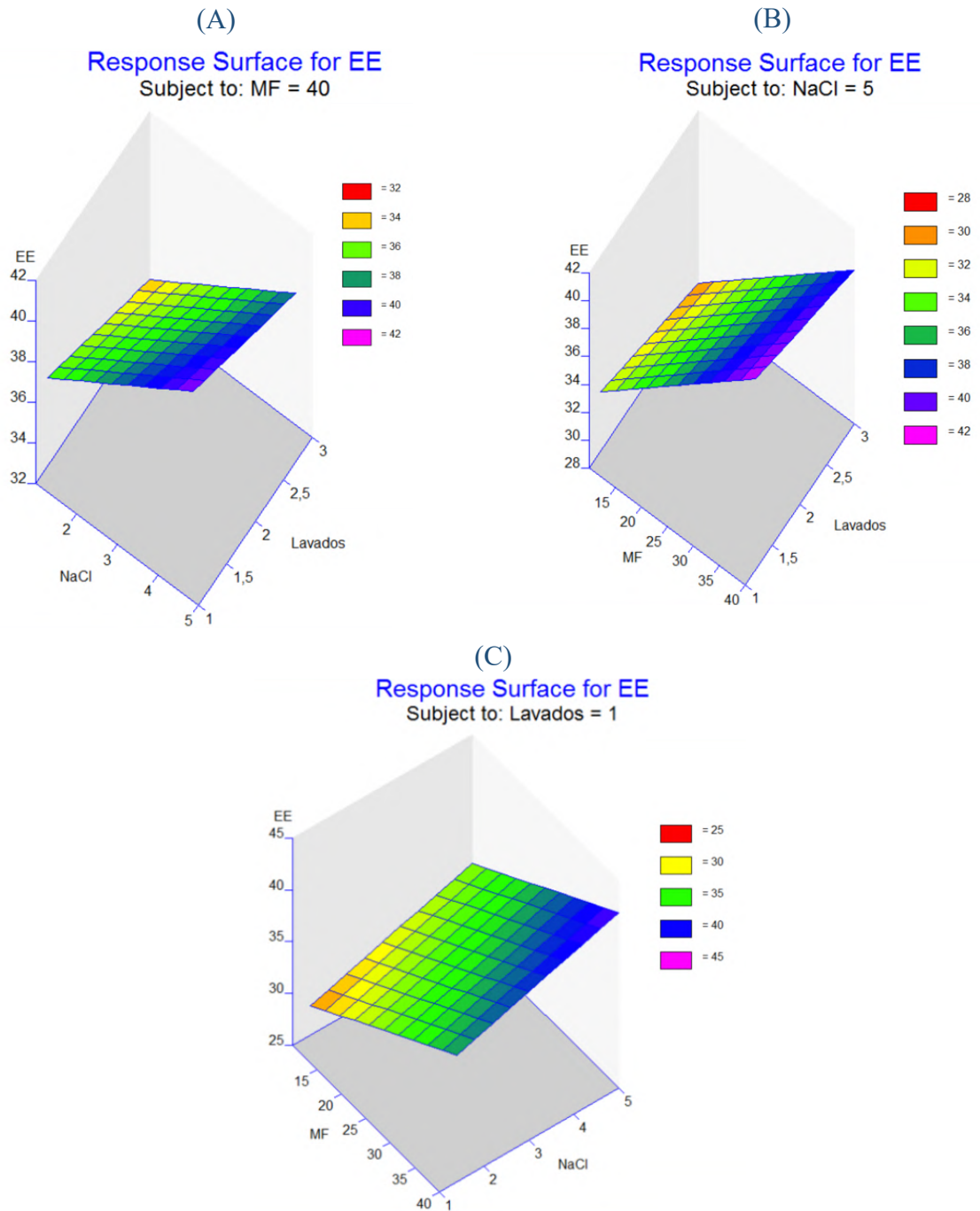


**Figura 10.** Diagramas de Pareto que recogen los efectos *I-hat*.

MF (10 y 40 mg) (A), NaCl 1 y 5 % p/v (B), proceso de evaporación (Campana y Rotavapor a 40 °C) (C), número de lavados (1 y 3) (D), MF (10, 40 y 25 mg) (E), número de lavados (1, 3 y 2) (F), NaCl (1, 3 y 5 % p/v) (G), proceso de evaporación (Campana, Rotavapor a 40 °C y Rotavapor a temperatura ambiente) (H).

#### 4.2.4. Análisis de regresión y superficies de respuesta

Las superficies de respuesta resultantes del estudio de todos los factores quedan reflejadas en la Figura 11. Los colores más cálidos (tonalidad morada-rosa) de los gráficos denotan las características óptimas de la formulación. Estas superficies muestran los valores óptimos de la formulación: 40 mg de metformina, 5 % p/v de NaCl, 1 lavado y evaporación en campana a temperatura ambiente, por lo que se decidió fijar estos factores para los próximos experimentos.



**Figura 11.** Superficies de respuesta de las variables: Cantidad de MF (A), Cantidad de NaCl (B) y Número de lavados (C).

La ecuación de regresión obtenida fue:

$$EE = 24,3 + 0,312 MF + 1,32 NaCl - 1,46 Lavados$$

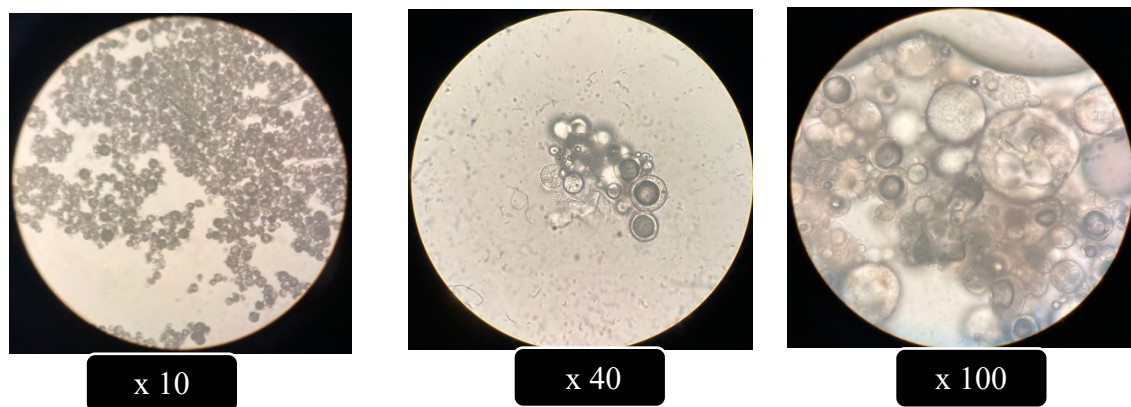
Una vez determinadas las variables que presentaron mayor influencia en la formulación y qué factores influyeron de manera más significativa en la EE, se desarrollaron nuevos experimentos que nos permitieron llegar a la mejor combinación de factores y, por tanto, a la formulación óptima capaz de encapsular el máximo contenido en metformina, que fue del 47 %.

A continuación, se llevaron a cabo los estudios de caracterización de la formulación optimizada.

### **4.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROSFERAS**

#### **4.3.1. Morfología**

Las micropartículas obtenidas presentaron una morfología esférica (Figura 12), si bien la distribución de tamaños era amplia. Esta heterogeneidad dimensional podría deberse a la metodología de emulsificación empleada.



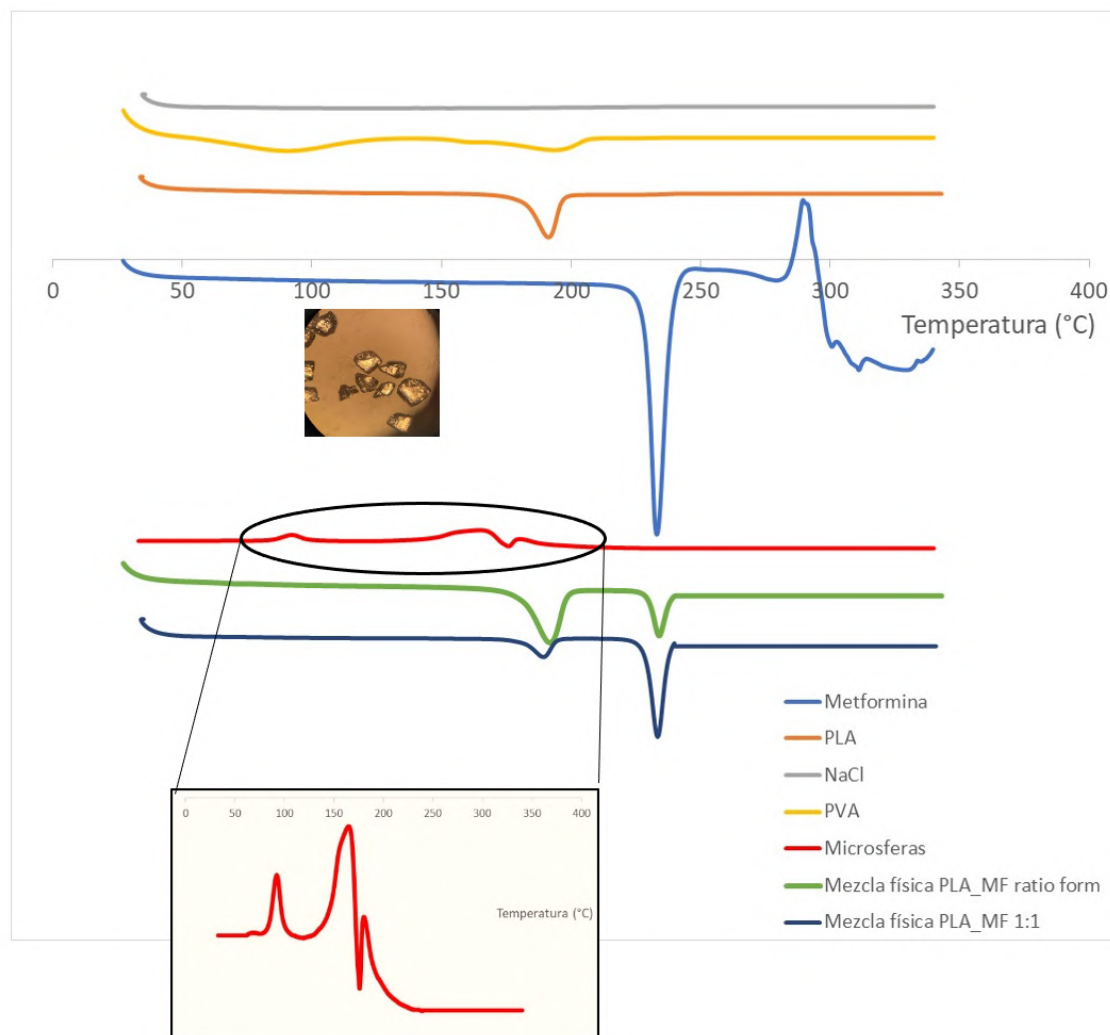
**Figura 12.** Micropartículas con microscopio óptico con los objetivos x10, x40 y x100.

#### **4.3.2. DSC y HSM**

Como se muestra en la Figura 13, la MF presenta un pico agudo endotérmico de temperatura máxima de 234 °C, que coincide con datos contrastados en la bibliografía (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin>) y una entalpía (AHf) de -26 J/g correspondiente a la fusión del fármaco.

El PLA mostró un único pico endotérmico a una temperatura de 165 °C, en consonancia con la bibliografía (Kryszak et al., 2022) y una entalpía de -11 J/g. Otros autores afirman que el punto de fusión del PLA varía entre 130 °C y 180 °C, dependiendo del contenido en L-láctico y del tipo de cristales que forma durante la cristalización (Lee et al., 2019).

Con respecto al termograma del NaCl, no apareció ningún pico puesto que no funde en ese rango de temperatura, si bien también se le realizó el DSC. El PVA puro presenta 2 picos endotérmicos. El primer pico sobre 88 °C se asigna a un efecto térmico debido a la evaporación de la humedad y también a una posible transición vítrea. El segundo pico aparece sobre los 195 °C (Guirguis y Moselhey, 2012).

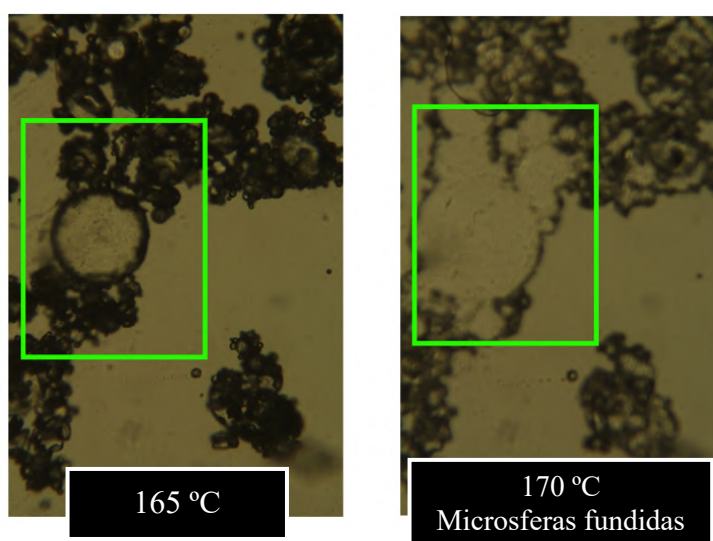


**Figura 13.** Termogramas de Metformina, PLA, NaCl, PVA, microsferas, mezcla física PLA y MF en la proporción real de la muestra y PLA y MF en proporción 1:1.

Por microscopía de platina caliente se pudo observar y comprobar que el punto de fusión de MF se encontraba en torno a esta temperatura. Además, con ayuda de la luz polarizada, se pudo observar la cristalinidad, apreciándose estructuras brillantes con el microscopio óptico.

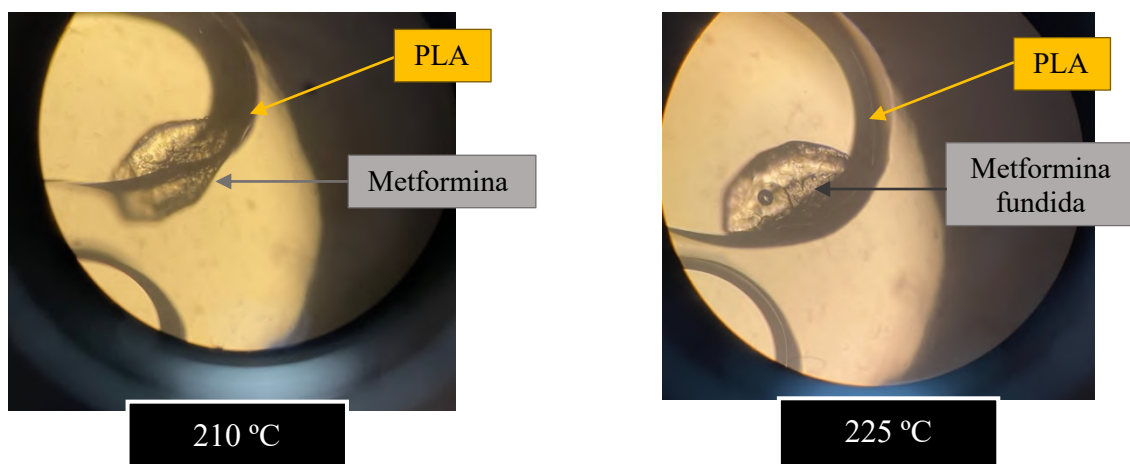
A continuación, se analizaron las mezclas físicas de los componentes constituyentes de las microsferas (Metformina+ PLA en proporción 1:1 y MF+ PLA en la proporción real de la muestra) con el fin de ver si hay desaparición de picos o aparición de algún efecto térmico adicional. En la Figura 13, se apreciaron dos picos correspondientes a los componentes de la mezcla y no mostraron diferencias entre ellos, indicando la ausencia de interacción en estado sólido entre los componentes de la mezcla.

En el termograma correspondiente a la muestra de microsferas, se apreciaron varios hechos interesantes. En primer lugar, un pico exotérmico a la temperatura entre 90 y 95 °C aproximadamente, que pudiera deberse a fenómenos de cristalización o descomposición (Bouriche et al., 2019). En segundo lugar, la aparición de un pico endotérmico de fusión en torno a 175-180 °C, que pudiera ser de la fusión del compuesto que cristalizó, ya que este valor de temperatura de fusión no corresponde con la de ninguno de los componentes. La MF podría cristalizar y funde mucho antes de su punto de fusión. Una vez fundido, no quedan partículas de principio activo, como se aprecia en la Figura 14. Cambios en las condiciones de cristalización pueden alterar las propiedades del cristal tales como tamaño de partícula, forma, propiedades termodinámicas (Ramachandran y Ramukutty, 2014). Como afirman algunos autores, la MF tiende a cristalizar (Bhujbal y Dash, 2018) en presencia de algunas sustancias como HPMC y PVPA (Yu et al., 2022).



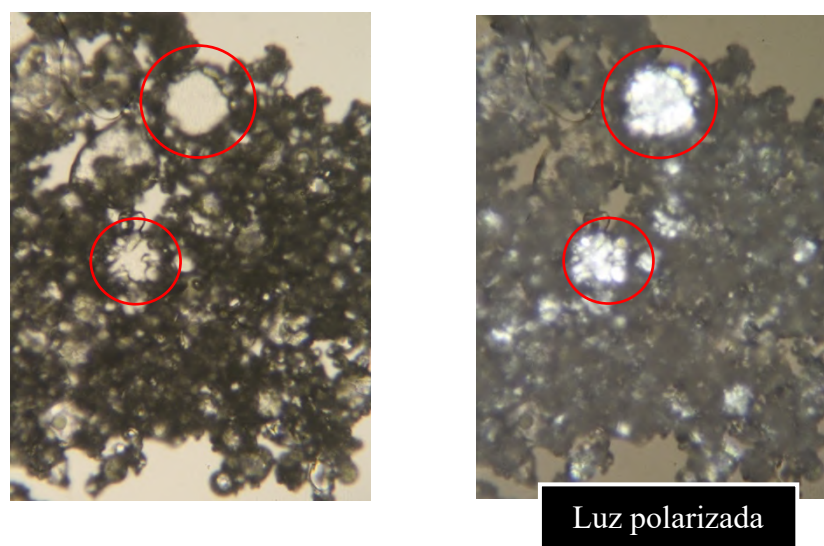
**Figura 14.** HSM. Fusión de las microsferas a la temperatura de 170 °C.

Con el fin de descartar o aseverar que el pico desplazado pudiera deberse al nuevo cristal de MF, se realizó el ensayo de la muestra de la mezcla física PLA+MF en proporción de la muestra de microsferas. En la Figura 15, se observa una gota, correspondiente al PLA fundido, en contacto con MF que, a 210 °C permanecía en estado sólido y a 225 °C se pudo observar cómo esta, prácticamente, se había fundido; sin embargo, la presencia del PLA no provocó que la MF se disolviera, lo que permitió descartar así una posible interacción entre ambos componentes.



**Figura 15.** HSM de la mezcla metformina y PLA en la proporción de la mezcla física. MF y PLA en contacto a 210 °C (A). Metformina prácticamente fundida a 225 °C (B).

En la Figura 16 se puede apreciar el efecto de la cristalización de MF cuando alcanza la temperatura de 123 °C.



**Figura 16.** HSM. Recristalización de las microsferas a la temperatura de 123 °C.



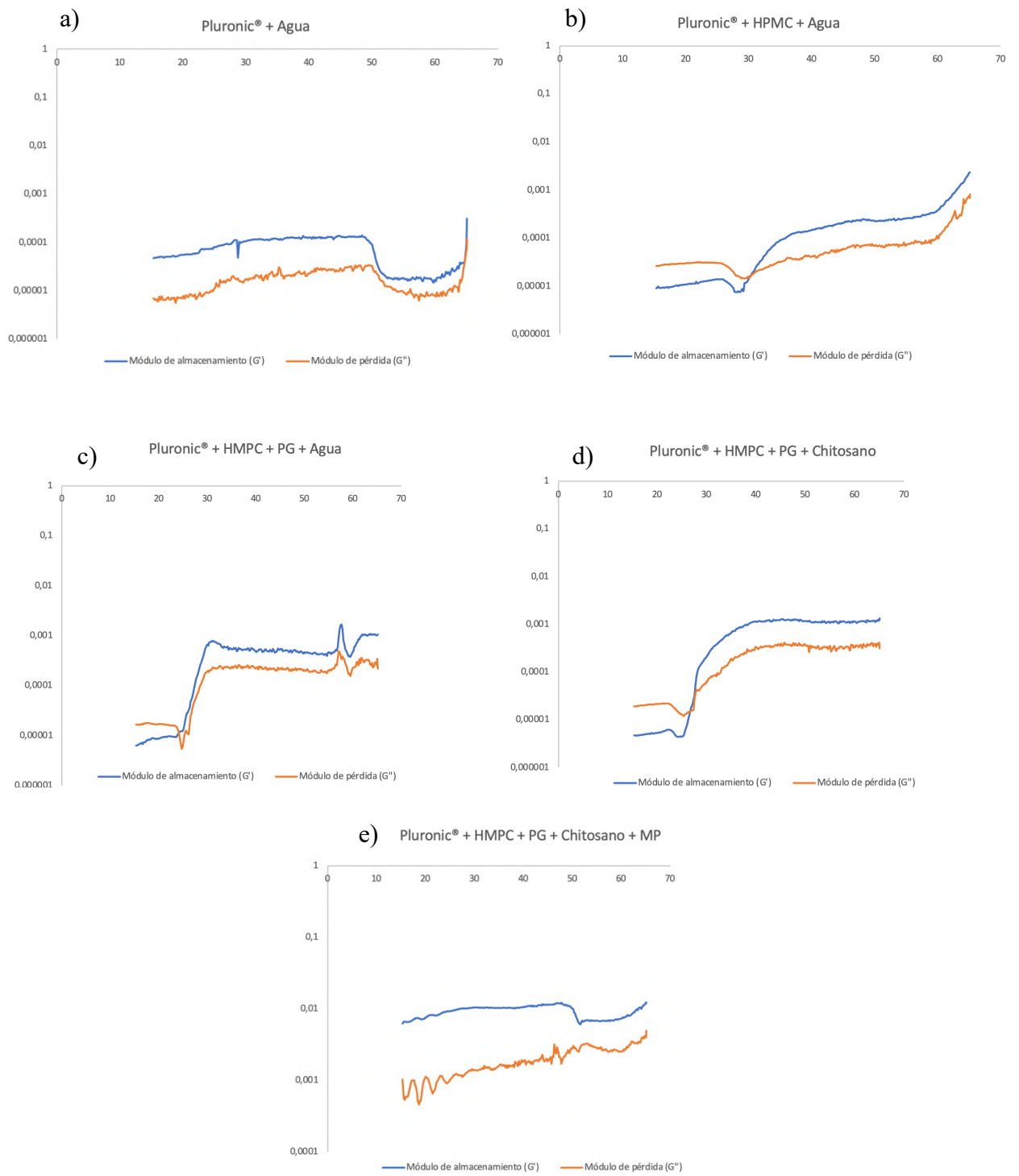
Lo expuesto anteriormente requeriría de un estudio futuro más profundo y del empleo de otras técnicas de caracterización para concretar con qué componente o componentes de la formulación podría cristalizar la MF y que pudieran explicar la pérdida de esta, motivo de una eficacia de encapsulación menor a la deseada.

#### **4.4. CARACTERIZACIÓN DEL HIDROGEL**

##### **4.4.1. Reología**

Pluronic® F127 es un poloxámero empleado por su capacidad para gelificar con la temperatura. Sin embargo, la adición de otros componentes a su dispersión coloidal puede modificar la temperatura de gelificación (Moon et al., 2012; Fernández-Romero et al., 2021). Por esta razón, en este estudio, se probaron diferentes preparados binarios de Pluronic®, todos ellos en la misma proporción a la que iban en la formulación final (Figura 17): Pluronic® 17 % p/v y agua; Pluronic® 17 % p/v, agua y HPMC 4 % p/v; Pluronic® 17 % w/v, agua, HPMC 4 % p/v y propilenglicol; Pluronic® 17 % w/v, agua, HPMC 4 % p/v, propilenglicol y chitosano 2 % p/v y, por último, el gel optimizado con las micropartículas.

Para estudiar los cambios en la temperatura de la gelificación, se realizaron dos pruebas: el método de inversión y la intersección entre el módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y el módulo de pérdida ( $G''$ ). La temperatura seleccionada fue aquella en la que  $G'$  y  $G''$  se entrecruzaron. Si  $G'$  es igual a  $G''$ , la tangente  $\delta$  será 1. En consecuencia, el rango en el que esta tangente es 1 o cercano a 1 fue seleccionado como la temperatura de gelificación (Fernández-Romero et al., 2021).



**Figura 17.** Módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) para Pluronic® + Agua (a), Pluronic® + HPMC + Agua (b), Pluronic® + HPMC + PG + Agua (c), Pluronic® + HPMC + PG + Chitosano (d), Pluronic® + HPMC + PG + Chitosano + MP (e).

#### **a) Pluronic® + Agua**

La concentración de Pluronic® del gel es 17 % p/v. Como la concentración de Pluronic® es baja, sería difícil llegar a la temperatura de gelificación y, en caso de que llegara, esta sería alta. El Pluronic® forma micelas y estas micelas, cuando se entrecruzan, generan la estructura del gel. Para conseguir esta estructura, se necesita una concentración mínima a la que no se llega en este ensayo. Al no formarse estas micelas, no interaccionan y no forman gel. Es por ello que no se aprecia ningún entrecruzamiento a temperatura corporal en la Figura 17a.

#### **b) Pluronic® + HPMC + Agua**

Se observa un cambio en el sistema (Figura 17b). En este caso, aparece un entrecruzamiento  $G' - G''$  a 30 °C. Dado que la concentración de Pluronic® es la misma que en la muestra anterior, este comportamiento puede deberse a que el HPMC facilita el entrecruzamiento entre las micelas de Pluronic® y, en consecuencia, el gel adquiere más consistencia.

#### **c) Pluronic® + HPMC + Propilenglicol + Agua**

Al añadir el propilenglicol a la mezcla anterior (Figura 17c), la temperatura de entrecruzamiento disminuye a 20 °C. Hay intercambio de módulos, lo que supone un cambio en el comportamiento del gel. El Pluronic® va evolucionando en función de los componentes que se van añadiendo.

#### **d) Pluronic® + HPMC + Propilenglicol + Chitosano**

Se puede apreciar una única transición (Figura 17d). Se observa un cambio en la composición de los perfiles, ya que el chitosano modifica ligeramente el comportamiento elástico y viscoso, sin embargo, no hay modificación de la temperatura de entrecruzamiento.

#### **e) Gel óptimo con micropartículas**

Se pierde la transición y la temperatura, tal y como se aprecia en la Figura 17e, que se traduce en una interacción entre micropartículas y algún componente del gel. Esto

podría confirmar las interacciones de la MF y el HPMC, responsable de que el Pluronic® no gelifique (Yu et al., 2022).

#### **4.4.2. pH**

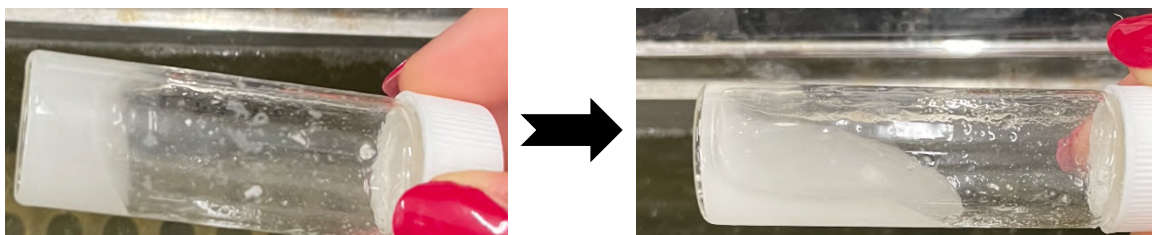
El pH resultante del gel en estudio fue de 6,8, acorde con los valores de pH de los geles obtenidos individualmente.

#### **4.4.3. Mucoadhesividad**

Para determinar este parámetro, se llevó a cabo un protocolo ya estandarizado por el grupo de investigación (Aretio, 2019). Se observó que el gel, debido a la presencia del polímero chitosano que aporta propiedades mucoadhesivas al mismo, provocó que aumentara el tiempo de permanencia del gel en el agar. Por otra parte, la viscosidad del gel aportada por el HPMC hizo que este tendiera a permanecer adherido a la superficie de la placa también más tiempo. Estos factores favorecen la permanencia de la formulación en la mucosa bucal persiguiendo el efecto retentivo que se busca en la formulación. Se calculó el tiempo en el que el gel desaparecía del lugar de aplicación, siendo este de 45 minutos.

#### **4.4.4. Tiempo de gelificación**

Inicialmente, el gel preparado se mantuvo en nevera. Teóricamente, debido a la presencia de Pluronic®, cabría esperar que, una vez fuera de nevera, al ir aumentando la temperatura a 37 °C, el sistema gelificara y provocara un aumento de la viscosidad y una reducción del tiempo de gelificación. En cambio, se observó que, debido a la presencia de otros componentes del gel, el efecto térmico del Pluronic® no se apreció, sino que se observó el efecto contrario: a 37 °C el gel se volvió menos viscoso. Este efecto se debió a la presencia de HPMC y chitosan en la formulación, polímeros que con la temperatura experimentan una pérdida de viscosidad (Dos Santos Carvalho et al., 2022), como ocurre en la mayoría de los geles. El gel perdió esa viscosidad que tenía inicialmente, tal y como se aprecia en la Figura 18.



**Figura 18.** Método de inversión empleado en el ensayo de tiempo de gelificación.

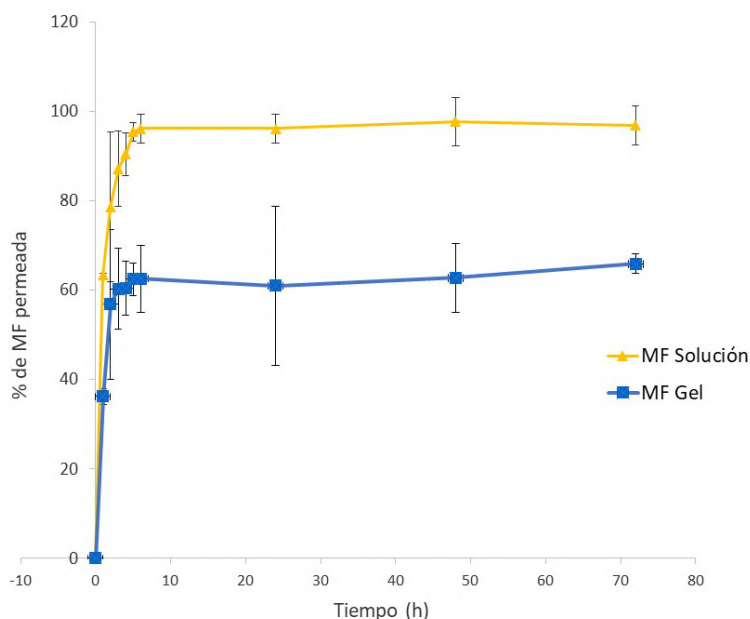
Imagen de la izquierda: gel en nevera. Imagen de la derecha: gel a 37 °C.

#### **4.5. ESTUDIOS DE PERMEACIÓN *IN VITRO***

Estos estudios se llevaron a cabo en un equipo de permeación que utiliza las celdas de difusión de Franz como sistema que permitirá la transferencia del fármaco disuelto a través de una membrana.

Los perfiles de porcentaje de MF permeado con el tiempo a partir de diferentes formulaciones, se recogen en la Figuras 19 y 20.

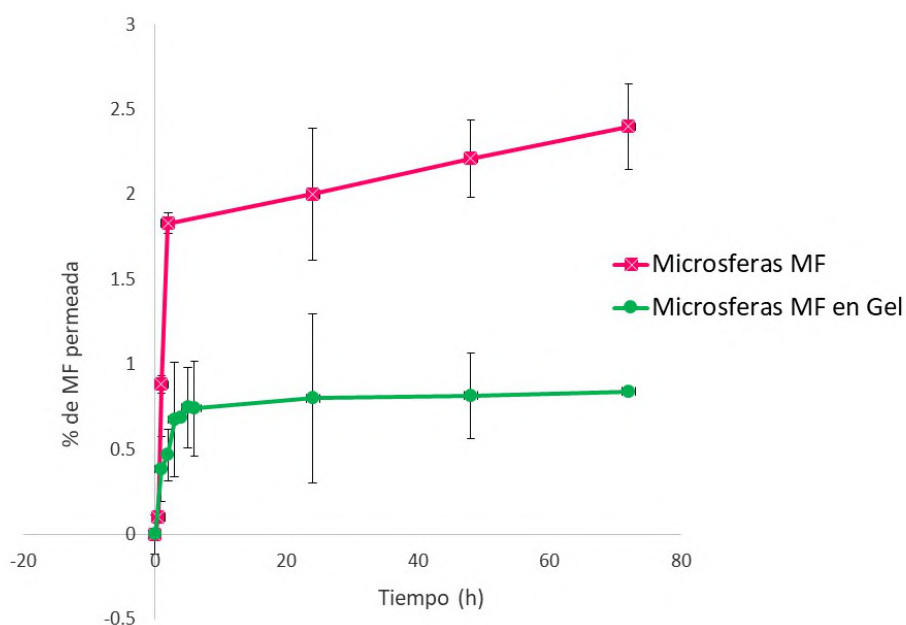
En la Figura 19, se muestran los perfiles de liberación correspondientes a la solución de MF (amarillo) y a la MF en gel (azul). En relación a la solución de MF, esta permeó en su totalidad a las 6 horas del comienzo del estudio, tal y como se esperaba. Por otro lado, el gel con metformina, a las 6 horas, se había liberado aproximadamente un 60% de la formulación y siguió de manera lenta liberando MF del gel de forma controlada. Por tanto, se apreció cómo el gel retarda la liberación del fármaco.



**Figura 19.** Comparación de los perfiles de liberación de la solución de metformina con respecto al gel con metformina.

En cuanto a las micropartículas, se observa en la Figura 20, retardan mucho porque no alcanza más del 2-2,5 % de MF permeada. Cuando estas micropartículas van incorporadas en el gel, se produce una permeación muy lenta y prolongada de fármaco, ya que a las 3 horas del ensayo es cuando se alcanzó su máximo.

Se aprecia cómo el porcentaje de liberación de MF es extremadamente lento porque a las 7 horas se libera solamente un 1 % de la cantidad. Este efecto retardado se puede deber a dos efectos: por un lado, a la presencia de las micropartículas (Siepmann y Siepmann, 2006) y, por el otro, a la composición del gel (Mahmoudian y Ganji, 2017), concretamente a la adición de polímeros mucoadhesivos (Garud y Garud, 2015).



**Figura 20.** Comparación de los perfiles de liberación de las micropartículas y las micropartículas incorporadas en el gel.

## 5. CONCLUSIONES

- 1) La mejor forma para incorporar la metformina con el objetivo de prolongar la liberación de fármaco fueron las microsferas, obtenidas por el método de la doble emulsión y extracción del solvente, aunque la técnica empleada para la encapsulación debe mejorarse debido a que los resultados obtenidos no fueron óptimos.
- 2) La composición optimizada en este estudio de la formulación de microsferas fue: 40 mg de metformina, 5 % p/v de NaCl, evaporación del disolvente en campana a temperatura ambiente y un lavado.

- 3) El empleo de componentes mucoadhesivos en el gel favorecería la permanencia de este en la cavidad bucal, de forma que la liberación del fármaco se pudiera ver favorecida, así como la permeación del fármaco.
- 4) Tras el estudio con DSC y HSM, se concluyó que la metformina podría recristalizar en presencia de algún componente de la formulación, pudiendo atribuirse a este fenómeno la disminución de la EE. Se plantea la continuación del estudio.

## 6. **BIBLIOGRAFÍA**

- Aretio Constanza. Inserto de liposomas con levodopa para administración intranasal. Trabajo Fin de Grado, Universidad de Sevilla, 2019.
- Arroyo-García Carmen. Evaluación de nanosistemas lipídicos para coadministración de maleato de timolol y acetazolamida: Nueva propuesta en el tratamiento de glaucoma. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 2018.
- Bhujbal S, Dash AK. Metformin-Loaded Hyaluronic Acid Nanostructure for Oral Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2018; 19(6): 2543-53.
- Bouriche S, Cózar-Bernal MJ, Rezgui F, Rabasco Álvarez AM, González-Rodríguez ML. Optimization of preparation method by W/O/W emulsion for entrapping metformin hydrochloride into poly (lactic acid) microparticles using Box-Behnken design. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2019; 51: 419-29.
- 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.
- Dos Santos Carvalho JD, Rabelo RS, Hubinger MD. Thermo-rheological properties of chitosan hydrogels with hydroxypropyl methylcellulose and methylcellulose. *Int J Biol Macromol*. 2022; 209: 367-75.
- Dubey N, Ferreira JA, Daghery A, Aytac Z, Malda J, Bhaduri SB, et al. Highly tunable bioactive fiber-reinforced hydrogel for guided bone regeneration. *Acta Biomater*. 2020; 113: 164-76.
- Fernández-Romero AM, Maestrelli F, García-Gil S, Talero E, Mura P, Rabasco AM, 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.

- Fernández-Romero AM, Maestrelli F, Mura P, Rabasco A, González-Rodríguez ML. Novel Findings about Double-Loaded Curcumin-in-Hp $\beta$ cyclodextrin-in Liposomes: Effects on the Lipid Bilayer and Drug Release. *Pharmaceutics*. 2018; 10(4): 256.
- Cui F, Cun D, Tao A, Yang M, Shi K, Zhao M, et al. Preparation and characterization of melittin-loaded poly (DL-lactic acid) or poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method. *J Control Release*. 2005; 107(2): 310-9.
- Garud A, Garud N. Formulation of mucoadhesive microspheres of rosiglitazone maleate and its in vitro evaluation using ionotropic gelation technique. *Ars Pharm*. 2015; 56(2): 101-107.
- González-Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, Villasmil S, Rabasco AM. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. *J Pharm Sci*. 2012; 101(10): 3845-63.
- Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN. Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions, and Applications. *J Bone Jt Surg-Am*. 2001; 83: 98-103.
- Guirguis OW, Moselhey MTH. Thermal and structural studies of poly (vinyl alcohol) and hydroxypropyl cellulose blends. *Nat Sci*. 2012; 04(01): 57-67.
- He J, Feng M, Zhou X, Ma S, Jiang Y, Wang Y, et al. Stabilization and encapsulation of recombinant human erythropoietin into PLGA microspheres using human serum albumin as a stabilizer. 2011; 416(1): 69-76.
- 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.
- Huang K, Ou Q, Xie Y, Chen X, Fang Y, Huang C, et al. Halloysite Nanotube Based Scaffold for Enhanced Bone Regeneration. *ACS Biomater Sci Eng*. 2019; 5(8): 4037-47.
- Jang WG, Kim EJ, Bae IH, Lee KN, Kim YD, Kim DK, et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Run x2. *Bone*. 2011; 48(4): 885-93.
- Jiang G, Thanoo BC, DeLuca PP. Effect of Osmotic Pressure in the Solvent Extraction Phase on BSA Release Profile from PLGA Microspheres. *Pharm Dev Technol*. 2002; 7(4): 391-9.



- Johansen P, Tamber H, Merkle HP, Gander B. Diphtheria and tetanus toxoid microencapsulation into conventional and end-group alkylated PLA/PLGAs. *Eur J Pharm Biopharm.* 1999; 47(3): 193-201.
- Kamali H, Atamanesh M, Kaffash E, Mohammadpour F, Khodaverdi E, Hadizadeh F. Elimination of residual solvent from PLGA microspheres containing risperidone using supercritical carbon dioxide. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2020; 57: 101702.
- Kanouni M, Rosano HL, Naouli N. Preparation of a stable double emulsion (W1/O/W2): role of the interfacial films on the stability of the system. *Adv Colloid Interface Sci.* 2002; 99(3): 229-54.
- Kryszak B, Gazińska M, Gruber P, Wieczorek M, Krokos A, Dzienny P, et al. Mechanical properties and degradation of laser sintered structures of PLA microspheres obtained by dual beam laser sintering method. *Int J Adv Manuf Technol.* 2022; 120(11-12): 7855-72.
- Kulkarni AS, Gubbi S, Barzilai N. Benefits of Metformin in Attenuating the Hallmarks of Aging. *Cell Metab.* 2020; 32(1): 15-30.
- Giri TK, Thakur D, Alexander A, Ajazuddin, Badwaik H, Tripathi DK. Alginate based hydrogel as a potential biopolymeric carrier for drug delivery and cell delivery systems: present status and applications. *Curr Drug Deliv.* 2012; 9(6): 539-55.
- Lamia KA, Peroni OD, Kim YB, Rameh LE, Kahn BB, Cantley LC. Increased Insulin Sensitivity and Reduced Adiposity in Phosphatidylinositol 5-Phosphate 4-Kinase beta<sup>-/-</sup> mice. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(11): 5080-7.
- Liu R, Huang SS, Wan YH, Ma GH, Su ZG. Preparation of insulin-loaded PLA/PLGA microcapsules by a novel membrane emulsification method and its release in vitro. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006; 51(1): 30-8.
- Loi F, Córdova LA, Pajarinen J, Lin T hua, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* 2016; 86: 119-30.
- Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2005; 23(1): 47-55.
- Mahmoudian M, Ganji F. Vancomycin-loaded HPMC microparticles embedded within injectable thermosensitive chitosan hydrogels. *Prog Biomater.* 2017; 6(1-2): 49-56.

- Martínez Pacheco R. Tratado de Tecnología Farmacéutica. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 2016.
- Moon HJ, Ko DY, Park MH, Joo MK, Jeong B. Temperature-responsive compounds as in situ gelling biomedical materials. *Chem Soc Rev.* 2012; 41(14): 4860.
- Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 67(1): 86-95.
- Naha PC, Kanchan V, Manna PK, Panda AK. Improved bioavailability of orally delivered insulin using Eudragit-L30D coated PLGA microparticles. *J Microencapsul.* 2008; 25(4): 248-56.
- 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): 173-81.
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 4091, Metformin. 2005 [en línea]. [Consultado en junio 2022]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin>.
- Pankaj D, Sahu I, Kurian IG, Pradeep AR. Comparative evaluation of subgingivally delivered 1.2 % rosuvastatin and 1 % metformin gel in treatment of intrabony defects in chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2018; 89(11): 1318-25.
- Place ES, George JH, Williams CK, Stevens MM. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chem Soc Rev.* 2009; 38(4): 1139.
- Qu H, Fu H, Han Z, Sun Y. Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: a review. *RSC Adv.* 2019; 9(45): 26252-62.
- Ramachandran E, Ramukutty S. Influence of Polymers on the Crystal Growth of Metformin Hydrochloride. *Pharm Nanotechnol.* 2014; 2(3): 8.
- Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Farmacología. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; 2016.
- Rao NS, Pradeep AR, Kumari M, Naik SB. Locally Delivered 1 % Metformin Gel in the Treatment of Smokers with Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Clinical Trial. *J Periodontol.* 2013; 84(8): 1165-71.

- Ribeiro JS, Bordini EAF, Ferreira JA, Mei L, Dubey N, Fenno JC, et al. Injectable MMP-Responsive Nanotube-Modified Gelatin Hydrogel for Dental Infection Ablation. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020; 12(14): 16006-17. D
- Rosca ID, Watari F, Uo M. Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J Controlled Release*. 2004; 99(2): 271-80.
- Sánchez A, Villamayor B, Guo Y, McIver J, Alonso MJ. Formulation strategies for the stabilization of tetanus toxoid in poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *Int J Pharm*. 1999; 185(2): 255-66.
- Siepmann J, Siepmann F. *Microparticles Used as Drug Delivery Systems*. Springer- verlag. 2006; 133: 15-21.
- Sin LT, Tuen BS. *Poly(lactic acid): A practical guide for the processing, manufacturing, and applications of PLA (plastics design library)*. 2<sup>a</sup> ed. PA, USA. William Andrew; 2019.
- Towler MC, Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase in Metabolic Control and Insulin Signaling. *Circ Res*. 2007; 100(3): 328-41.
- Violette B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci*. 2012; 122(6): 253-70.
- Wu WB, Wang ML, Sun YM, Huang W, Cui YP, Xu CX. Fluorescent polystyrene microspheres with large Stokes shift by fluorescence resonance energy transfer. *J Phys Chem Solids*. 2008; 69(1): 76-82.
- Yu C, Sun X, Wang Y, Du S, Shu L, Sun Q, et al. Determination and Correlation of Solubility of Metformin Hydrochloride in Aqueous Binary Solvents from 283.15 to 323.15 K. *ACS Omega*. 2022; 7(10): 8591-600.
- Zambaux MF, Bonneaux F, Gref R, Maincent P, Dellacherie E, Alongo MJ et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J Controlled Release*. 1998; 50(1-3): 31-40.
- Zhang R, Liang Q, Kang W, Ge S. Metformin facilitates the proliferation, migration, and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells in vitro. *Cell Biol Int*. 2020; 44(1): 70-9.