Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Química e Ingeniería Química
Escuela Profesional de Química

Evaluación de la cinética de liberación del extracto crudo del veneno de la serpiente Bothrops pictus "jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico

AUTOR

Rodrigo FLORES CHAVEZ

ASESOR

Marco Vicente GUERRERO AQUINO

Lima, Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Flores, R. (2024). *Evaluación de la cinética de liberación del extracto crudo del veneno de la serpiente Bothrops pictus "jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Química e Ingeniería Química, Escuela Profesional de Ingeniería Química]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Autor 1	
Nombres y apellidos	Rodrigo Flores Chavez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47008424
URL de ORCID	
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Marco Vicente Guerrero Aquino
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07427504
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-5089-2682
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Patricio Eudes Muñoz Huillcas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06271402
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Melissa Rabanal Atalaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40876190
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Marco Vicente Guerrero Aquino
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07427504

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.6.1 Biotecnología de enzimas
Grupo de investigación	AGROBIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL TOXINAS DE ORIGEN ANIMAL Y SUS ANTIVENENOS
Agencia de financiamiento	Código B2110007i, en el marco de los Proyectos Interdisciplinarios para el Fomento de la Cooperación Interinstitucional en Investigación e Innovación 2021 VRIP -UNMSM
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Química e Ingeniería Química, Laboratorio de Biotecnología Microbiana, País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Av. República de Venezuela s/n, Lima 15081 Latitud: -12.06035 Longitud: -77.08370
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024
URL de disciplinas OCDE	Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE QUÍMICA E INGENIERÍA QUÍMICA
Central: 619 7000 anexos 1230 Telefax: 1209
Ciudad Universitaria – Calle Germán Amezaga 375 – Lima 1

ESCUELA PROFESIONAL DE QUÍMICA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los suscritos miembros del Jurado nombrados por la Dirección de la Escuela Profesional de Química, bajo la Presidencia del **Mg. Patricio Eudes Muñoz Huillcas** (Presidente), la **Dra. Melissa Rabanal Atalaya** (Miembro) y el **Qco. Marco Vicente Guerrero Aquino** (Asesor), habiendo presentado para tal efecto la **TESIS,** titulada **"Evaluación de la cinética de liberación del extracto crudo del veneno de la serpiente Bothrops pictus "jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato"** después de **SUSTENTADA Y APROBADA** la **TESIS** elaborado por el Bachiller en Química: **Rodrigo Flores Chavez;** para optar el **TÍTULO PROFESIONAL** de **QUÍMICO,** acordaron calificarlo con la **NOTA** de:

DIECISIETE (**LETRA**) 17 (**NÚMERO**)

Ciudad Universitaria, 22 de mayo de 2024.

Dra. MELISSA RABANAL ATALAYA
MIEMBRO

Mg. PATRICIO EUDES MUÑOZ HUILLCAS
PRESIDENTE

Qco. MARCO VICENTE GUERREO AQUINO
ASESOR

Dr. JOSÉ LUIS PAZ ROJAS
Director de la E.P. de Química

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
ESCUELA PROFESIONAL DE QUIMICA
Facultad de Química e Ingeniería Química

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE
SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Marco Vicente Guerrero Aquino en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Decanal N° 000451-2024-D-FQIQ/UNMSM de la tesis, cuyo título es **"Evaluación de la cinética de liberación del extracto crudo del veneno de la serpiente *Bothrops pictus* "jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato"**, presentado por el bachiller **RODRIGO FLORES CHAVEZ para** optar el título de QUÍMICO.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 13% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Lima, 05 de junio de 2024

Firma del Asesor

Nombres y Apellidos del asesor: Marco Guerrero Aquino

DNI 07427504

El presente trabajo fue ejecutado en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Química e Ingeniería Química y en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Así también, esta investigación fue financiada por el proyecto "Diseño y producción de una proteína multiepitópica para la generación de anticuerpos neutralizantes del veneno de *Bothrops pictus* - Código B2110007i, en el marco de los Proyectos Interdisciplinarios para el Fomento de la Cooperación Interinstitucional en Investigación e Innovación 2021 del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado -UNMSM".

DEDICATORIA

A mis padres VICTORIA y SINFORIANO, por sus consejos y enseñanzas, a ROSARIA, LEYDHI VANESA, ROLANDO y RONIL (RONY), por el apoyo incondicional; pero sobre todo a RONY quien siempre estuvo orgulloso de mi persona, apoyándome en todo momento. Gracias a ustedes fue posible alcanzar este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Mayor De San Marcos donde realice mis estudios profesionales, así como a todos los docentes que contribuyeron en mi formación profesional de Químico.

Deseo expresar un agradecimiento muy especial a la Dra. Miriam Memenza Zegarra y al Qco. Marco Vicente Guerrero Aquino del Grupo de Investigación Agrobiotecnología Ambiental (AGROBIOTEC), Gracias por su asesoramiento, dedicación y apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Al Laboratorio de Biología Molecular del grupo de investigación en Toxinas de Origen Animal y sus Antivenenos (TOXIVEN) de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Al Dr. Dan Erick Vivas Ruiz por el apoyo constante en la realización de las técnicas moleculares para el desarrollo de la tesis y al Mg. Daniel Torrejón Maldonado por su asistencia en la ejecución de los ensayos moleculares.

Agradecimiento eterno para el sr. ALBINO CHAVEZ REYES, mi tío, quien con su apoyo incondicional hizo posible llevar a cabo este proyecto.

De igual forma un agradecimiento a Sofía por el apoyo incondicional brindado.

ÍNDICE

ÍNDICE **5**
ÍNDICE DE FIGURAS **7**
ÍNDICE DE TABLAS **10**
ÍNDICE DE ANEXOS **12**
RESUMEN **13**
ABSTRACT **15**
I. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN **17**
1.1. OBJETIVOS: **19**
1.1.1. Objetivo general: 19
1.1.2. Objetivos específicos: 19
II. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO **20**
2.1. ANTECEDENTES **20**
2.2. MARCO TEORICO **24**
2.2.1. Materiales encapsulantes 24
2.2.2. Métodos de encapsulamiento 25
2.2.3. Encapsulación por extrusión 26
2.3. ALGINATO DE SODIO **29**
2.3.1. Composición y estructura química del alginato de sodio 30
2.3.2. Tipos de gelificación del alginato 31
2.3.2.1. Gelificación externa **32**
2.3.2.2. Gelificación interna **33**
2.3.3. Obtención 34
2.3.3.1. Métodos de purificación **35**
2.3.4. Mecanismos de liberación 36
2.3.5. Cinética de disolución 37
2.3.6. Cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente 37
2.3.7. Modelos matemáticos de la cinética de liberación 38
2.3.7.1. Cinética de Wagner **38**
2.3.7.2. Ley de potencia **41**
2.3.7.3. Cinética de Higuchi **42**
2.3.7.4. Cinética de orden cero **46**
2.3.7.5. Cinética de primer orden **47**
2.3.7.6. Cinética de Hixson – Crowell **50**
2.3.8. Brothops pictus (jergón de la costa) 52

2.3.8.1. Caracterización del extracto crudo del veneno de la serpiente "Bothrops pictus" 53

2.3.8.1.1. Determinación de enzimas del extracto crudo de veneno de serpiente. 53

2.4. Peso Molecular del extracto crudo de veneno de serpiente. 56

III. CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....58

3.1. Encapsulamiento el extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictus por el método de extrusión con diferentes concentraciones del alginato de sodio. 58

3.2. Elaboración de la curva patrón.....58

3.3. Determinación de la proteína estándar 59

3.4. Encapsulamiento del extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictus por el método de extrusión 60

3.5. Hidrolisis de las microcápsulas.....61

3.6. Evaluación del perfil de la cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) a través de los modelos matemáticos: Wagner, Hixón – Crowell, primer orden y de orden cero. 62

3.7. Determinación de las proteínas presente en el extracto crudo del veneno de serpiente microencapsulada por el método de Electroforesis y Western Blot. 64

3.8. Caracterización de las microcápsulas del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizada a través de microscopia óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM). 65

IV. CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....66

4.1. Encapsulamiento del extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictucs por el método de extrusión con diferentes concentraciones del alginato de sodio. 66

4.1.1. Elaboración de la curva patrón..... 66

4.1.2. Encapsulamiento del extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictucs por el método de extrusión..... 67

4.2. Evaluación de la cinética de liberación de los componentes proteicos del ECVS a través de los modelos matemáticos de Wagner, Hixón – Crowell, orden cero y de primer orden. 70

4.3. Determinación de las proteínas presente en el extracto crudo del veneno de serpiente microencapsulado por Western Blot.....82

4.4. Caracterización de las microcápsulas con ECVS inmovilizada a través de microscopia óptica y SEM. 84

V. CONCLUSIONES 85

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

VII. ANEXOS 96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variantes de la microencapsulación por extrusión: extrusión por atomización electrostática (A). Extrusión mediante vibración (B). La extrusión de corte por disco giratorio(C). La extrusión por disco giratorio (D). La extrusión por boquilla giratoria (E) y la extrusión por atomización (F). Cada una de estas técnicas ofrece distintas ventajas y aplicaciones dependiendo de las necesidades específicas del proceso de encapsulación..…….….. 27

Figura 2. Esquema del modelo de "caja de huevo" del alginato de calcio, Fuente: López 2012…...……..30

Figura 3. Estructura del alginato. A) Ácido α-L gulurónico B) Ácido β-D-manurónico C) Conformación GG, GM y MM de la cadena de alginato. Fuente: López 2012…… ……..……...31

Figura 4. Esquema de la formación del "modelo de caja de huevos"……31

Figura 5. Tipos de gelificaciones.....34

Figura 6. Parámetros involucrados durante la liberación de fármacos. ……..……..…….……37

Figura 7.- Cinética de disolución de Wagner, ln(%ND) vs tiempo……..……..40

Figura 8. Disolución de un soluto en el seno de una disolución. Concentración vs distancia. ……..…...……43

Figura 9. Cinética de disolución, Q vs $t^{1/2}$……...…….…46

Figura 10. Cinética de disolución, %Q vs tiempo…….….47

Figura 11. ln[concentración] vs tiempo, para el modelo matemático de primer orden……49

Figura 12. Cinética de disolución de primer orden……...…….50

Figura 13. Cinética de disolución de Hixon - Crowell……..…….....51

Figura 14. Ejemplar de *B. pictus* (Serpentario Oswaldo Meneses)……..……52

Figura 15. Estructura de la Fosfolipasa A2……...……...…..55

Figura 16. Estructura terciaria de la metaloproteinasa tipo 3……...…….…..55

Figura 17. Determinación de la dosis hemorrágica mínima (DHM) de la metaloproteasa hemorrágica aislada de *B. pictus* por PAGE-SDS en condiciones no

reductoras……..……..…57
Figura 18. Azul de coomassie G-250 a) estructura química b) iones absorbentes del colorante. ……..……..…….…...59
Figura 19. Curva patrón a partir de la Albúmina de suero de bovino……..……....67

Figura 20. Esquema de modelo caja de huevo del bloque G del polímero de alginato, interaccionando con un catión divalente……..……69

Figura 21. Formación del complejo de calcio con el EDTA……..……...….70

Figura 22. Curva cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.50% de alginato de sodio con 10 minutos de endurecimiento a 24 °C en condiciones estáticas y a 37 °C con agitación constante a 100 rpm y ajuste logarítmico de las curvas……..……..……..…….……73

Figura 23. Modelamiento matemático de Wagner de la cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.50% de alginato de sodio a 24 °C en condiciones estáticas y a 37 °C con agitación constante a 100 rpm ……...……..……76

Figura 24. Curva cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.75% de alginato de sodio, con 5 minutos de endurecimiento y ajuste logarítmico de las curvas……...……..……..77

Figura 25. Modelamiento matemático de Wagner a la curva de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.75% de alginato de sodio, a la temperatura de 24 °C, estático y a 37 °C, con agitación a 100 rpm……..…….……79

Figura 26. Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS/PAGE) de las proteínas liberadas durante la hidrolisis de la ECVS. Carriles: 1. Marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa Catalog number: 26619. 2. Veneno completo de *Bothrops pictus* (80 ug). 3: 24 horas de liberación. 4: 160 minutos de liberación. 5: 80 minutos de liberación. 6: 40 minutos de liberación. 7: 20 minutos de liberación. Recuadro rojo indica las bandas correspondientes a fosfolipasas A2, el

recuadro azul corresponde a las bandas de metaloproteinasas tipo 1 y el recuadro verde indica las bandas metaloproteinasas tipo 3……..……82

Figura 27. Electroforesis de las proteínas liberadas en la hidrolisis de la ECVS……...83

Figura 28. Forma y tamaño de las microcápsulas determinado mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM)……..84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores que adopta **n**, durante la liberación de microcápsulas hinchables.…..42

Tabla 2. Valores que adopta **n**, durante la liberación de microcápsulas no hinchables.……...……42

Tabla 3. Contenido de proteínas en el extracto crudo de veneno de serpiente *B. pictus*…….……..54

Tabla 4. Actividad enzimática del extracto crudo de veneno de serpiente *B. pictus*….54

Tabla 5. Actividad coagulante del extracto crudo de veneno de serpiente *B. pictus*…..54

Tabla 6. Concentraciones utilizadas de la proteína Albumina de suero de bovino para la elaboración de la curva de calibración…….……60

Tabla 7. Matriz del diseño experimental de completamente al azar para la evaluación de la cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo……61

Tabla 8. Diferentes condiciones de temperatura y agitación para la hidrólisis de las microcápsulas con el extracto crudo del veneno de serpiente inmovilizado……....61

Tabla 9. Concentración de la proteína Albúmina de suero de bovino vs absorbancia…67

Tabla 10. Parámetros experimentales para la hidrolisis de las microcápsulas del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizado con alginato de sodio……68

Tabla 11. Modelos matemáticos usados para ajustar la liberación del extracto crudo de veneno de serpiente en la presente investigación……71

Tabla 12. Modelos matemáticos usados para ajustar la liberación de las proteínas microencapsuladas del extracto crudo de veneno de serpiente para los casos de T1 y T2…….72

Tabla 13. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 24 °C, estático y con 0.50% p/v de alginato de sodio……...……75

Tabla 14. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 37 °C a 100 RPM y con 0.50% p/v de alginato de sodio……..……..75

Tabla 15. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 24 °C, estático y al 0.75% p/v de alginato de sodio……78

Tabla 16. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 37 °C a 100 RPM y al 0.75% p/v de alginato de sodio……79

Tabla 17. Resultados del modelamiento matemático de la cinética de liberación de ECVS *Bothrops pictus* "Jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato……81

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1: Modelamiento matemático de la cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizado con alginato de sodio al 0.50%.....95

ANEXO N° 2: Modelamiento matemático de la cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizado con alginato de sodio al 0.75%.....97

ANEXO N° 3: Espectrofotómetro UV – Vis T7S……..99

ANEXO N° 4: Potenciómetro HANNA HI 2211……..99

ANEXO N° 5: Incubadora agitadora……100

ANEXO N° 6: Autoclave.....100

ANEXO N° 7: Microscopio electrónico……...101

ANEXO N° 8: Agitador…….……...102

ANEXO N° 9. Comparación del porcentaje de los monómeros del alginato de sodio de diferentes marcas……...102

ANEXO N° 10. Valores y cálculos matemáticos para determinar los parámetros de los modelos matemáticos……103

RESUMEN

El encapsulamiento por extrusión consiste en la combinación de un núcleo (probióticos, proteínas, etc.) con una solución polimérica y un agente entrecruzante usualmente el $CaCl_2$. El propósito de este estudio fue analizar la cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo del veneno del *Bothrops pictus* "Jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato de sodio. Para lo cual se realizó la microencapsulación de 150 y 221 ppm del extracto crudo del veneno de serpiente usando diferentes concentraciones de alginato de sodio (0.5% p/v y 0.75% p/v) y cloruro de calcio 1.0 molar como agente entrecruzante. La microencapsulación se llevó a cabo mediante el método de extrusión. Posteriormente, para favorecer la liberación de los componentes proteicos del extracto crudo del veneno de serpiente a partir de las microcápsulas obtenidas, éstas fueron hidrolizadas en una solución de Buffer Fosfato pH 7.0. La concentración de proteínas se determinó utilizando el método Bradford utilizando el colorante Coomassie G-250, para lo cual se tomó en diferentes momentos 200μL de la solución hidrolizada en el Buffer Fosfato y se completó a un volumen de 2.0 mL con el reactivo de Bradford para su posterior lectura a 595 nm en un espectrofotómetro. La evaluación de la hidrólisis de las microcápsulas se llevó a cabo a dos temperaturas: 24 °C y 37 °C, y en condiciones estáticas y con agitación constante a 100 rpm. Para el modelamiento de la cinética de liberación de los componentes proteicos a partir de las microcápsulas de ECVS se trabajó con los modelos matemáticos: Orden cero, primer orden, cinética de Wagner y la cinética de liberación de Hixón – Crowell. Así mismo, se identificó las proteínas liberadas durante la hidrolisis en diferentes tiempos evaluados a partir de las microcápsulas del extracto crudo del veneno de serpiente mediante el método de Western Blot. La forma y el tamaño de las microcápsulas fueron caracterizadas mediante microscopia óptica y microscopía electrónica de barrido.

Durante la cinética de liberación del extracto crudo del veneno de serpiente inmovilizado con 0.50% de alginato de sodio y 10 minutos de endurecimiento, se liberó 70 ppm de los componentes proteicos a 24 °C y en condiciones estáticas; mientras que, a 37 °C con agitación constante a 100 rpm se liberó 75 ppm. La cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo del veneno de serpiente inmovilizado con 0.75% de alginato de sodio y 5 minutos de endurecimiento a los 210 minutos del tiempo de evaluación, determinó la liberación de 87 ppm a 24 °C y en

condiciones estáticas; mientras que, a 37 °C con agitación constante a 100 rpm se liberó 155 ppm. Para la determinación del perfil de la cinética de liberación de los componentes proteicos a partir de las microcápsulas del extracto crudo de veneno de serpiente se ajustó usando los siguientes modelos matemáticos: Orden cero, primer orden, cinética de Wagner y la cinética de liberación de Hixón – Crowell. De los modelos matemáticos mencionados, el que mejor se ajustó fue el modelo de Wagner, obteniéndose un valor de R^2 mayor a 0.90, de todos los casos evaluados. Así mismo, se logró identificar las proteínas liberadas; Metaloproteinasa tipo I y III y la Fosfolipasa A2; durante la hidrolisis a diferentes tiempos evaluados a partir de las microcápsulas del extracto crudo de veneno de serpiente mediante la electroforesis y de Western Blot mediante la caracterización de las microcápsulas mediante microscopia óptica y microscopía electrónica de barrido dio como resultado que éstas presentan casi una forma esférica y con tamaño promedio de 500 μm.

La inmovilización del extracto crudo del veneno de serpiente con 0.75% de alginato de sodio durante 5 minutos de endurecimiento con cloruro de calcio 1.0 M a una temperatura de 37 °C permitió obtener una mayor concentración del contenido proteico del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizado de 155 ppm en la disolución, para una concentración inicial de 221 ppm.

Palabras claves: Alginato de sodio, microencapsulación, *Bothrops Pictus,* cinética de liberación, hidrolisis, Western Blot.

ABSTRACT

Encapsulation using the extrusion technique involves the combination of a core (probiotics, proteins, etc.) with a polymer solution and a cross-linking agent, usually $CaCl_2$. The objective of the present investigation was to evaluate the release kinetics of the protein components of the crude extract of venom from the snake Bothrops pictus "Jergón de la costa" from microcapsules made from sodium alginate. For which microencapsulation of 150 and 221 ppm of the crude extract of snake venom was carried out using different concentrations of sodium alginate (0.5% w/v and 0.75% w/v) and 1.0 molar calcium chloride as a cross-linking agent. Microencapsulation was carried out by extrusion method. Subsequently, to promote the release of the protein components of the crude snake venom extract from the microcapsules obtained, these were hydrolyzed in a Phosphate Buffer solution pH 7.0. The determination of the protein concentration was carried out by the Bradford method using the Coomassie G-250 dye, for which 200 µL of the hydrolyzed solution in the Phosphate Buffer was taken at different times and completed to a volume of 2.0 mL with the reagent. of Bradford for subsequent reading at 595 nm in a spectrophotometer. The evaluation of the hydrolysis of the microcapsules was carried out at two temperatures: 24 °C and 37 °C, and under static conditions and with constant stirring at 100 rpm. To model the release kinetics of the protein components from the ECVS microcapsules, mathematical models were used: zero order, first order, Wagner kinetics and Hixon-Crowell release kinetics. Likewise, the proteins released during hydrolysis at different times were identified, evaluated from the microcapsules of the crude extract of snake venom using the Western Blot method. The shape and size of the microcapsules were characterized by optical microscopy and scanning electron microscopy.

During the release kinetics of the crude extract of snake venom immobilized with 0.50% sodium alginate and 10 minutes of hardening, 70 ppm of the protein components were released at 24 °C and under static conditions; while, at 37 °C with constant stirring at 100 rpm, 75 ppm was released. The release kinetics of the protein components of the crude extract of snake venom immobilized with 0.75% sodium alginate and 5 minutes of hardening at 210 minutes of the evaluation time, determined the release of 87 ppm at 24° C and under conditions static; while, at 37 °C with constant stirring at 100 rpm, 155 ppm was released. To determine the profile of the release kinetics of the protein components

from the microcapsules, the crude extract of snake venom was adjusted using the following mathematical models: Zero order, first order, Wagner kinetics and Hixon release kinetics. – Crowell. Of the mathematical models mentioned, the one that fit best was the Wagner model, obtaining an R^2 value greater than 0.90, of all the cases evaluated. Likewise, it was possible to identify the released proteins; Metalloproteinase types I and III and Phospholipase A2; during hydrolysis at different times evaluated from the microcapsules of the crude extract of snake venom through electrophoresis and Western Blot through the characterization of the microcapsules by optical microscopy and scanning electron microscopy, the result was that they have an almost spherical shape. and with an average size of 500 μm.

Immobilization of the crude extract of snake venom with 0.75% sodium alginate during 5 minutes of hardening with 1.0 M calcium chloride at a temperature of 37 °C allowed obtaining a higher concentration of the protein content of the crude extract of immobilized snake venom of 155 ppm in the solution, for an initial concentration of 221 ppm.

Keywords: Sodium alginate, microencapsulation, Bothrops Pictus, release kinetics, hydrolysis, Western Blot.

I. CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Los accidentes ofídicos, por las mordeduras de serpiente causan entre 81 mil y 138 mil muertes al año, ocasionando una cifra triplicada para los casos de amputación y discapacidad permanente según la OMS (2023). Las mordeduras de serpientes ocasionan la muerte de personas, cuando no es tratado a tiempo. En el caso de que la mordedura no es mortal y es tratado a tiempos, los afectados pueden sufrir daños a la piel, en algunos casos el desmembramiento total o parcial de la zona afectada.

En el Perú, la mordedura ocasionada por serpientes del género *Bothrops* son los causantes frecuentemente de ofidismo; las especies más conocidas presentes en la selva son: *Bothrops atrox* (jergón) y *Bothrops. bilineatus* (loro machaco); *B. barnetti* (macanche) y en la costa se halla el género *Bothrops. pictus* (víbora de costa). (Maguiña et al**.,** 2020).

Desde hace un siglo la obtención de sueros antiofídicos se obtienen principalmente a través de equinos. El cual consiste en extraer el veneno, procesarlo e inocularlo, en dosis no letales en el caballo durante varios meses. Durante este lapso de tiempo, las toxinas estimulen el sistema inmune produciendo anticuerpos que son capaces de bloquear las toxinas el cual se convierte en el componente principal del suero antiofídico, el cual se usa para tratamiento de casos de envenenamiento por mordedura de serpientes (Fusco et al., 2019)

La inoculación de caballos con el veneno de *B. alternatus* induce respuestas orgánicas que se manifiestan en el lugar de aplicación y a nivel sistémico, incluyendo alteraciones en el hemograma, la coagulación sanguínea y los niveles de anticuerpos. Los síntomas clínicos más destacados aparecieron poco después de la administración del veneno, siendo notablemente evidentes después de aproximadamente 10 minutos. Estos síntomas incluyen inflamación en el sitio de la inyección, agitación, leve hipotensión evidenciada por la fatiga, pérdida de apetito y, en algunos casos, adopción de una postura de decúbito. El edema se limitó a las áreas donde se administró la vacuna. (Bogado et al., 2013).

El método de encapsulamiento por goteo representa una alternativa importante que podría optimizar la inmunización de sueros antiofídicos sin efectos tóxicos en el animal sero-productor. Varios estudios respaldan la seguridad del uso de alginatos en alimentos. Los alginatos de sodio, potasio, calcio, amonio, ácido algínico y alginato de propilenglicol son aditivos alimentarios reconocidos por su inocuidad y seguridad, según la

Administración de alimentos y medicamentos (FDA). Del mismo modo están enlistados en el Código Alimentario que provee las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde se establece la ingesta diaria de ácido algínico y de sus sales derivadas para los humanos, el cual es de 50 mg/kg de peso corporal, y del alginato de propilenglicol de 25 mg/kg de peso corporal (FAO/WHO, 2001).

Los sistemas de liberación controlada surge debido al requisito de mantener una concentración óptima del agente bioactivo en un área específica del organismo donde se va a utilizar (Setapa et al., 2020). Este enfoque ayuda a mitigar la toxicidad del compuesto al reducir los efectos perjudiciales asociados con administraciones frecuentes y en dosis elevadas, al mismo tiempo que mejora la eficacia de agentes terapéuticos con corta vida media o cuya vía de administración es poco eficiente. (Ford Versypt et al., 2013).

El interés en la liberación controlada de agentes bioactivos mediante compuestos poliméricos biodegradables ha aumentado en la comunidad científica, ya que estos materiales no requieren extracción quirúrgica posterior y se descomponen de manera natural sin causar problemas de biocompatibilidad. (Chasin & Langer, 1991; Darwish & Bayoumi, 2020).

Este método no se limita únicamente al ámbito médico. Otros campos de investigación como la agricultura, industria alimenticia, industria cosmética y productos del hogar poseen aplicaciones prácticas. (Ito et al., 2013; Hines & Kaplan, 2013; Zhu et al., 2019; Pereira et al., 2019: Lagreca et al., 2020).

Por lo cual, la evaluación de la cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo del veneno del *Botrhops pictus* "jergón de la costa", inmovilizado en microcápsulas de alginato de sodio, permitirá conocer que componentes proteicos son liberados bajo diferentes condiciones de trabajo.

1.1. *OBJETIVOS:*

1.1.1. Objetivo general:

Evaluar la cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo del veneno del *Bothrops pictus* "jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato.

1.1.2. Objetivos específicos:

- Encapsular el extracto crudo del veneno de la serpiente *Botrhops pictus* (ECVS) utilizando diferentes concentraciones del alginato de sodio mediante el método de extrusión.
- Evaluar la cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo del veneno de la serpiente (ECVS) a través de los modelos matemáticos de Wagner, Hixón – Crowell, primer orden y de orden cero.
- Identificar los componentes proteicos del extracto crudo del veneno de la serpiente (ECVS) que se liberan a partir de las microcápsulas, durante el tiempo evaluado mediante el método de Western Blot.
- Caracterizar las microcápsulas del extracto crudo del veneno de la serpiente (ECVS) inmovilizada a través de microscopia óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM).

II. CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. *ANTECEDENTES*

El desarrollo de compuestos microencapsulados inicia en 1950 con la investigación de recubrimientos sensibles a la presión para la elaboración de papel carbón (Green y Scheicher, 1955). Hoy en día esta tecnología se encuentra bien desarrollada en los áreas de la industria farmacéutica, química, alimentos, etc.

La técnica de microencapsulación ha sido descrita como un proceso en donde pequeñas partículas o gotas son rodeadas por un recubrimiento homogéneo o heterogéneo integrado a las cápsulas con diversas aplicaciones en los áreas de la industria farmacéutica, química, alimentos, etc. (Borgogna et al., 2010).

La microencapsulación es una técnica que implica la introducción de compuestos activos, como proteínas, antioxidantes, aromatizantes, bactericidas, etc., en una matriz polimérica. El propósito principal es proteger estos compuestos del entorno en el que serán liberados, evitando la reacción con algún otro componente del alimento o controlando la velocidad de liberación, la cinética de liberación se lleva a cabo de manera controlada bajo condiciones específicas (Yañes y col., 2002). Para este proceso, es crucial contar con una matriz polimérica que cumpla ciertos caracteristicas, como ser inerte, ser de baja toxicidad, fácil de metabolizar, biocompatible y de elevada estabilidad, para preservar integralmente el compuesto activo de los factores externos (Champagne, 2007). Por tanto, definimos la microencapsulación como una técnica que adquiere una barrera que ralentiza las reacciones químicas con el medio circundante, lo que aumenta la vida útil del principio activo y permite una liberación paulatina del mismo, también permite una facil manipulación al transformar un material líquido o gaseoso en microcápsulas (Fang & Bhandari, 2010). Las microcápsulas generalmente adquieren formas esféricas o irregulares, es semipermeable y delgada, rodeando un centro sólido o líquido, con un diámetro que varía de algunos micrones hasta los 1000 μm. El centro de la pela se conoce como fase interna, mientras que la membrana puede ser llamada capa externa o matriz.

Una matriz polimérica, también conocida como hidrogel, son redes tridimensionales afines al agua que pueden embeber considerables cantidades de líquidos o moléculas. Se clasifican en dos grupos principales: polímeros artificiales y naturales. Una ventaja clave de las matrices poliméricas naturales es su compatibilidad con los tejidos fisiológicos (Fang et al., 2010). Según su naturaleza química, pueden ser polímeros reticulados mediante enlaces químicos, y polímeros físicos, reticulados mediante fuerzas de Van der

Waals. (Hunt et al, 2014). Algunas matrices poliméricas naturales incluyen quitosán, carragenán, celulosa, goma xantán, goma gellan y alginato. El alginato posee características tales como: no tóxicas, biocompatibilidad y propiedades de entrecruzamiento afín y fácilmente con metales divalentes (Yu et al, 2008)

Las microcápsulas son de forma redondeada o irregular, con superficies homogéneo o irregulares (Nazzaro et al., 2009). Están formadas por una membrana simple y pueden presentar uno o varios núcleos. Además, pueden estar compuestas por una mezcla de uno o más polímeros y conformadas por una matriz polimérica recubierta con un material encapsulante diferente. Una característica importante es su insolubilidad en agua, ya que su estructura debe mantenerse intacto al incorporarse en los alimentos como una barrera probiótica contra las condiciones del sistema gastrointestinal, sin dificultar la diseminación de las bacterias benéficas en el organismo. (Frakolaki et al, 2021)

Principales ventajas de la microencapsulación (Astray et al., 2009):

- Protección del compuesto activo de la degradación causada por factores ambientales como el pH, el calor, el aire, la luz, la humedad, etc
- El compuesto activo protegido se libera de forma gradual y controlada de la matriz en el punto de aplicación.
- algunas propiedades del compuesto pueden ser alteradas y facilitar su manejo (un material líquido convertido a polvo), la capacidad de absorber humedad puede reducirse, la densidad modificarse y el material contenido puede ser suministrado más homogéneamente en una muestra.
- El aroma y el sabor del principio activo pueden ser alterados.
- Estabilización de principios activos inestables.

Lili Li y colaboradores en 2014, estudiaron la encapsulación del péptido hidrosoluble Catelicidina-BF-30, veneno de la serpiente *Bungarus fasciatus*, el cual incorporaron treinta residuos de aminoácidos en PGLA para la preparación de microesferas mediante el método extracción con solvente w/o/w en el cual se dio dos veces la emulsificación y una extracción con solvente usando una solución de isopropanol. La eficiencia resultante fue de 88.59% y con un tamaño menor de 2 mm (Lili et al, 2014). Trindade y colaboradores en 2011, utilizaron la técnica de doble emulsión evaporación de solvente para preparar microesferas recubierta con el copolímero ácido glicólico (PLGA), las

cuales contenían proteínas de veneno de abeja, con la finalidad de reemplazar la clásica inmunoterapia. (Trindade et al, 2011). La metodología fue modificada, donde se mezcló el veneno de abeja con diclorometano que contenía PLGA y se emulsificó. El resultado de la primera emulsificación se añadió PVA con una agitación lenta, luego se dio la segunda emulsificación para ponerlo 3 horas en agitación; las micropartículas fueron recolectadas por centrifugación y posteriormente conservadas. Se obtuvieron microesferas con eficiencias de encapsulación del 49 al 75 % con un perfil de liberación trifásica BV. Entre ellos, el MS-PLGA 34 kDa-COOH mostró ser el mejor para VIT porque presentó un estallido inicial bajo (20%) y una liberación lenta de BV durante la fase de latencia. Además, se observaron pocos cambios conformacionales en el BV liberado. Sobre todo, las BV se mantuvieron inmunológicamente reconocibles, lo que significa que podían estimular continuamente el sistema inmunológico. Esas microesferas que contienen BV podrían reemplazar las inyecciones secuenciales de VIT tradicional con la notable ventaja de un número reducido de inyecciones.

Ravi y colaboradores encapsularon la proteína albúmina de suero bovino hidrófila resultando microesferas de poli (D,L-lactida-co-glicolido) mediante el método de disolvente de emulsión doble. En la investigación se monitoreo parámetros como tamaño de partícula, la eficiencia del atrapamiento, así como la liberación in vitro. En la caracterización dio un tamaño de partícula entre 3.98 a 8.74 µm mientras que la eficiencia de la carga de proteína varió de 40 a 71%. El atrapamiento exitoso de la proteína dependía en gran medida del tipo de solvente orgánico utilizado. La eficacia de atrapamiento de las microesferas preparadas con acetona, acetato de etilo y diclorometano fue de 29,57, 29,93 y 40,14 %, respectivamente.

Rocha Soares y colaboradores, evaluaron propiedades inmunoadyuvantes de las nanopartículas de quitosano cargadas con veneno de dos especies de serpiente: *B. jararaca* y *B. erythromelas*, las cuales se obtuvieron mediante gelificación iónica. Se concluyó que estas nuevas nanopartículas fueron menos inflamatorias debido a su liberación modificada y tiene un enfoque prometedor. Las nanopartículas de quitosano que contienen veneno de *B. jararaca* o *B. erythromelas* se formaron espontáneamente cuando se añadió una solución de proteína y TPP a una solución de quitosano. En el proceso de incorporación, las proteínas quedan atrapadas e incrustadas en la matriz de quitosano y proteína, y algunas moléculas de proteína también se adsorben en la superficie de la partícula. Este fenómeno explica la alta eficiencia de encapsulación de las nanopartículas de <200 nm, incluso después de la adición de veneno de serpiente. Este

hecho está respaldado por las interacciones intermoleculares de los grupos carboxilo de las proteínas con los grupos amina libres del quitosano (Rocha Soares et al., 2018). Silvarrey (2015) estudió la encapsulación de la proteína EgVAL1 mediante la técnica de doble emulsión con evaporación de solvente variando la concentración de los polímeros PCL y PLA ácido poliláctico así como de las concentraciones de las proteínas para optimizar los parámetros de las nanopartículas, el tamaño de las nanopartículas fue de 258.5 nm; sobre la eficiencia de encapsulamiento de las nanopartículas con quitosano no fue posible determinar debido a que los datos obtenidos no hubo cocordancia en los resultados obtenidos.

Dounighi y colaboradores (2015) prepararon nanopartículas de quitosano cargadas con veneno de *Mesobuthus eupeus* por el método de gelificación iónica de tripolifosfato (TPP) y quitosano. Se analizó la efectividad de la microencapsulación óptima, así como su límite de carga y la liberación in vitro; la caracterización de las nanopartículas se dio mediante microscopio electrónico de transmisión (TEM) y a través de la espectrometría de infrarrojo haciendo uso de la transformada de Fourier (FTIR). La metodología se da a partir de añadir la solución de quitosano mediante gotas a la solución de tripolisfofato (TPP) la cual debe estar bajo agitación magnética para finalizar con la centrifugación. La efectividad de la microencapsulación óptima (91,1 %) y su límite de carga (76,3 %) se obtuvieron con una concentración de quitosano de 2 mg/mL, con una relación de masa de quitosano a TPP de 2 y una concentración de veneno de *M. eupeus* de 500 µg/mL. El tamaño promedio de las nanopartículas en condiciones óptimas fue determinado por Zetasizer (Malvern Instruments, Reino Unido). El tamaño de las nanopartículas fue de unos 370 nm (índice de polidispersión: 0,429) mientras que el potencial zeta fue positivo. Las imágenes del microscopio electrónico de transmisión (TEM) mostraron una estructura esférica, suave y casi homogénea para las nanopartículas. La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) confirmó los grupos tripolifosfóricos de TPP vinculados con grupos de amonio de quitosano en las nanopartículas. La liberación in vitro de nanopartículas mostró una liberación inicial de aproximadamente el 60 % en las primeras diez horas, seguida de una liberación adicional lenta y muy reducida durante unas 60 horas.

Shaobing Zhou y colaboradores (2001), trabajaron con la proteína modelo albúmina de suero humano (HSA), se atrapó de manera eficiente por alginato mediante un agitador de alta velocidad y posterior microencapsulado en copolímero PELA mediante el método de extracción con solvente w / o / w. Para la caracterización de las microesferas se dio en

términos de morfología, tamaño, eficiencia de carga, en degradación in vitro y liberación de proteínas. Se obtuvo un porcentaje de 82% de atrapamiento y una carga de eficiencia de 56.7%.

Rezayat y colaboradores (2015) estudiaron la formación de las nanopartículas de quitosano cargadas con veneno de serpiente *Echis carinataus* a partir del método gelificación iónica del TPP y quitosano; se evaluaron los tamaños de las partículas. Como resultado se observó que la actividad biológica del veneno no se vio afectada y se mostró estable. El diámetro de partícula fue menor a 160 nm y mantuvo el tamaño de partícula uniformemente distribuido (IPD< 0.3), el potencial zeta tuvo un valor a +30,0 mV e índice de polidispersión ≤ 0,3 (Rezayat et. al, 2015).

Damavandi y colaboradores (Damavandi et al., 2012), trabajaron con el veneno de escorpión *Hemiscorpius lepturus* encapsulado en nanopartículas de quitosano con el método de gelificación iónica. Se evaluaron propiedades fisicoquímicas y potencial como sistema de liberación de antígeno. La descarga *in vitro* de las NPs cargadas con el veneno de escorpión se evaluó utilizando las nanopartículas preparadas en condiciones óptimas (2mg/mL de quitosano y $500\mu g/ml$ de veneno de escorpión) con una capacidad del 88.84%. El perfil de liberación mostró una liberación del 50% en las primeras 4 horas (Damavandi et. al., 2012)

2.2. *MARCO TEORICO*

La microencapsulación se define como una tecnología de empaque de materiales, ya sean sólidos, líquidos o gaseosos, estas microcápsulas pueden liberar su contenido a velocidades controladas bajo condiciones específicas, esta tecnología tiene su uso en la industria, como la textil, metalúrgica, química, química de los alimentos, farmacéutica, etc.; las sustancias que se micro encapsulan pueden ser vitaminas, minerales, colorantes, prebióticos, probióticos, drogas, fertilizantes, etc. (Adolfo y Huertas, 2010).

Los materiales uzados para el microencapsulamiento pueden ser gelatina, grasas, aceites, goma arábiga, alginato de calcio, almidón de trigo, malto dextrina, alginato de sodio, entre otros. (Esquivel et. al. 2011).

2.2.1. Materiales encapsulantes

Existe una gran variedad de compuestos encapsulantes, pero, para la elección de la matriz, es crucial tener en cuenta características como la solubilidad en agua, la permeabilidad,

la manipulabilidad y la baja viscosidad en soluciones concentradas, el pH del medio y naturaleza hidrofóbicas o hidrofílicas del principio activo y la matriz. Todos los factores mencionados determinan las características de las microcápsulas (Gibbs et al., 1999).

Los materiales utilizados para la matriz incluyen carbohidratos como almidones de diversas fuentes como papa, arroz, maíz, entre otros (Loksuwan, 2007), así como maltodextrinas con diferentes equivalentes de dextrosa (ED) (Wagner y Wathersen, 1995; Desobry y col., 1997), alginato de sodio, carragenina y quitosano (Huertas, 2010). En líneas generales, estas matrices han demostrado proporcionar protección al agente activo contra los daños causados por factores externos, si bien la estabilidad del agente activo puede variar según el tipo de matriz empleada. (Robert et al., 2003).

Los materiales utilizados como matrices pueden ser empleados individualmente o formando mezclas con otros polímeros para crear materiales encapsulantes con el fin de obtener matrices poliméricas mejoradas. (López, 2012).

Las sales de alginato más empleadas es el alginato de sodio, esto debido a su alta solubilidad en agua fría y una transición sol-gel de forma rápida e irreversible ante el ión calcio (Funami et al., 2009)

En este estudio, se empleó alginato de sodio junto con una solución de cloruro de calcio como agente entrecruzante. Esta elección se basó en el hecho de que el alginato como el cloruro de calcio son polímeros naturales, lo que condujo a obtener resultados satisfactorios. (George & Abraham, 2006).

2.2.2. Métodos de encapsulamiento

Los métodos usados para la microencapsulación son: secado por atomización, liofilización, extrusión, atrapamiento por liposomas, coacervación (Gibbs et al., 1999; Santinho y col., 2002). Inclusión, extrusión centrifuga, suspensión rotacional, separación y polimerización interfacial (Wang et al., 2004) entre otros.

El área de la microencapsulación de proteínas tiene aplicación e importancia en diferentes áreas de investigación, el encapsulado de las cargas proteicas se da mediante métodos cuyas características poseen ventajas y desventajas ya que es un reto mantener una alta carga, viabilidad y estabilidad (Chan et. al, 2004). El alginato de sodio, polímero natural, se obtiene a partir de algas pardas como *Ochrophyta* y *Phaeophyceae* así como de las

bacterias de *Pseudomonas* y *Azatobacter vineland*; el alginato se caracterizan por ser biodegradables, biocompatibles, no tóxicos ni antigénicos.

2.2.3. Encapsulación por extrusión

La formación de las microcápsulas se realiza al pasar la solución que contiene el principio activo con el alginato a microencapsular a través de un dispositivo extrusor con tamaño y velocidad de goteo controlados. Las gotas se depositan sobre la solución que contiene la fuente del ion calcio. El catión del cloruro de calcio induce la gelificación mediante el mecanismo de gelificación externa. (Chan et al., 2009).

La encapsulación por extrusión es la técnica más estudiada debido a su simplicidad. Este método es de bajo costo económico en comparación con la emulsificación, la cual es más costosa debido a que requiere componentes adicionales como aceite vegetal y emulsionantes para estabilizar la emulsión. (Robert et. al, 2003)

La microencapsulación por extrusión implica la mezcla de un núcleo o principio activo (probióticos, proteínas, aceites esenciales, etc.) con una matriz polimérica, esta solución se libera por goteo usando una jeringa las cuales se depositan en una solución que contiene un agente entrecruzante, comúnmente $CaCl_2$. Posterior a ello, las gotas experimentan gelificación, lo que resulta en la obtención de perlas. Las dimensiones y las formas de estas perlas formadas están influenciados por el diámetro de la boquilla de la jeringa y la separación de la jeringa y la solución del agente entrecruzante. (López et. al, 2012)

Una de las limitantes de este método es la incapacidad para la obtención de perlas del tamaño de micrométros, se ha llevado a cabo variedad de alteraciones para contrarrestar estos inconvenientes. A partir de estas adaptaciones, se originan tres variantes en la encapsulación por extrusión: la extrusión por ruptura de chorro, por disco giratorio y, por último, la extrusión por atomización (Funami et al., 2009). En la primera variante, está basado en la disposición laminar y constante de un chorro de la matriz polimérica mediante una jeringa. Este chorro se divide en pequeñas gotas debido a la atomización electrostática (Figura 1. A), mediante vibraciones (Figura 1. B) o a través de un disco cuya función es cortar el chorro de polímero (Figura 1. C), lo que permite obtener gotas más pequeñas hacia la solución gelificante. Además, está la encapsulación por extrusión a través de un disco giratorio, donde se utiliza un disco que gira a elevadas velocidades. La fuerza centrífuga generada por este disco permite dividir la matriz polimérica en gotas

más pequeñas (Figura 1. D). Del mismo modo, se puede emplear una boquilla giratoria en lugar de un disco (Figura 1. E). Por último, está la extrusión por atomización, una variante en la que se dispone un flujo continuo de solución polimérica que es expuesto a un elevado flujo de aire. Esta operación provoca la formación de pequeñas gotas de polímero, por ende, la obtención de microcápsulas del tamaño de micrométros al mezclarse con la solución que contiene al catión calcio, estas variantes se pueden vizualizar en la figura 1 (George et. al, 2006)

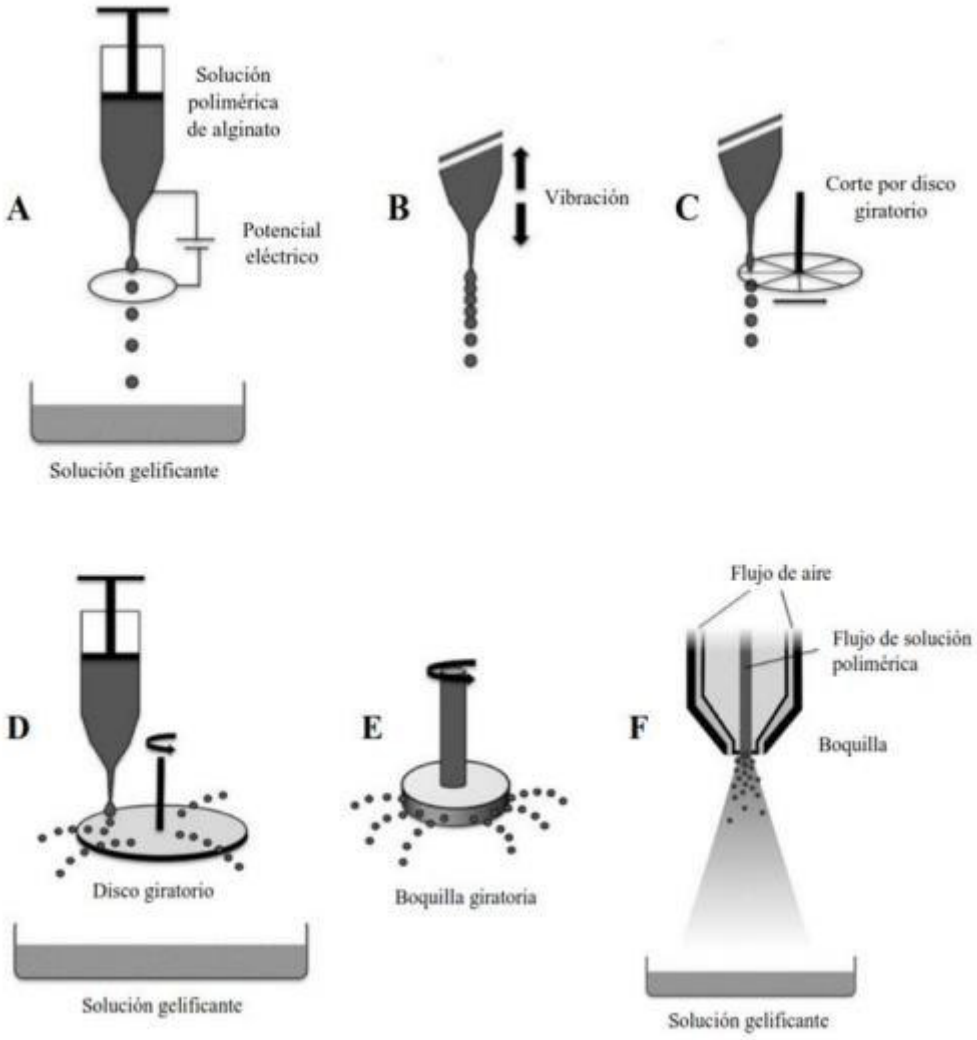


Figura 1. Variantes de la microencapsulación por extrusión: extrusión por atomización electrostática (A). Extrusión mediante vibración (B). La extrusión de corte por disco giratorio(C). La extrusión por disco giratorio (D). La extrusión por boquilla giratoria (E) y la extrusión por atomización (F). Cada una de estas técnicas ofrece distintas ventajas y aplicaciones dependiendo de las necesidades específicas del proceso de encapsulación.

Las microcápsulas obtenidas a partir de las variantes de la microencapsulación por

extrusión modificada pueden obtenerse microcápsulas menores a 500 µm (Avgoustakis et al., 2008). Las investigaciones llevadas a cabo por Silva y colaboradores (2016) demostraron que la variante del método por extrusión mediante ruptura de chorro permitió la obtención de perlas de alginato de menor tamaño, estando húmedas presentan tamaños que van desde los 1370 a los 1480 µm, cuando las cápsulas se encuentran secas, el tamaño de las perlas disminuyeron hasta un tamaño de 710 a 860 µm (Xu et al., 2019). En los estudios realizados por Eckert y colaboradores (2018) llegaron a obtener microcápsulas de alginato con una dimensión cercano a 160 µm, el tamaño de las perlas disminuyó hasta los 100 µm tras secarlas. La obtención de las cápsulas se realizó mediante la variante del método de extrusión por ruptura de chorro.

La obtención de cápsulas mediante el uso de la técnica de extrusión por atomización se llegó a obtener perlas con diámetros de 97,1 ± 0,4 µm, además, se observaron diámetros de 72 µm en microcápsulas de alginato con aceite de girasol.

El método de extrusión, al ser simple, permite mantener la factibilidad celular. Sin embargo, similar a otros métodos, la encapsulación por extrusión presenta ciertas desventajas. Es un método lento y la obtención de perlas a nivel industrial puede ser inviable. Además, no es posible obtener microcápsulas de tamaño inferior a 1000 µm. Para producir estas microcápsulas, el alginato debe presentar una viscosidad moderada o baja. Es crucial que el método esté estandarizado en cuanto a la separación de caída de las gotas de la solución de alginato y se mantenga una velocidad constante de goteo.

Las principales ventajas que posee la encapsulación por extrusión son: (Setapa et al., 2020)

- brinda una barrera entre el principio activo y el medio ambiente, brindando estabilidad durante la microencapsulación.
- disminuye los procesos de degradación como la oxidación o la hidrólisis.
- Facilita la liberación del contenido de manera controlada a lo largo del tiempo o en condiciones específicas.

La principal limitante que presenta esta técnica es el gran tamaño de las perlas que se obtiene, el cual está determinada por el diámetro de la boquilla del dispositivo extrusor. Una desventaja adicional es la ineficiencia en la producción a nivel industrial, debido a que la obtención de las microcápsulas se lleva a cabo de manera individual, ocasionando la formación de perlas en largos tiempos (Mofidi et al., 2000).

2.3. *ALGINATO DE SODIO*

El alginato es un copolímero lineal de origen natural que se obtiene de algas marinas pardas pertenecientes a la clase *Phaeophyceae*. Estas algas pueden incluir géneros como *Macrocystis*, *Laminaria, Ascophyllum*, Alaria, *Ecklonia, Eisenia, Nereocystis*, *Sargassum, Cystoseira* y *Fucus*. El alginato desempeña un rol estructural, proporcionando una solidez mecánica y flexibilidad. La mayor parte de la producción proviene de solo dos especies de algas: *Macrocystis porifera y Ascophyllum nodosum* (Xu et al., 2019). Además de su extracción de algas marinas, el alginato también puede ser sintetizado por algunas bacterias de los géneros *Azotobacter y Pseudomonas*. Estas bacterias sintetizan ácido algínico de forma extracelular, actuando como exopolisacárido. (Costa et al., 2001)

El alginato es soluble en agua y tiene la capacidad de formar una estructura reticulada al unirse con cationes divalentes o polivalentes, lo que resulta en la formación de una malla insoluble. Se ha observado que los cationes de calcio y zinc pueden unirse a los grupos ácidos del alginato. La característica principal es la capacidad de formar geles insolubles mediante la gelificación inotrópica con cationes de calcio en condiciones simples que permite la encapsulación de agentes bioactivos macromoleculares, como proteínas, células, etc.

El alginato permite la obtención de un gel estable y biocompatible. La obtención de perlas se logran mediante el intercambio de los iones sodio de los ácidos glucurónicos con el catión cálcico o magnésica , y el aglomeración de los grupos glucurónicos para formar una red tridimensional, conocida como "caja de huevos" (Figura 2). Los factores que afectan en este proceso de gelificación incluyen la concentración del alginato, su composición química, el porcentaje de los monómeros manurónicos y glucurónicos, la proporción entre la matriz polimérica y no gelificantes, y la presencia de compuestos acomplejantes como fosfatos o citratos. También es importante tener en cuenta que el alginato, al ser un polielectrolito, interactua mediante fuerzas de Van der Waals con otros polímeros cargados.

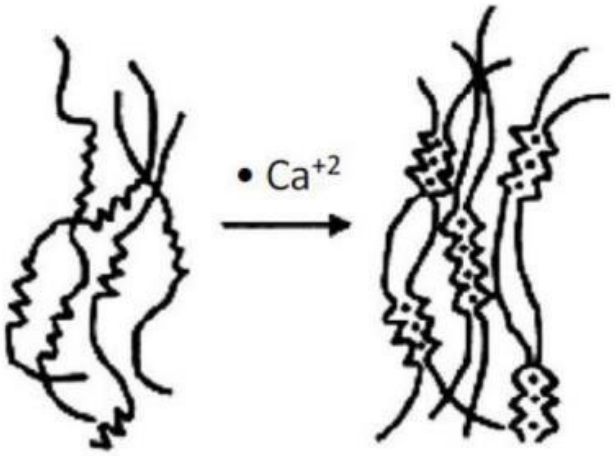


Figura 2. Esquema del modelo de "caja de huevo" del alginato de calcio
Fuente: López 2012.

2.3.1. Composición y estructura química del alginato de sodio

El alginato de sodio es una sal sódica del ácido algínico un polisacárido natural y un polímero lineal compuesto de residuos de ácido 1,4-β – D-manurónico (M) y ácido α-D-gulurónico (G) en arreglos y proporciones variadas, unidos mediante enlaces glicosídicos 1→4 y dispuestos de manera homo- y heteropolimérica (Figura 3). Por esta razón no solo basta conocer la composición del alginato, sino también el porcentaje de sus componentes. Las tres formas estructurales del alginato son: el bloque GG, que presenta una estructura abultada; el bloque MM, que exhibe una estructura tipo cinta plana; y el bloque MG, que tiene una estructura tipo escalera. El enlace glicosídico en un bloque MM se forma entre los carbonos ecuatoriales C-1 y C-4, mientras que en un bloque GG se forma entre los carbonos axiales C-1 y C-4. La proporción de los bloques G/M y la cantidad de estos bloques son factores cruciales que influyen en las características del alginato. (Ayarza et al., 2023).

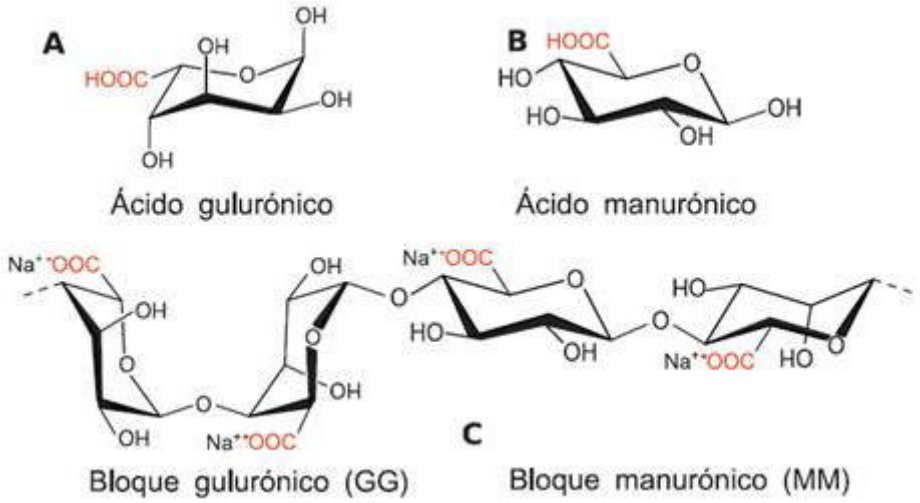


Figura 3. Estructura del alginato. A) Ácido α-L gulurónico B) Ácido β-D-manurónico C) Conformación GG, GM y MM de la cadena de alginato. Fuente: López 2012.

2.3.2. Tipos de gelificación del alginato

La formación de perlas es independiente de la temperatura, el cual se lleva a cabo por dos métodos: el entrecruzamiento iónico o la precipitación por ácidos, obteniéndose microcápsulas iónicos y microcápsulas ácidos respectivamente. Las microcápsulas obtenidos por reticulación iónica ocurre mediante el entrecruzamiento del alginato con un catión divalente, siendo el ion calcio (Ca^{2+}) el más utilizado. La afinidad entre el alginato y el ion calcio está intimamente relacionada con la cantidad de bloques G presentes en la matriz polimérica. La estructura física de esta reticulación se conoce como el modelo de "caja de huevos". (Figura 4) (Peppas et al., 1983).

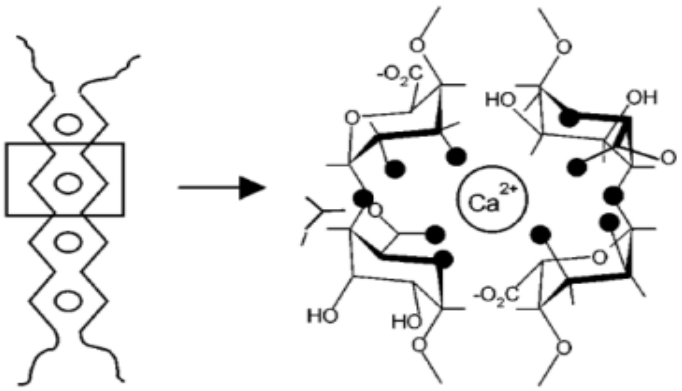


Figura 4. Esquema de la formación del “modelo de caja de huevos”.

Las microcápsulas ácidas de alginato se forman cuando el pH de la solución es menor que la constante de disociación (pKa) del alginato. Esto minimiza la interacción electrostática entre las cadenas de la matriz polimérica, lo que permite la unión mediante enlaces de hidrógeno. Esta unión ocurre de manera rápida o lenta. Una disminución rápida del pH forma precipitados de alginato, mientras que una disminución gradual permite la formación de perlas en masa. Similar a los geles iónicos, la fuerza del gel está ligada con la presencia del monómero gulurónico en el alginato. (George et al., 2006).

El proceso de formación del gel se inicia con una solución de sal de alginato y una fuente de calcio, que puede ser externa o interna, de donde el ion calcio se esparce hacia las cadenas poliméricas. Produciendo un reordenamiento estructural en el espacio, lo que da como resultado un material sólido con las propiedades de un gel. El grado de gelificación está influenciado por varios factores, incluyendo la humectación del alginato, el contenido del ion calcio y el contenido del monómero gulurónico. (Funami et al., 2009).

La transición de sol a gel está intrínsecamente controlada por la capacidad de penetración del ion vinculante en el polímero. La velocidad de gelificación y las características del gel dependen del tipo de contra-ion, es decir, del ion monovalente presente en la sal de alginato (K^+oNa^+). Se ha observado que el alginato de potasio presenta una transición de sol a gel más rápida en comparación con el alginato de sodio cuando se preparan a bajas concentraciones de calcio. A pesar de que los geles de alginato de calcio obtenidos pueden parecer igualmente estables a simple vista, se han encontrado diferencias marcadas en sus propiedades reológicas. Las perlas obtenidas a partir del alginato de sodio exhiben valores de módulos elásticos más bajos en comparación con los geles obtenidos a partir del alginato de potasio.

En este sentido, las propiedades viscoelásticas de los geles puede ser disminuidos utilizando alginatos con elevado porcentaje del monómero gulurónico en su estructura (Draget, 2000). Los mecanismos de gelificación iónica se llevan a cabo mediante dos procesos: la gelificación externa y la gelificación interna.

2.3.2.1. ***Gelificación externa***

Este proceso se lleva a cabo mediante la difusión del ion calcio desde una fuente que rodea al hidrogel hacia la solución de alginato de pH neutro. La formación de las perlas

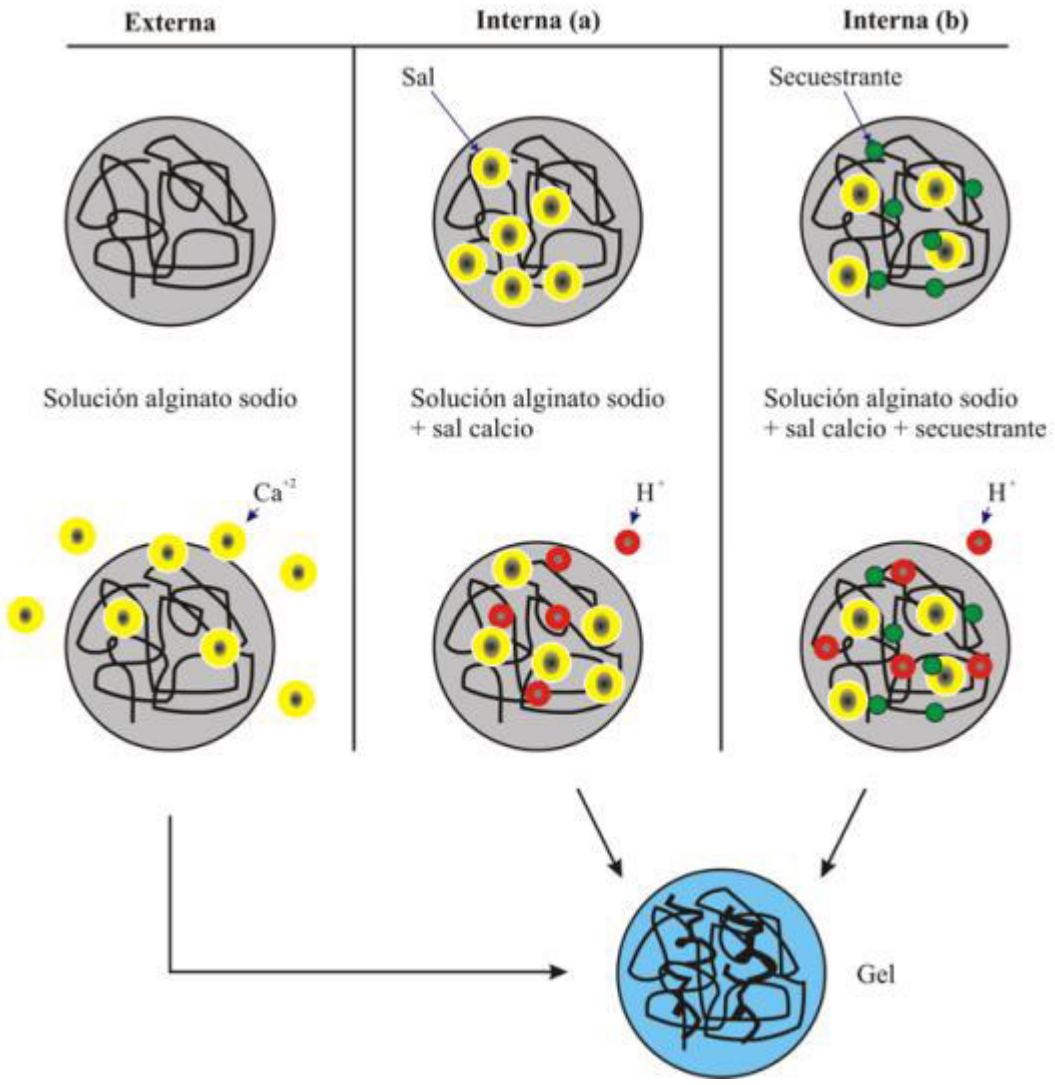
comienza en la interfase y avanza hacia el interior del polímero a medida que la superficie se satura de iones calcio. De esta manera, el ion sodio es intercambiado por el calcio solubilizado en agua. El catión calcio interactua con el monómero gulurónico de la cadena polimérica, uniéndolas entre sí. Aunque la fuente de calcio más comúnmente utilizada es el cloruro de calcio ($CaCl_2$) debido a su mayor contenido del catión calcio disponible, también se emplean otras sales como el acetato monohidratado y el lactato de calcio. (Figura 5). (Helgerud et al., 2010).

2.3.2.2. ***Gelificación interna***

Este método se basa en la liberación paulatina del ion calcio desde una fuente interna de sal de calcio insoluble o parcialmente soluble dispersa en la disolución de alginato de sodio. El desligamiento del catión calcio se lleva a cabo de dos formas:

a) Cuando la sal de calcio es insoluble a pH neutro pero soluble a pH ácido, por lo tanto se requiere añadir un ácido orgánico que por difusión permite acidificar el medio, solubilizando de esta forma los iones calcio. Las sales de calcio más utilizadas son el carbonato de calcio y el fosfato tricálcico, y en casos especiales también se emplean el fosfato dicálcico y el citrato tricálcico. Para acidificar la disolución se utilizan ácidos orgánicos como el acético, adípico y la glucono delta-lactona. Si la sal de calcio es parcialmente soluble (figura 5, interna a).
b) El otro proceso de gelificación interna implica agregar a la mezcla de alginato y sal de calcio un compuesto secuestrante como fosfato, sulfato o citrato de sodio. Este agente secuestrante se une al catión calcio libre, retrasando así la formación de perlas. Se suele emplear el sulfato de sodio debido a su bajo costo y su solubilidad conveniente. (figura 5, interna b). (Helgerud et al., 2010).

La diferencia de la gelificación externa e interna es la rapidez del proceso. Si se desea controlar el paso de sol a gel, en el transcurso de la gelificación externa los factores a controlar son la concentración del ión calcio y la composición del polímero. Por otro lado, para la gelificación interna se considera la solubilidad y la concentración del catión de calcio, la concentración del compuesto secuestrante y la concentración del ácido orgánic. Estos parámetros pueden ajustarse para modular la velocidad y la eficacia del proceso de gelificación, permitiendo así un control más preciso sobre las propiedades finales del gel. (Draget, 2000). Los procesos antes mencionados se visualizan en la figura 5.



Interacción del polímero y el ión calcio, donde (a) gelificación interna (b) gelificación interna con secuestrante.

Figura 5. Tipos de gelificaciones.

2.3.3. Obtención

El alginato se encuentra en mayor proporción como la sal de calcio, la cual es insoluble en agua, y en menor proporción como sales de sodio, potasio, magnesio, estroncio y bario.

Se lleva a cabo un pre tratamiento con formol para eliminar la presencia de fenoles, el cual le proporciona una coloración negruzca indeseado. La reacción química para la conversión del alginato de calcio a ácido algínico en presencia de ácido clorhídrico diluido se puede expresar como sigue:

$$Ca(Alg)_2 + 2H^+ \rightarrow 2HAlg + Ca^{2+}$$

Esta reacción implica la liberación de ácido algínico y cloruro de calcio como productos. El ácido algínico resultante es un polímero ácido carboxílico que puede tener diversas aplicaciones industriales y médicas. Como la transformación no es total, se trata de eliminar la mayor cantidad de calcio sin dañar el alginato. Durante este procedimiento de extracción, se realizan mecanismos de intercambio iónico y neutralización. Esto permite neutralizar el ácido clorhídrico residual y remover el calcio presente en el ácido algínico convertido, garantizando así que el alginato no se vea afectado adversamente. Este procedimiento es crucial para obtener un producto final de alta calidad con un contenido de calcio reducido.

.

$$Ca(Alg)_2 + 2Na^+ \rightarrow 2NaAlg + Ca^{2+} \text{ (Proceso de intercambio iónico)}$$

$$2HAlg + Na_2CO_3 \rightarrow 2NaAlg + H_2O + CO_2 \text{ (Reacción de neutralización)}$$

2.3.3.1. ***Métodos de purificación***

- **Método del alginato de calcio.** La solución de alginato de sodio se agrega la solución de cloruro de calcio, formandose fibras. El catión calcio gelifica las cadenas de alginato, el gel formado es insoluble en agua. Los iones Ca^{2+} son reemplazados por los iones H^+ por adición del ácido clorhídrico diluido, dando lugar al ácido algínico, que es insoluble. El ácido algínico se convierte a alginato de sodio mediante la neutralización con una base fuerte. Las fibras puede ser lavadas metanol, etanol o con el 2-propanol, al ser lavadas precipitan las fibras de alginato de sodio, o pueden ser prensadas a través de una malla con hoyos circulares para formar pellets. Por último, el alginato de sodio es secado en antes de ser pulverizado (Ayarza et al., 2023).

- **Método del ácido algínico**. El ácido algínico se obtiene al añadir ácido clorhídrico diluido, obteniendose un precipitado gelatinoso. El ácido algínico se separa por flotación con inyección de aire. Posterior a ello, se deshidrata mediante compresión o centrifugación, la pasta obtenida se puede transformar a alginato de sodio por el método descrito anteriormente o, por un método alternativo. La transformación se

lleva a cabo con una base fuerte en suspensión con alcohol (metanol, etanol, 2-propanol). Por último, el alginato de sodio es secado y pulverizado (Ayarza et al., 2023).

2.3.4. Mecanismos de liberación

Para crear un sistema eficiente de distribución de medicamentos, es fundamental tener un conocimiento profundo de los procesos de liberación y los aspectos físico-químicos vinculados a la degradación del DDS (Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos), con el propósito de liberar el principio activo encapsulado y facilitar la eliminación completa del polímero.(Uhrich et al., 2010). Un mecanismo de liberación se refiere a la forma en que un compuesto de interés es transportado o liberado (Fredenberg et al., 2011). Algunos de estos mecanismos involucrados se observan en la figura 6 e incluye la hidrolisis del fármaco, la propagación del medicamento por los poros, su difusión dentro de la matriz polimérica, la hidrólisis del polímero, la descomposición del polímero, el bombeo osmótico en la matriz, y las interacciones entre polímeros son aspectos clave a considerar, entre otros (Avgoustakis, 2008; Peppas, 1983). Estos mecanismos de liberación están influenciados por numerosos factores, tales como:

- Peso molecular y la relación de los monómeros del polímero.
- Las interacciones que se presentan entre la matriz y el compuesto microencapsulado: puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas o de Van de Waals (Xu et al., 2019).
- Las características del principio activo como la polaridad, concentración, presencia de ligandos, (Patra et al., 2018).
- Las condiciones del proceso de microencapsulación como el tratamiento con solventes, el pH y la temperatura en los que se realiza la obtención de perlas (Figura 6) (Hines & Kaplan, 2013).

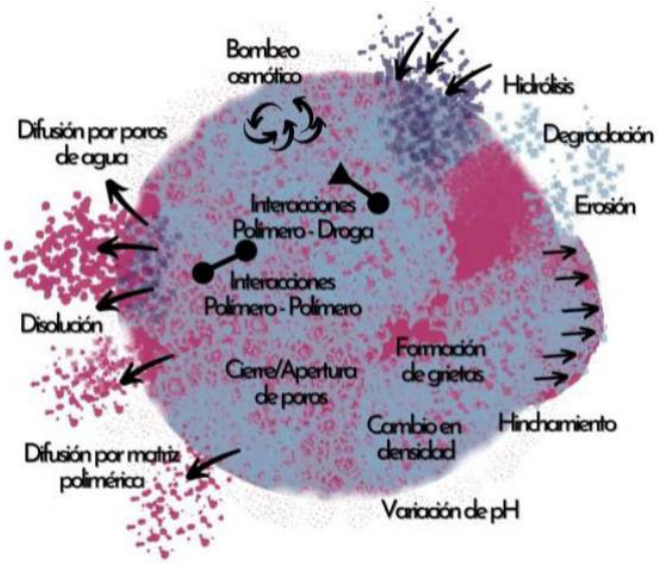


Figura 6. Parámetros involucrados durante la liberación de fármacos.

2.3.5. Cinética de disolución

Para garantizar la equiparación *in vitro* entre diversas formas farmacéuticas, las principales farmacopeas subrayan que el examen más crucial es la velocidad de disolución. Para una comprensión adecuada de este examen, es esencial complementarlo con conocimientos fisicoquímicos tanto del fármaco como de la forma farmacéutica.

Por lo general, la interpretación cuantitativa de los resultados obtenidos durante el ensayo de disolución se facilita mediante el uso de ecuaciones matemáticas genéricas, las cuales permiten generar la curva de disolución en función de ciertos parámetros específicos. En ocasiones, estas ecuaciones se derivan a través de análisis teóricos. Dependiendo del tipo de principio activo, su polimorfismo, el grado de cristalinidad, el tamaño de partícula, su solubilidad y otras variables, pueden producirse modificaciones en la farmacocinética y, por consiguiente, en la farmacodinámica (Redondo L. 2015).

2.3.6. Cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente

Los sistemas de liberación paulatina nacen por la necesidad de mantener una concentración adecuada del agente bioactivo en un lugar específico del organismo donde se va a aplicar. Estos sistemas permiten administrar los fármacos de manera más precisa y controlada, lo que puede mejorar la eficacia terapéutica y reducir los efectos secundarios. Al liberar gradualmente el fármaco durante un período de tiempo prolongado, los sistemas de liberación controlada pueden mantener niveles terapéuticos

constantes en el sitio de acción, lo que resulta en una mejoría en el tratamiento de diversas condiciones médicas. (Setapa et al., 2020). Este enfoque ayuda a reducir la toxicidad del compuesto activo al evitar los efectos secundarios derivados de administraciones extremas y repetidas (Uhrich et al., 2010), al mismo tiempo que mejora la eficacia de los agentes terapéuticos con corta vida media biológica o administración ineficaz (Ford Versypt et al., 2013).

El método de liberación controlada de agentes bioactivos desde matrices poliméricas biodegradables ha generado un gran interés porque no necesita una extracción quirúrgica posterior (Chasin & Langer, 1991), y además es metabolizado por el cuerpo sin causar problemas de biocompatibilidad (Darwish & Bayoumi, 2020).

Esta técnica no se limita exclusivamente al área médica (Lagreca et al., 2020), otros campos de investigación como la agricultura (Pereira et al., 2019), la industria alimenticia (Zhu et al., 2019), la industria cosmética (Ito et al., 2013) y productos del hogar también han hallado aplicaciones prácticas en su implementación (Hines & Kaplan, 2013)

2.3.7. Modelos matemáticos de la cinética de liberación

2.3.7.1. ***Cinética de Wagner***

La cinética de primer orden se puede aplicar en la farmacocinética, aunque es difícil conceptualizar este mecanismo únicamente en términos teóricos, su aplicación práctica es ampliamente aceptada en la farmacocinética para describir la eliminación de muchos fármacos del organismo.

La disolución de una microcápsula en el seno de un líquido involucra la acción en la superficie de la microcápsula, como se explica en la teoría de disolución de Noyes-Whitney, según esta teoría el fenómeno de disolución se describe con la siguiente ecuación matemática:

$$\frac{dC}{dt} = K(C_S - C)$$

Brunner modifica la ecuación anterior obteniéndose la siguiente expresión matemática:

$$\frac{dC}{dt} = k_1 S(C_S - C_t)$$

Donde el valor de la constante k_1 se relaciona con la primera ley de Fick, de acuerdo a la siguiente expresión matemática:

$$k_1 = \frac{D}{Vh}$$

Donde:

D: coeficiente de difusión

V: volumen de la disolución

h: espesor de la capa de difusión.

Tras el cambio llevada a cabo por Hixson – crowell, que al multiplicar la ecuación de Noyes – Whitney por el volumen, se obtiene:

$$V(\frac{dC}{dt}) = V[k_1 S(C_S - C_t)]$$

Sabemos que V*C=W, entonces al derivar la concentración y la masa con respecto al tiempo, se tiene $V\left(\frac{dC}{dt}\right) = \frac{dW}{dt}$, y se sabe que:

$$\frac{dW}{dt} = k_1 S(VC_S - W)$$

Según el postulado sabemos que $K = k_1 S$, de aquí que $k_1 = \frac{K}{S}$, pero a partir de la ley de Fick sabemos que $k_1 = \frac{D}{Vh}$, por lo que se obtiene la siguiente relación matemática:

$$\frac{D}{Vh} = \frac{K}{S}$$

Finalmente, se obtiene: $K = \frac{DS}{Vh}$

Entonces la expresión matemática anterior se reemplaza en la siguiente ecuación.

$$\frac{dW}{dt} = k_1 S(VC_S - W)$$

$$\frac{dW}{dt} = K(VC_S - W)$$

$$\frac{dW}{dt} = \frac{DS}{Vh}(VC_S - W)$$

Y como al inicio, la relación principal de $K = \frac{D}{h}$, entonces se obtiene:

$$\frac{dW}{dt} = \frac{KS}{V}(VC_S - W)$$

Conociendo que S y V son constantes, puede considerarse en una nueva constante *k*, simplificándose la ecuación a:

$$\frac{dW}{dt} = k(VC_S - W)$$

Reordenando se obtiene:

$$dW = k(VC_S - W)dt$$

$$\frac{dW}{VC_S - W} = kdt$$

Integrando

$$\int_0^W \frac{dW}{VC_S - W} = \int_0^t kdt$$

$$\ln(VC_S - W) - Ln(VC_S - W_0) = -kt + kt_0$$

Considerando que $W_0 = 0$ y que $t_0 = 0$, entonces la ecuación se reduce a:

$$\ln(VC_S - W) - Ln(VC_S) = -kt$$

$$\ln(VC_S - W) = Ln(VC_S) - kt$$

Se requiere establecer que $VC_S = W_\infty$, donde W_∞ es la cantidad del principio activo microencapsulado libre a disolverse y no la cantidad hidrolizada (Gonzáles et al., 2002). Por tanto es válido reescribir de forma resumida:

$$\ln(W_\infty - W) = Ln(W_\infty) - kt$$

Donde $W_\infty - W$ representa la cantidad intacta del fármaco. Esta ecuación también se puede representar como:

$$W = W_\infty(1 - e^{-kt})$$

En los perfiles de disolución, se puede reemplazar la masa (W) por la cantidad de masa (Q), entonces, las dos ecuaciones anteriores quedan expresadas como:

$$\ln(Q_\infty - Q_t) = \ln Q_\infty - kt \quad \text{o} \quad Q = Q_\infty(1 - e^{-kt})$$

La ecuación anterior se puede representar mediante una ecuación lineal. El perfil de disolución se puede visualizar en la figura 7 (Vásquez et al., 2021).

$$\boldsymbol{Cinética\ de\ Wagner}$$

$$\boldsymbol{ln\%ND = -kt + ln\%ND_0}$$

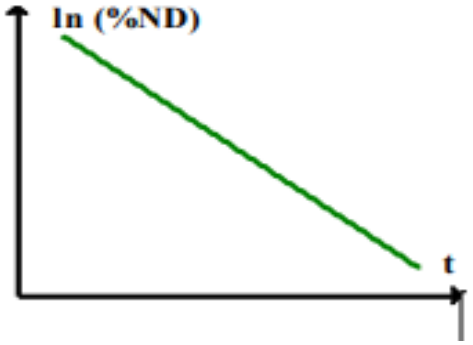


Figura 7.- Cinética de disolución de Wagner, ln(%ND) vs tiempo.

2.3.7.2. ***Ley de potencia***

Bajo el principio de esta ley, la relación de la rapidez con la que se solubiliza el fármaco y el tiempo es igual a:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Donde:

k: Constante que incluye características estructurales y geométricas del mecanismo.

n: Representa al exponente de liberación, el valor que toma, define el tipo de mecanismo de liberación que sigue. En esta ecuación, se combina la difusión del fármaco según la ley de Fick con el proceso de hinchamiento del gel, que implica la transición del estado semirrígido al estado más flexible, conocido como "transporte-caso II". Se considera tanto la difusión del fármaco como la relajación del gel como determinantes de la liberación del fármaco. A continuación, se describen los valores que puede adquirir *n*. (Vásquez et al., 2021)

- Cuando n=1, la ecuación representa una cinética de liberación de orden cero. En este caso, se describe un proceso de "hinchamiento controlado" en la liberación del fármaco. El mecanismo predominante en este tipo de formulación es el correspondiente al caso II de transporte en polímeros. Este mecanismo implica que la relajación de la matriz ocurre cuando el agua se absorbe en el polímero, siendo este proceso el que determina la velocidad de liberación. En este contexto, el agua actúa como plastificante, disminuyendo la temperatura de transición vítrea Tg. Cuando la transición vítrea Tg alcanza la temperatura del sistema de liberación, las cadenas de polímero pasan de un estado cristalino a uno más flexible, lo que resulta en un aumento del volumen del gel (volumen de expansión) y una mayor movilidad del gel.
- Cuando n = 0,5 implica que el mecanismo de liberación es mediante la difusión.
- Cuando, 0,5 < n < 1, existen dos mecanismos y que el fenómeno de transporte es anómalo. Los valores que toma n, son para microcápsulas del tipo film o pastillas. Para las microcápsulas con formas de esferas o cilíndricas, los valores de n toman diferentes valores. Los valores de n se especifican en las tablas 1y 2 (Andreetta, 2003).

Tabla 1. Valores que adopta **n**, durante la liberación de microcápsulas hinchables.

n película delgada	***n*** muestra cilíndrica	***n*** muestra esférica	Mecanismo de liberación
0.5	0.45	0.43	Difusión de Fick
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Difusión no Fickiana
1.0	0.89	0.85	Caso II

Tabla 2. Valores que adopta **n**, durante la liberación de microcápsulas no hinchables.

n película delgada	***n*** muestra cilíndrica	***n*** muestra esférica	Mecanismo de liberación
0.5	0.45	0.43	Difusión de Fick
$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 1.0$	$0.43 < n < 1.0$	Difusión no Fickiana
1.0	1.0	1.0	Orden cero

2.3.7.3. ***Cinética de Higuchi***

La cinética esta descrito por la siguiente ecuación:

$$Q = \sqrt{D(2C - C_S)C_S t}$$

Esta ecuación se determinó a partir de las observaciones de la hidrolisis de sistemas planares con una matriz uniforme, donde:

Q: Cantidad de fármaco liberado en un tiempo t

C: Concentración inicial

$\boldsymbol{C_S}$: Concentración del fármaco solubilizado transcurrido un tiempo t.

D: Coeficiente de difusión

La ecuación desarrollada por Higuchi es fundamental para la disolución de fármacos en forma de coloides, que es la base de los ungüentos. Sin embargo, la ecuación también es aplicable a otros tipos de formas farmacéuticas y es consistente con diversos perfiles de liberación que pueden ocurrir después de la aplicación del sistema farmacéutico. Esto significa que la ecuación de Higuchi puede ser utilizada como un modelo general para predecir la cinética de liberación de fármacos en una variedad de formulaciones farmacéuticas, lo que facilita la comprensión y el diseño de sistemas de administración

de fármacos eficaces y seguros.

La línea sólida representa el cambio de la concentración durante la disolución, tras un tiempo t, desde la capa de la matriz hasta el área de liberación, donde el fármaco se difunde dinamicamente (condiciones de sumidero). Se espera que la concentración del fármaco muestre una disminución a una distancia h, y no se producirá la solubilidad del fármaco hasta que la concentración caiga por debajo de la solubilidad del fármaco en la matriz (C_S). Para distancias mayores a h, la gradiente de concentración se mantiene constante, siempre y cuando $C \gg C_S$. La linealidad de la gradiente sobre esta distancia corresponde a la primera ley de Fick. En un tiempo t, la cantidad de fármaco solubilizado por el sistema corresponde al área sombreada en la figura 8.

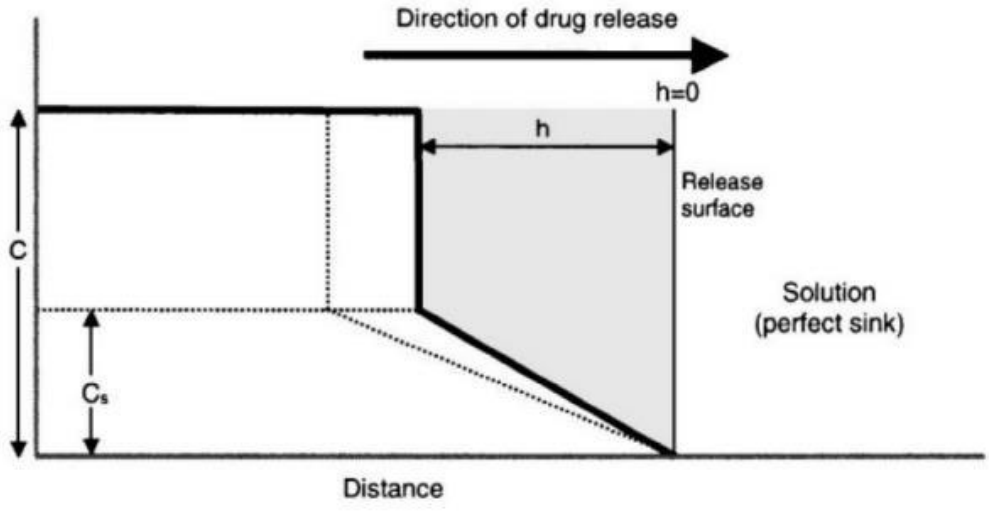


Figura 8. Disolución de un soluto en el seno de una disolución. Concentración vs distancia.

$$dQ = \left(C - \frac{1}{2}C_S\right)dh$$

$$dQ = Cdh - \frac{1}{2}C_S dh$$

De acuerdo a la primera ley de Fick, sabemos que $\frac{dQ}{dt} = \frac{DC_S}{h}$ con lo cual se obtiene:

$$\frac{DC_S}{h} = \frac{\left(C - \frac{1}{2}C_S\right)dh}{dt}$$

Reordenando:

$$\frac{h(2C - C_S)dh}{2DC_S} = dt$$

Integrando la ecuación diferencial, obtenemos:

$$\int \frac{h(2C - C_S)dh}{2DC_S} = \int dt$$

$$\frac{(2C - C_S)}{2DC_S} \int hdh = \int dt$$

$$\frac{(2C - C_S)}{2DC_S} \left(\frac{h^2}{2}\right) = t$$

$$t = \frac{h^2}{4DC_S}(2C - C_S) + k'$$

Donde k' es una constante de integración que toma el valor de cero, cuando el valor de *t* es cero, obteniéndose la siguiente expresión matemática*:*

$$t = \frac{h^2}{4DC_S}(2C - C_S)$$

$$\frac{t(4DC_S)}{2C - C_S} = h^2$$

$$h = \sqrt{\frac{t(4DC_S)}{2C - C_S}}$$

$$h = 2\sqrt{\frac{t(DC_S)}{2C - C_S}}$$

Recordando que $Q = h(C - C_S)$, entonces $h = \frac{Q}{C - C_S}$, sustituyendo esta igualdad en nuestra ecuación.

$$\frac{Q}{C - C_S} = 2\sqrt{\frac{t(DC_S)}{2C - C_S}}$$

$$Q = \left[2\sqrt{\frac{t(DC_S)}{2C - C_S}}\right][C - C_S]$$

$$Q = \sqrt{tDC_S(2C - C_S)}$$

La relación descrita es válida durante todo el proceso, excepto cuando se alcanza la disolución total del fármaco en el sistema. Cuando se trata de la liberación de fármacos

de formas esféricas homogéneas y planares, o solo esféricas, implica una matriz granular heterogénea. Al estudiar la solubilidad de una matriz plana heterogénea, donde la concentración del fármaco en la matriz es menor que su solubilidad y la liberación ocurre a través de poros en la matriz, en este caso, se obtiene la siguiente relación:

:

$$Q = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\tau}(2C - \varepsilon C_S)C_S t}$$

Donde:

Q: Fármaco liberado por unidad de área en el tiempo *t.*

C: concentración inicial del fármaco.

ε: Porosidad de la matriz.

τ: Factor de tortuosidad del sistema capilar.

C_S: Concentración del fármaco solubilizado.

D: constante de difusión.

Estos modelos suponen que los sistemas no tienen un recubrimiento superficial y que las matrices no experimentan cambios significativos en presencia de agua.

Finalmente, el modelo de Higuchi se expresa como:

$$Q = K_H t^{1/2}$$

Donde:

K_H: Constante de disolución de Higuchi.

La constante de Higuchi ha sido validada repetidamente por investigadores en diversas teorías y mediante diferentes métodos. Esta expresión matemática describe la solubilidad del fármaco basado en la Ley de Fick, que es dependiente de la raíz cuadrada del tiempo. Este modelo se aplica para describir la solubilidad del fármaco desde varios tipos de formas farmacéuticas de liberación modificada, como por ejemplo las tabletas de matriz con fármaco soluble en agua. (Vásquez et al., 2021). La gráfica que describe el perfil de disolución de Higuchi es de una función cuadrática (figura 9).

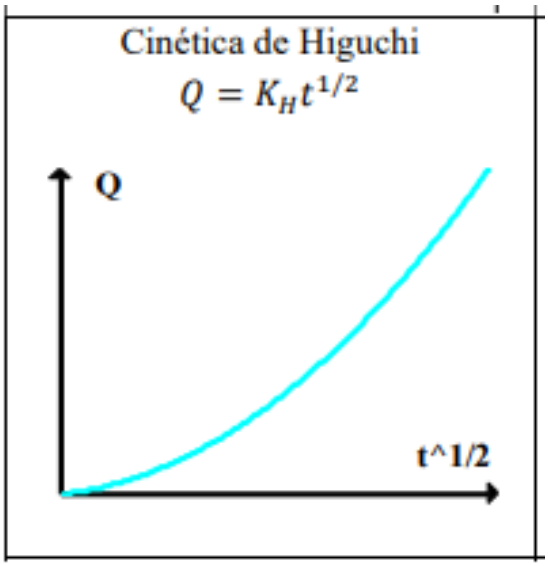


Figura 9. Cinética de disolución, Q vs $t^{1/2}$

2.3.7.4. ***Cinética de orden cero***

La liberación de formas farmacéuticas que no se desintegran y desligan el fármaco lentamente (teniendo en cuenta que el área es constante y que no alcanza el equilibrio) puede ser representada de la siguiente manera:

$$W_0 - W_t = kt$$

$$f_t = 1 - \frac{W_t}{W_0}$$

Donde:

W_0: Cantidad inicial del fármaco en la forma farmacéutica.

W_t: Cantidad de fármaco en la forma farmacéutica en un tiempo.

t: tiempo.

k: constante de proporcionalidad o constante de velocidad de la cinética de orden cero.

f_t: fracción del fármaco disuelta.

Al simplificar de esta manera, el perfil de liberación de la cantidad disuelta del fármaco frente al tiempo será lineal si se cumplen las condiciones establecidas. Esta relación puede ser utilizada para explicar la solubilidad de fármacos en diferentes tipos de formas farmacéuticas, como sistemas transdérmicos, comprimidos con fármacos poco solubles, tabletas recubiertas, sistemas osmóticos, etc. Para estas formas farmacéuticas que describen este perfil de liberación, liberando la misma cantidad de fármaco por unidad

de tiempo, se explica bajo la cinética de orden cero el cual es ideal para lograr una acción farmacológica prolongada. La representación matemática simple de este modelo se puede expresar como

$$Q_t = Q_0 + kt$$

Donde:

Q_t: cantidad de fármaco disuelto en el tiempo *t,*

Q_0: cantidad inicial del fármaco en la solución, en la mayoría de casos $Q_0 = 0$

k : constante de velocidad de la cinética de orden cero (Vásquez et al., 2021).

El perfil de liberación describe una ecuación lineal (figura 10) (Vásquez et al., 2021).

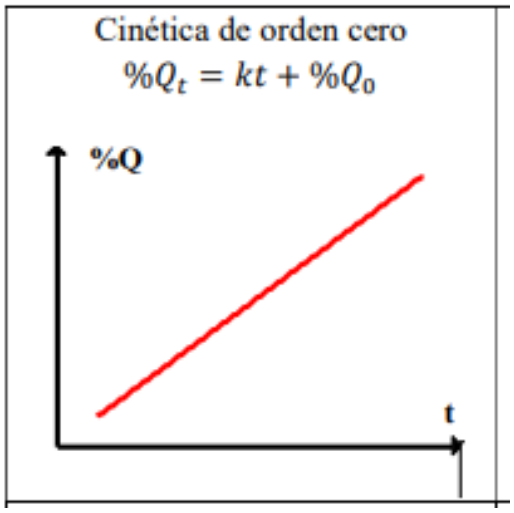


Figura 10. Cinética de disolución, %Q vs tiempo.

*2.3.7.5. **Cinética de primer orden***

Según la ley de acción de masas la velocidad de reacción de cualquier reacción monomolecular es la siguiente:

$$A \rightarrow Productos$$

En cualquier instante el tiempo (*t)* debe ser proporcional a la concentración de ***A,*** $(\boldsymbol{C_A})$ presente en ese momento, es decir:

$$-\frac{dC_A}{dt} = k_1 C_A \qquad (2)$$

El factor de proporcionalidad k_1 se denomina constante de velocidad específica de la reacción de primer orden. Las unidades de k_1 se derivan de la siguiente expresión $k_1 = \left(-\frac{1}{C_A}\right)\left(\frac{dC_A}{dt}\right)$, que es recíproco del tiempo, esto es, la frecuencia. Exactamente, en una reacción de primer orden, la constante de velocidad k_1 es una constante característica de la reacción y es independiente de la concentración de los reactivos. Esta constante

depende únicamente de la temperatura y de la naturaleza específica de la reacción química. (Prutto, M. 2002)

Para realizar la integración es recomendable modificar, para lo cual se designa por *a,* la concentración inicial de A, y por *x* el decremento de A durante el tiempo *t*, entonces $C_A = a - x$ en el instante *t*.

$$\frac{-dC_A}{dt} = \frac{-d(a-x)}{dt} * \frac{dx}{dt}$$

Reemplazando en la ecuación 2, se obtiene:

$$\frac{dx}{dt} = k_1(a-x)$$

obteniendose la velocidad de una reacción de primer orden. El cual está en función de la concentración inicial y de la cantidad de compueto que ha reaccionado. Al integrar la ecuación anterior, teniendo en cuenta que al inicio de la reacción *t=0 y x=0,* y que después de un tiempo *t,* $x = x_1$, resulta.

$$\int_0^x \frac{dx}{a-x} = \int_0^t k_1 dt$$

Resolviendo la integral, obtenemos:

$$\ln\left(\frac{a}{a-x}\right) = k_1 t$$

La ecuación mencionada es característica de una reacción de primer orden. Para determinar si una partícula sigue esta ley de velocidad, se pueden realizar experimentos donde se miden las concentraciones del reactivo en diferentes momentos. Si los datos experimentales siguen la ley de velocidad de primer orden, los valores de la constante de velocidad k_1 deberían ser constantes dentro del margen de error experimental. pero, si estos valores muestran un incremento significativo, indicaría que la reacción no es de primer orden y se requeriría probar otros modelos cinéticos para ajustarse a los datos observados. (Prutto, M. 2002).

La gráfica de esta ecuación se puede comprobar. Reordenándola, resulta.

$$\ln(a-x) = -k_1 t + lna$$

Existe el método de vida media, el cual es otra técnica para investigar si una reacción sigue una cinética de primer orden. Se utiliza para determinar el tiempo necesario para que una fracción definida de reactivo se descomponga, generalmente la mitad (*a/2*). Cuando la mitad del reactivo se ha descompuesto (*(a – x)=a/2,* el tiempo que se requiere

para alcanzar este punto, $t_{1/2}$, se calcula utilizando la siguiente ecuación matemática.

$$t_{1/2} = \frac{1}{k_1} \ln(\frac{a}{\frac{a}{2}})$$

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k_1}$$

La grafica que describe es una ecuación lineal de pendiente negativa (figura 11) Prutto, M. (2002.

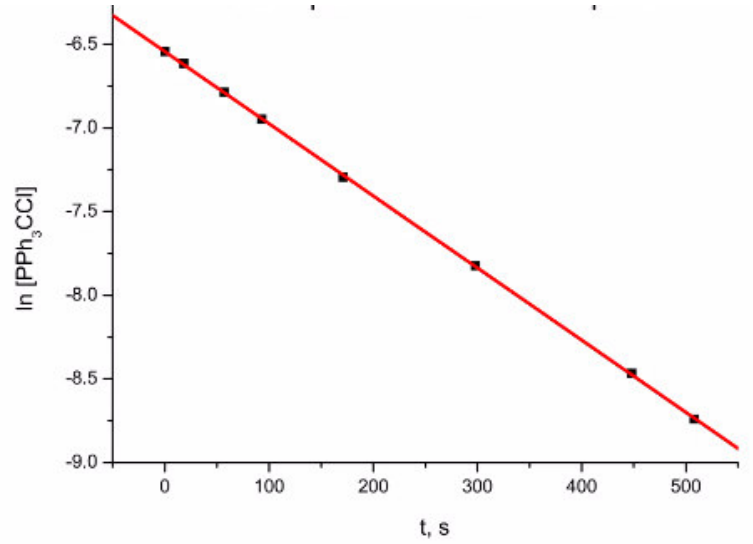


Figura 11. ln[concentración] vs tiempo, para el modelo matemático de primer orden

La ecuación deriva de la combinación de la ecuación de Noyes-Whitney, la modificación de Brunner, y su adaptación por parte de Hixson y Crowell, es utilizada para explicar la absorción y/o eliminación de algunos fármacos, tal como se muestra.

$$\frac{dW}{dt} = kS(C_S - C)$$

$$\frac{dW}{dt} = \frac{kS}{V}(VC_S - W)$$

$$\frac{dW}{dt} = k'(VC_S - W)$$

Donde:

C: Es la concentración del soluto a tiempo t.

Cs: Es la solubilidad en el equilibrio en la temperatura ensayada.

W: Es la cantidad de soluto en disolución a tiempo t.

dW/dt: Es la velocidad de cesión del soluto al medio a tiempo t.

V: Es el volumen.

k: Es una constante de proporcionalidad de primer orden o constante de velocidad de

cesión del soluto al medio.

Integrando se obtiene:

$$W = VC_S(1 - e^{-kt})$$

Aplicando logaritmo neperiano la expresión queda de la siguiente manera:

$$ln(VC_S - W) = lnVC_S - kt$$

Se puede expresar también en función del fármaco presente en la disolución:

$$Q = Q_0.e^{-kt}$$

$$ln\frac{Q}{Q_0} = kt$$

$$lnQ = lnQ_0 + kt$$

Donde:

Q: Es la cantidad de fármaco liberada en el tiempo *t.*

Q_0: Es la cantidad inicial de fármaco en la disolución.

*k: E*s la constante de primer orden que regula el proceso.

Este modelo describe el comportamiento de fármacos solubles en soluciones acuosas, en las que la hidrolisis es proporcional a la cantidad de principio activo remanente en su interior (figura 12) (Vásquez et al., 2021).

$$\boldsymbol{Cinética\ de\ primer\ orden}$$

$$\boldsymbol{ln\%Q_t = kt + ln\%Q_0}$$

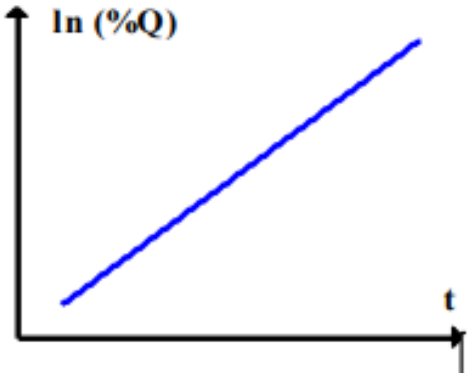


Figura 12. Cinética de disolución de primer orden

2.3.7.6. ***Cinética de Hixson – Crowell***

La cinética de Hixson-Crowell es un modelo que describe la disolución o liberación de un fármaco a partir de una matriz sólida en la que la superficie de la partícula disminuye con el tiempo debido a la disolución o erosión del material. Este modelo supone que la velocidad de liberación de fármaco es proporcional al área superficial restante de la

partícula, lo que implica que la liberación disminuye con el tiempo a medida que la partícula se disuelve o se erosiona. Tomando en cuenta que las microcápsulas poseen un área regular el cual es proporcional a la raíz cúbica de su volumen, el cual se expresa de la siguiente forma:

$$\sqrt[3]{W_0} - \sqrt[3]{W_t} = K_s t$$

Donde:

W_0 : Cantidad inicial del fármaco

W_t : Cantidad remanente del fármaco

t: tiempo

k_s : Constante que incorpora la relación superficie-volumen.

La ecuación descrita es lineal (figura 13). El modelo de Hixson-Crowell es especialmente útil para explicar la solubilidad de fármacos desde formas farmacéuticas sólidas como comprimidos. Se basa en la suposición de que la velocidad de liberación está determinada por la velocidad de disolución de las partículas y no por la difusión a través de la matriz polimérica. Este modelo es aplicable cuando las dimensiones del comprimido disminuyen de manera proporcional durante la disolución, lo que implica que la liberación se ve limitada por la velocidad de disolución de las partículas. (Vásquez et al., 2021).

Gráfico de la cinética de disolución de Hixon – Crowell.

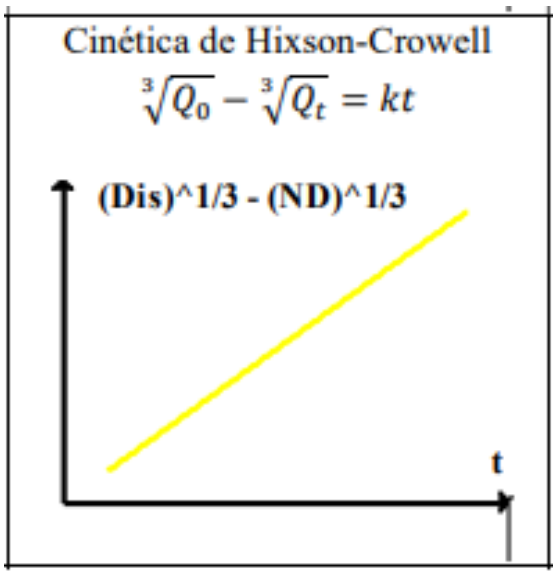


Figura 13. Cinética de disolución de Hixon – Crowell.

2.3.8. Brothops pictus (jergón de la costa)

Las serpientes del género *Bothrops* habitan una extensa región de América y en el Perú existen hasta 17 especies. *Bothrops pictus,* denominado como "jergón de costa", es una serpiente endémica del Perú, que tiene su hábitat en la costa central desde el nivel del mar hasta los 2,300 m. Su distribución geográfica abarca la vertiente occidental de los Andes, desde Majes, departamento de Arequipa, hasta el río Moche, departamento de La Libertad. La situación que enfrenta *Bothrops pictus*, es preocupante debido a la pérdida de su hábitat natural y a la presión ejercida por la creciente población humana en su zona de distribución. Esta serpiente endémica del Perú se encuentra en peligro de extinción debido a la degradación de su hábitat.

La jergón de Costa *(B. pictus)*, fue estudiado por el naturalista suizo Johann Jakob von Tschudi en 1845 y el nombre deriva del término en latín “pictus”, el cual se refiere a la forma de las manchas que presenta en el plano dorsal (Campbell y Lamar, 1989, 2004). Los estudios acerca del jergón de la costa *(B. pictus)* están orientadas hacia la investigación del veneno como la toxicidad, neutralización y efectos biológicos (Olascoaga, 1987; Mesía, 1996; Mesía et al., 2011). Un ejemplar del jergón de la costa se muestra en la figura 14.



Figura 14. Ejemplar de *B. pictus* (Serpentario Oswaldo Meneses).

Los estudios realizados sobre la ponzoña de la serpiente Bothrops pictus han revelado que su mordedura produce el típico cuadro clínico de una mordedura de serpiente botrópica.

Esto incluye dolor y edema en el sitio de la mordedura. Los síntomas observados en los pacientes afectados incluyen un aumento del volumen local en un 95.7%, eritema en un 87%, equimosis en un 47.8%, impotencia funcional en un 43.5%, formación de ampollas en un 21.7%, necrosis leve en un 13%, inflamación de los ganglios linfáticos en un 8.7%, y cianosis distal en un 4.3%.

Para el tratamiento de las mordeduras de Bothrops pictus, se utilizó suero antibotrópico polivalente en el 69.9% de los casos. Este suero se administró principalmente por vía endovenosa en el 75% de los casos y por vía intramuscular en el 63%. Estos hallazgos son importantes para comprender y abordar adecuadamente las mordeduras de esta especie de serpiente y mejorar los protocolos de tratamiento. (Camacho et. al, 1998)

2.3.8.1. ***Caracterización del extracto crudo del veneno de la serpiente "Bothrops pictus"***

2.3.8.1.1. **Determinación de enzimas del extracto crudo de veneno de serpiente.**

Se ha determinado que El veneno de serpiente contiene varias enzimas importantes, entre las que se incluyen la hialuronidasa, la L-aminoácido oxidasa, la fosfolipasa A2 y enzimas proteolíticas. Estas enzimas desempeñan diferentes funciones en el veneno y pueden contribuir a los efectos tóxicos observados en las mordeduras de serpiente. Se ha determinado la capacidad del antiveneno botrópico (INS-Perú) para inhibir estas enzimas, lo que es crucial para determinar su eficacia en el tratamiento de las mordeduras de serpiente. La capacidad del antiveneno para neutralizar estas enzimas puede ayudar a prevenir o reducir los efectos tóxicos del veneno y mejorar la recuperación de los pacientes afectados.

Yarlequé Mirtha y colaboradores llevaron a cabo un estudio comparativo de varias serpientes provenientes de varios países y variedades, entre ellos el *Bothrops pictus,* determinando el contenido de proteínas y las siguientes enzimas como: Nucleasa, Proteasa, Amilasa y su capacidad coagulante. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 3, 4 y 5, respectivamente (Yarlequé et. al, 2012).

Tabla 3. Contenido de proteínas en el extracto crudo de veneno de serpiente B. pictus.

veneno	**Contenido proteico (µg/µL) en una solución de veneno de 1 mg/mL**		
	Abs. 280 nm	Met. Lowry	Met. Bradford
Bothrops pictus	1,25	0,66	0,69

Tabla 4. Actividad enzimática del extracto crudo de veneno de serpiente B. pictus

veneno	**Actividad específica (U/mg)**		
	5' nucleotidasa	Proteolítica	Amidolítica (10^{-3})
Bothrops pictus	9,5±0,3	8,42±0,4	13,4±6,9

Tabla 5. Actividad coagulante del extracto crudo de veneno de serpiente B. pictus

veneno	**Actividad específica (U/mg)**			**Potencia coagulante (NIHU/mg)**
	Plasma humano	Fibrinógeno humano	Fibrinógeno bovino	
Bothrops pictus	0,1	0,05	0,05	**NP**

La figura 15 y 16 muestra la estructura de 2 enzimas presentes en mayor porcentaje en el extracto crudo de veneno de serpiente.

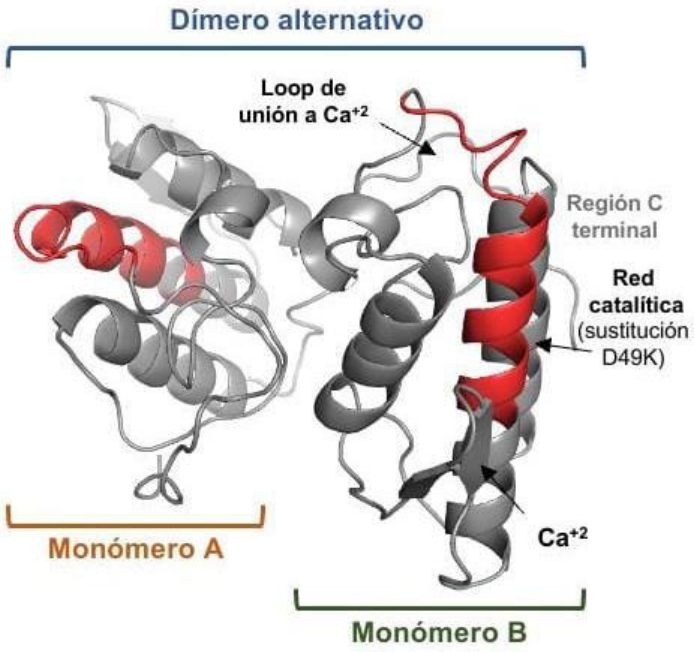


Figura 15. Estructura de la Fosfolipasa A2

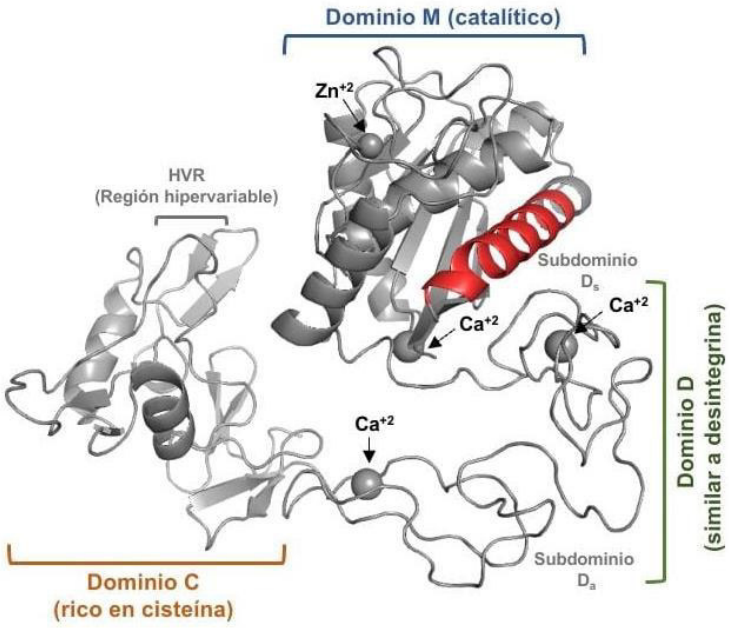


Figura 16. Estructura de la metaloproteinasa tipo 3

2.4. *Peso Molecular del extracto crudo de veneno de serpiente.*

La dosis hemorrágica mínima (DHM), determina el contenido mínimo de proteína del veneno que causa un área hemorrágica estándar de 10 mm de diámetro. Esta medida es importante para comprender la potencia hemorrágica del veneno y su capacidad para causar daño en el cuerpo.

La purificación del veneno de serpiente se lleva a cabo, a través de los siguientes pasos:

- El veneno se disuelve en un tampón de acetato de amonio 0,1 M a pH 5.
- Se aplica a una columna de filtración molecular, como Sephadex G-75, utilizando el mismo tampón como fase móvil. Esto separará las proteínas del veneno según su tamaño molecular.
- Las fracciones que muestran actividad proteolítica se recogen y luego se aplican a una columna de intercambio aniónico, como DEAE Sephadex A-50, equilibrada con el mismo tampón. Se eluyen utilizando un gradiente de NaCl para separar las proteínas cargadas negativamente.
- La fracción obtenida se analiza para determinar su actividad proteolítica sobre la caseína y su capacidad hemorrágica.

Este proceso de purificación y caracterización permite identificar y estudiar las proteínas específicas presentes en el veneno de Bothrops pictus que son responsables de su actividad proteolítica y hemorrágica.

Los resultados del análisis de la actividad proteolítica y hemorrágica del veneno de *Bothrops pictus* y la acción de las proteínas presentes fueron:

1. **Actividad sobre Caseína:** Se encontró una actividad de 74,1 Unidades por miligramo (U/mg) de proteína. Esto indica la capacidad del veneno para hidrolizar la caseína, una proteína presente en la leche.
2. **Actividad sobre Gelatina:** Se observó una banda de digestión de 62 kDa en geles de poliacrilamida, que coincide con el peso de la enzima purificada. Esto sugiere que la enzima responsable de la actividad proteolítica posee un peso molecular de 62 kDa y puede hidrolizar la gelatina, una proteína estructural.
3. **Actividad Hemorrágica:** Se estimó que la cantidad de veneno necesaria para causar una Dosis Hemorrágica Mínima (DHM) fue de 0,226 µg. Este valor es 2,4

veces mayor que la DHM del veneno total. La DHM es una medida de la potencia hemorrágica del veneno y su capacidad para inducir hemorragias locales.

En resumen, estos resultados sugieren que las proteínas presentes en el veneno de Bothrops pictus tienen una fuerte actividad proteolítica, como se evidencia por su capacidad para hidrolizar tanto caseína como gelatina. Además, el veneno muestra una significativa actividad hemorrágica, lo que podría contribuir a los efectos locales observados en las víctimas de mordeduras de esta serpiente. (Figura 17) (Bellido et. al,. 2016)

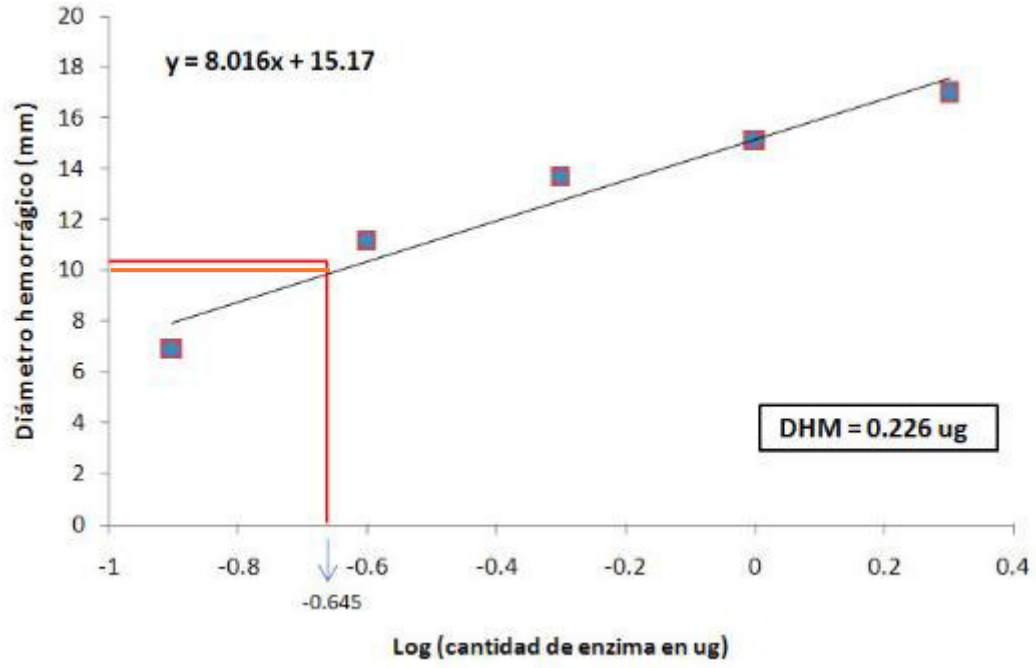


Figura 17. Dosis hemorrágica mínima (DHM) de la metaloproteasa hemorrágica aislada de *B. pictus* por PAGE-SDS en condiciones no reductoras.

Siendo las serpientes un eslabón importante dentro de la cadena biológica y considerando que cada tipo de veneno es potencialmente un complejo proteico con características propias, se llegó a purificar uno de los componentes más importantes de la ponzoña de *B. pictus* que está relacionado con los severos daños al sistema circulatorio, tal como es la enzima similar a la trombina (EST) (Mesías Guevara et. al, 2011)

III. CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. *Encapsulamiento el extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictus por el método de extrusión con diferentes concentraciones del alginato de sodio.*

El microencapsulamiento del extracto crudo de veneno de serpiente se realizó mediante el método de extrusión, como agente encapsulante se usó diferentes concentraciones de alginato de sodio y como agente entrecruzante cloruro de calcio (1.0 M).

3.2. *Elaboración de la curva patrón*

Este ensayo está basado en la absorbancia producida por el cambio de tonalidad del colorante azul de Coomassie G-250, la estructura de la molécula (Figura 18) presenta dos grupos de aminas terciarias que presentan resonancia, capaces a protonarse. La forma catiónica del azul de Coomassie G-250 es de color roja, debido a la forma doblemente protonada, la forma neutra del azul de Coomassie G-250 es de color verde, corresponde a la forma simple protonada, mientras la forma aniónica, corresponde a la forma desprotonada, la carga negativa es debido al grupo sulfónico, el cual es azul y la absorción es de aproximadamente 595 nm. La unión del tinte requiere una forma macromolecular con ciertos grupos funcionales reactivos. Las interacciones se producen principalmente con arginina más que con grupos amino primarios; los demás residuos básicos (His, Lys) y aromáticos (Try, Tyr y Phe) dan respuestas leves. El comportamiento de unión se atribuye a las fuerzas de Van der Waals y a las interacciones hidrofóbicas (Steve J. et. al,. 1985)

En la preparación del colorante Azul de Coomassie se preparó de la siguiente manera:

- Disolver 10 mg de azul de Coomassie G 250, agregar 5.0 mL de etanol absoluto y 10 mL de ácido fosfórico al 85%. Aforar a un volumen de 100mL con agua desionizada.
- Filtrar la disolución.

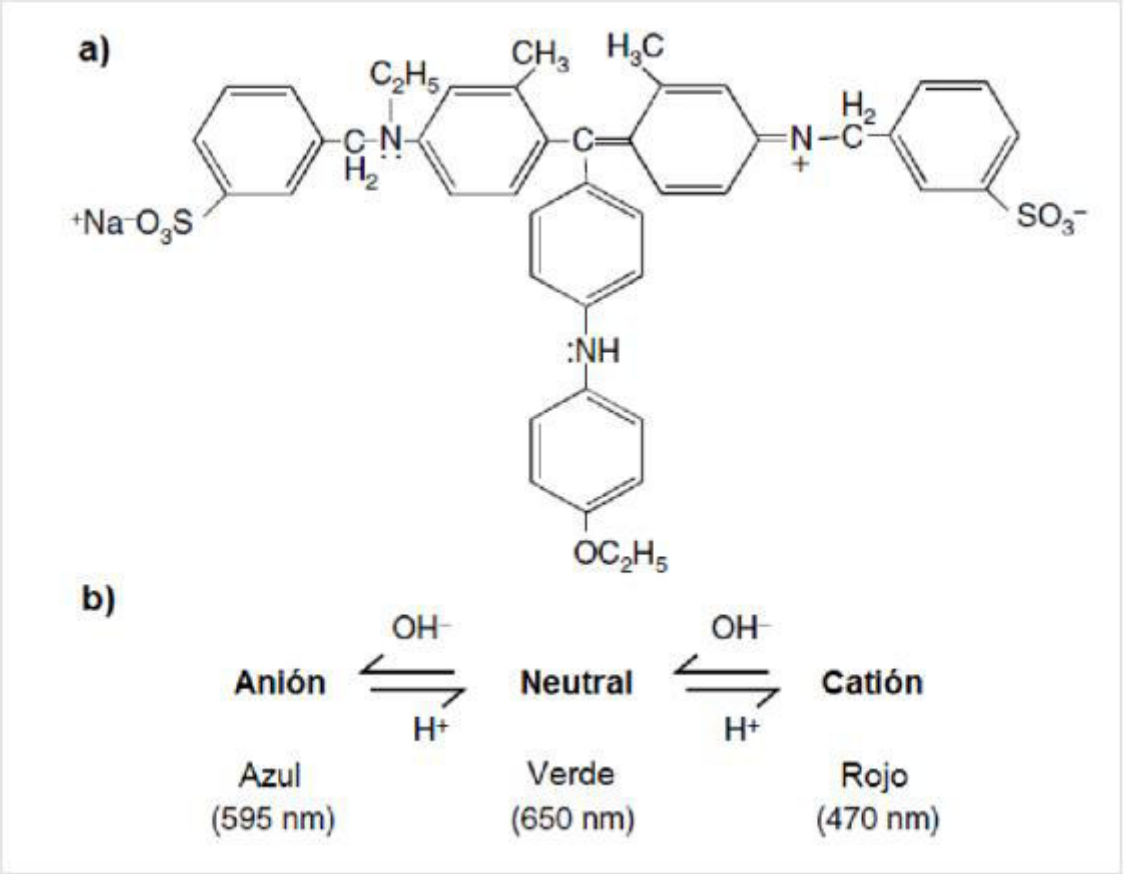


Figura 18. Azul de coomassie G-250 a) estructura química b) iones absorbentes del colorante.

3.3. *Determinación de la proteína estándar*

- Disolver 20 mg de la proteína estándar de albúmina de suero bovino en 5 mL de agua desionizada. Aforar a un volumen de 10 mL.
- Pipetear la cantidad de la proteína estándar de albúmina de suero bovino de acuerdo con la Tabla 6. Completar a un volumen final de 2.0 mL con el reactivo de Bradford. Leer las muestras a 595 nm en el espectrofotómetro. 0.20 ml de la solución proteica con el polímero se mezcló vigorosamente con 1.80 mL del reactivo Bradford, completando el volumen a 2.0 mL. Después de la incubación (3 minutos) de la muestra se realizó la medición de la absorbancia de la solución.
- El procedimiento descrito se resume en la Tabla 6.

Tabla 6. Matriz utilizada para la elaboración de la curva de calibración a partir de la proteína Albumina de suero de bovino.

ppm (PASB)	PASB (µg)	PASB(µL)	BRADFORD (µL)	VOL. TOTAL(µL)
0	0	0	200	200
25	5	5	195	200
50	10	10	190	200
100	20	20	180	200
200	40	40	1160	200
400	80	80	120	200
600	120	100	100	200

PASB: proteína Albúmina de suero bovino, µg: Microgramo, µL: Microlitro

3.4. *Encapsulamiento del extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictus por el método de extrusión*

- Se preparó una disolución de alginato de sodio en agua desionizada. Se agitó la mezcla a 200 rpm hasta lograr una mezcla homogénea (el tiempo para homogenizar la mezcla está en relación con el grado viscosidad del polímero).
- Se mezcló 10 mg del extracto crudo de veneno de serpiente en 6.0 mL de alginato de sodio preparado anteriormente, la suspensión generada se mantuvo en agitación por 10 minutos en un agitador mecánico a 200 rpm.
- La suspensión fue goteada usando una jeringa de tuberculina, a una altura de 2 a 3 mm sobre un recipiente que contiene 20 mL de cloruro de calcio ($CaCl_2$) 1.0 molar. Posteriormente, las microcápsulas fueron lavadas con tres porciones de agua destilada, por esta vía se procedió a producir microcápsulas húmedas. Luego fueron escurridas sobre un vaso de precipitado.
- El encapsulamiento del extracto crudo del veneno de serpiente por el método de extrusión se realizó de acuerdo con la Tabla 7.

Tabla 7. Matriz del diseño experimental de completamente al azar para la microencapsulación del extracto crudo de veneno de serpiente con alginato de sodio.

Tratamientos	% alginato	Tiempo de endurecimiento (minutos)
T1	0.50	10
T2	0.75	5

3.5. *Hidrolisis de las microcápsulas*

La hidrólisis de las microcápsulas se realizó a dos temperaturas diferentes y dos condiciones de agitación tal como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de trabajo para la hidrólisis de las microcápsulas con el extracto crudo del veneno de serpiente inmovilizado

Temperatura (°C)	Agitación (RPM)
24	0
37	100

El procedimiento realizado para la hidrólisis de las microcápsulas con el extracto crudo del veneno de serpiente inmovilizado se describe a continuación:

- Se preparó una solución buffer fosfato a pH 7.0, para ello mezclar 50 mL de fosfato monopotásico 0.1 M y 37 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M.
- Se pesó 1.0 gramo de las microcápsulas previamente obtenidas. Se disolvió en 10 mL de una disolución buffer fosfato pH 7.0; previamente preparado.
- 200 μL de la solución hidrolizada (extracto proteico con el polímero) se mezcló vigorosamente con 1.8 mL del reactivo Bradford, completando el volumen a 2.0 mL.
- Se dejó reposando durante 3 minutos, para su posterior lectura de la absorbancia de la solución.
- Posteriormente se llevó a leer las muestras a una longitud de onda de 595 nm en el espectrofotómetro UV-Vis.

3.6. *Evaluación del perfil de la cinética de liberación de los componentes proteicos del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) a través de los modelos matemáticos: Wagner, Hixón – Crowell, primer orden y de orden cero.*

Los datos obtenidos de la hidrolisis del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado en alginato de sodio se ajustó a los cuatro modelos matemático que evalúan la cinéticalas cuales fueron: Wagner, Hixón – Crowell, primer orden y de orden cero.

El tratamiento de los datos experimentales obtenidos se llevó a cabo mediante una evaluación de regresión lineal de los modelos matemáticos antes mencionados, haciendo uso de la hoja de cálculo de excel. Los resultados obtenidos del modelamiento matemático se analizaron y compararon los valores de R^2 para poder determinar cuál de los 4 modelos matemáticos realiza un mejor ajuste de la curva obtenida a partir de los datos experimentales de la hidrolisis de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS).

Se utilizó el programa Microsoft Excel para determinar el valor de los parámetros cinéticos X e Y mediante la linealización de la ecuación del modelo matemático. Así también, se determinó el coeficiente de correlación (R^2) para conocer la exactitud del modelo cinético de liberación.

Cinética de liberación de Wagner.

Esta ecuación proporciona una descripción de la variación de cómo la cantidad de fármaco no liberado decrece su concentración con el tiempo, la rapidez de liberación disminuye a medida que se agota el contenido de fármaco en la disolución (Vásquez et al., 2021).

El modelo matemático es útil en la formulación y diseño de medicamentos de liberación controlada, donde se busca una liberación gradual y sostenida del fármaco: El modelo matemático se representa a continuación:

$$ln\%ND = -\mathrm{kt} + \ln\%ND_0$$

Donde:

%ND: porcentaje no disuelto

k: constante de velocidad

$\%\boldsymbol{ND_0}$*:* Porcentaje inicial del fármaco en las microcápsulas.

t: tiempo.

Cinética de liberación de Hixon – Crowell

Modelo cinético utilizado para describir la liberación de un principio activo desde matrices que experimentan erosión (Andreetta, 2003). El modelo matemático está representado mediante la siguiente ecuación:

$$\sqrt[3]{W_0} - \sqrt[3]{W_t} = K_s t$$

Donde:

$\boldsymbol{W_0}$**:** es la cantidad inicial del fármaco en la forma farmacéutica

$\boldsymbol{W_t}$ **:** Cantidad remanente en la forma farmacéutica en el tiempo t

$\boldsymbol{k_s}$ **:** Constante de velocidad

t: tiempo

Al graficar la raíz cúbica de la cantidad que se disocia en un cierto tiempo vs la cantidad de fármaco remanente, se obtiene una gráfica lineal (Vásquez et al., 2021).

Cinética de orden cero

En la cinética de orden cero, la rapidez de solubilidad es constante en el tiempo, y es indistintamente de la concentración del soluto.

$$Q_t = Q_0 + kt$$

Donde:

Q_t: Cantidad de fármaco disuelto en el tiempo *t*

Q_0*:* Cantidad inicial del fármaco en la solución en la mayoría de veces $Q_0 = 0$

k : constante de velocidad de la cinética de orden cero

t: tiempo

Al representar la proporción del fármaco que se disuelve a diferentes intervalos de tiempo (Q_t), dando lugar a una gráfica de una recta donde la pendiente representa la constante de velocidad de la disolución del fármaco (Vásquez et al., 2021).

a. Cinética de primer orden

En este modelo, la velocidad de disolución está en función de la concentración de la microcápsula o fármaco.

$$ln\%Q_t = ln\%Q + kt$$

$\%Q_t$: Porcentaje de fármaco disuelto en el tiempo *t*

$\%Q_0$*:* Porcentaje inicial del fármaco en la solución en algunos casos $Q_0 = 0$

k : constante de velocidad de la cinética de orden cero

t: tiempo

Al graficar $ln\%Q_t$ del fármaco vs el *tiempo*, se consigue una recta donde la pendiente, en valor absoluto, corresponde a la constante de cinética del proceso (Vásquez et al., 2021).

3.7. *Determinación de las proteínas presente en el extracto crudo del veneno de serpiente microencapsulada por el método de Electroforesis y Western Blot.*

La presencia de proteínas presentes en el extracto crudo del veneno de serpiente inmovilizado en microcápsulas de alginato de sodio se determinó por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15% en una mezcla de soluciones buffer de pH 6.8 y pH 8.8. La corrida electroforética se realizó en una cámara de electroforesis vertical, donde se mantuvo un voltaje constante de 100 voltios, durante 90 minutos aproximadamente. Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%, el extracto crudo de veneno de la serpiente se carga en las ranuras del gel junto con un marcador de peso molecular conocido, el gel se tiñó con azul brillante de coomassie al 0.05% durante 20 minutos y luego se lavó con solución decolorante hasta que las bandas proteicas sean visibles.

La transferencia a la membrana se llevó a cabo a través de los siguientes pasos, las bandas del gel se transfieren a una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia durante 50 minutos a 100 voltios, la membrana se bloquea con buffer de bloqueo (5% de leche descremada) durante 12 horas a 4 °C, posterior a ello la membrana se lava con buffer de lavado para eliminar cualquier residuo no específico.

Para la inmunodetección, la membrana se incuba con suero de conejo diluido en buffer de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente, luego se realizó un lavado adicional de la membrana con buffer de lavado para eliminar el exceso de suero, para la incubación la membrana se incuba con anti-IgG de conejo ligada a peroxidasa de rabanito diluida en buffer de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente y finalmente se realizan varios lavados con buffer de lavado para eliminar cualquier exceso de anticuerpo secundario.

El revelado de las bandas de la membrana se revelan con $DBA + H_2O_2$ durante 5 minutos, la reacción se detiene agregando agua destilada.

Este protocolo permite la separación y detección específica de proteínas presentes en la ponzoña de la serpiente, lo que facilita el estudio de las propiedades y la función de las proteínas venenosas. El tamaño de las bandas fue estimado con el software Gel Analyser 19.1.

3.8. *Caracterización de las microcápsulas del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizada a través de microscopia óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM).*

Para determinar la morfología de la microcápsula, se empleó microscopio electrónico de barrido (SEM) se trabajó en módulo de bajo vacío ($1.29e^{-5}\ Torr$), con el haz de electrones a 5 kV, las imágenes se tomaron a 100X y 200X. Para determinar el tamaño se empleó un microscopio óptico modelo digital con sensor 2 MP en un rango de 300x – 1000X en magnificación. Las microcápsulas observados fueron medidas con un pie de rey, mostrando el tamaño promedio de 1 mm ± 0.25. Esta prueba se realizó por triplicado.

Relación de aspecto = Eje mayor / Eje menor.

Relación de aspecto =1/1

La morfología de las microcápsulas fue caracterizada a través de la microscopía electrónica de barrido (SEM):

IV. CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. *Encapsulamiento del extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictucs por el método de extrusión con diferentes concentraciones del alginato de sodio.*

4.1.1. Elaboración de la curva patrón

La Tabla 6 muestra las concentraciones de la proteína de Albúmina de suero bovino cuyos valores van desde 0 a 600 ppm, a partir de estas concentraciones se determinó la curva patrón para determinar el contenido total de proteínas presentes durante la cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizado con alginato de sodio. En la tabla 9 se muestran los resultados de la absorbancia de las diferentes concentraciones de la proteína Albúmina de suero de bovino (PBSA)

Tabla 9. Absorbancia y concentración de la proteína Albúmina de suero de bovino (PBSA)

PBSA (ppm)	ABSORBANCIA
0	0.265
50	0.375
100	0.502
200	0.689
400	0.956
600	1.198

PBSA: proteína Albúmina de suero bovino

La figura 19 muestra la curva patrón de la proteína Albúmina de suero de bovino, el cual se tabuló con los valores de la tabla 9, el cual se usó para determinar la concentración (ppm) de las proteínas presentes en la ponzoña de la serpiente antes de la microencapsulación y posteriormente durante la liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con el alginato de sodio.

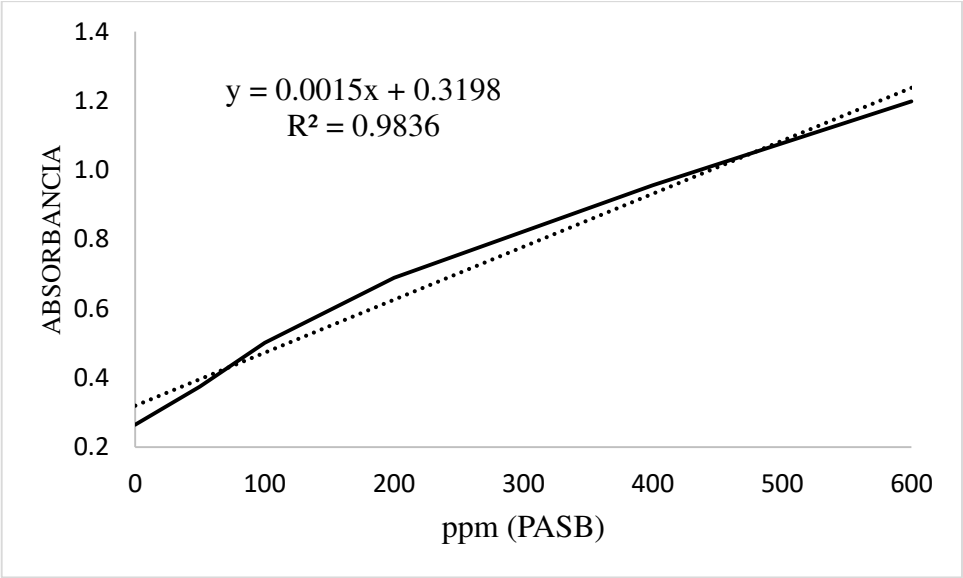


Figura 19. Curva patrón a partir de la Albúmina de suero de bovino

La curva de la línea continua representa la curva patrón a partir de los datos experimentales, obteniéndose un valor de $R^2 = 0.98$.

Mientras que la curva discontinua representa la linealidad ajustada con valores teóricos, llevando a cabo un ajuste un valor de $R^2 = 1$.

4.1.2. Encapsulamiento del extracto crudo proteico del veneno de la serpiente B. pictucs por el método de extrusión

La microencapsulación se llevó a cabo mediante la reacción de gelificación iónica, entre un ión con una carga opuesta y un polisacárido. La reacción está basada en suspender el extracto crudo de veneno de serpiente en una disolución de alginato de sodio, esta suspensión se hizo gotear sobre la disolución acuosa de cloruro de calcio, formándose así microcápsulas de alginato de calcio, el cual es insoluble y permeable.

La reacción de gelificación es la siguiente.

$$2Na(alginato) + Ca^{2+} \rightarrow Ca(alginato)_2 + 2Na^{+}$$

La microencapsulación del extracto crudo de veneno de serpiente con alginato de sodio se realizó de acuerdo con los parámetros indicados en la tabla 10.

Tabla 10. Parámetros experimentales para la microencapsulación del extracto crudo de veneno de serpiente con alginato de sodio.

Tratamientos	% alginato	Concentración inicial de ECVS (ppm)	Tiempo de endurecimiento (minutos)	Concentración de $CaCl_2$ (mol/L)	Altura del goteo (mm)
T1	0.50	150	10	1.00	2
T2	0.75	221	5	1.00	3

Durante la microencapsulación del ECVS, se tuvo en cuenta los siguientes parámetros como:

- La cantidad del extracto crudo de veneno de serpiente disuelta en el alginato de sodio, en la práctica se usó 10 mg de extracto crudo de veneno de serpiente disuelto en 6 mL de alginato de sodio al 0.5 % y 0.75%.
- La altura de caída de la disolución del extracto crudo de veneno de serpiente, para este caso la altura de caída fue de 2 a 3 mm. A valores mayores de 3 mm, no se llega a obtener microcápsulas sino películas de alginato, debido al impacto generado por la caída de la gota sobre la disolución de cloruro de calcio 1.0 M.
- El tamaño de la boquilla de la jeringa, por donde va a salir la solución contenida del ECVS. Este parámetro define el tamaño y la forma de las microcápsulas, mientras menor sea el diámetro de la boquilla de la jeringa, menor es el tamaño de las microcápsulas, empero existe un límite el cual está condicionado por el grado de viscosidad del polímero; a mayor viscosidad se requiere una mayor abertura de boquilla de la jeringa.

La concentración del cloruro de calcio está estrechamente ligada con el material encapsulante y mantiene una relación con la concentración del alginato de sodio, sigue una relación inversa, es decir, que si se trabaja con una elevada concentración de alginato de sodio la concentración del cloruro de calcio debe ser de menor concentración y viceversa; debido a que si se trabaja con elevadas concentraciones del polímero y el agente encapsulante no se obtiene microcápsulas definidas; sino películas de alginato o de quitosano.

Estas variables afectan de manera significativa al momento de la microencapsulación,

La microencapsulación se llevó a cabo mediante el principio de difusión de Fick; en este caso particular la concentración en la parte interna del polímero (alginato de sodio) es menor a la concentración de la disolución de cloruro de calcio, a pesar de la baja concentración del cloruro de calcio 0.1 M debido a esta gradiente de concentración se lleva a cabo la formación de perlas, estas perlas presentan un vacío dentro de su estructura. El vacío generado durante la formación de perlas se aprovechó para microencapsular el extracto crudo de veneno de serpiente (Yong Lee & Mooney, 2013).

Las características de gelificación dependen de la presencia del monómero glucurónico (Figura 20), ya que este monómero es el responsable de la formación de los espacios vacíos más conocido como "caja de huevo". A mayor presencia del monómero glucurónico mayor es la microencapsulación del extracto crudo de veneno de serpiente.

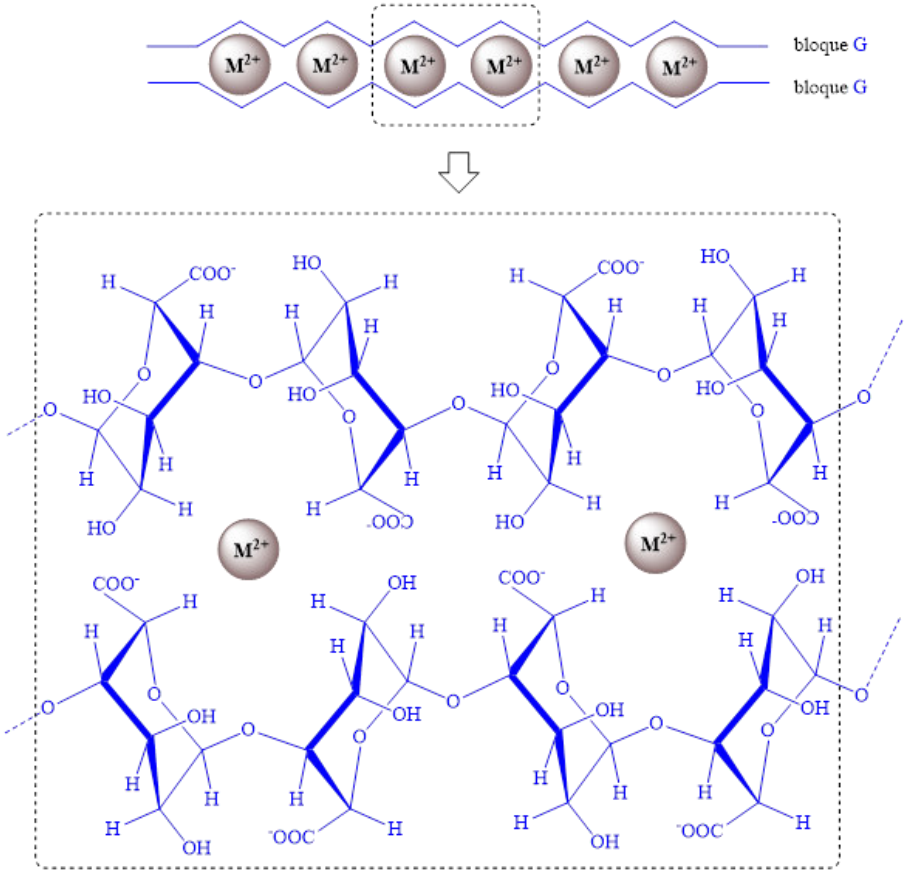


Figura 20. Esquema de modelo caja de huevo del bloque G del polímero de alginato, interaccionando con un catión divalente.

La formación de las perlas se lleva mediante la interacción del ion calcio con los átomos donadores de electrones, en el caso del alginato de sodio el átomo de oxígeno y por parte del ECVS los átomos de oxígeno y nitrógeno. Esta interacción se da mediante la

formación de un complejo de calcio coordinado con los átomos dadores de electrones antes mencionados.

La interacción de los grupos oxidrilo (OH^-) con los protones (H^+) de las proteínas presentes en la ponzoña de la serpiente (ECVS), hace posibles la estabilidad de las microcápsulas, mediante fuerzas intermoleculares, pero mayormente mediante puentes de hidrogeno.

Las proteínas presentes en mayor proporción en el extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) presentan una afinidad al ión calcio, el cual se observa en el resultado del ensayo de Western – Blot.

La afinidad del alginato de sodio y de las proteínas presentes en el ECVS con el ión calcio (Ca^{2+}) para formar complejos, esta afinidad se debe a la interacción mediante enlaces de coordinación tal como se puede observar en la figura 21. El calcio posee un número de coordinación de 6, favoreciendo de esta manera la microencapsulación y formación de la caja o empaquetadura de huevo.

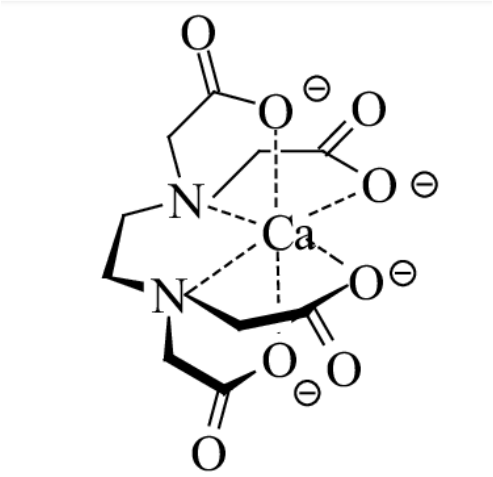


Figura 21. Formación del complejo de calcio con el EDTA.

4.2. *Evaluación de la cinética de liberación de los componentes proteicos del ECVS a través de los modelos matemáticos de Wagner, Hixón – Crowell, orden cero y de primer orden.*

El proceso de disolución de las microcápsulas es tanto más fácil cuanto mayor es el grado de desorden siguiendo el principio de la segunda ley de la termodinámica, el segundo

factor es en gran medida favorable a la solubilidad, lo que hace posible que muchos procesos de disolución se lleven a cabo aun cuando los procesos son endotérmicos.

El proceso de liberación se llevó acabo de acuerdo a los parámetros de la tabla 11.

Tabla 11. Parámetros experimentales para la liberación de las proteínas microencapsuladas del extracto crudo de veneno de serpiente con alginato de sodio.

Tiempo (minutos)	**Concentración del ECVS (ppm) en la disolución**			
	T1 Alginato 0.5%, 10 minutos de endurecimiento. $[ECVS]_0 = 150\ ppm$		**T2 Alginato 0.75%, 5 minutos de endurecimiento $[ECVS]_0 = 221\ ppm$**	
	24 °C	**37 °C**	**24 °C**	**37 °C**
20	21	43	37	60
40	34	52	51	93
80	49	59	73	117
180	69	73	87	153
210	70	75	87	155

ECVS: Extracto crudo de veneno de serpiente. Tratamiento a 24 °C se realizó en condiciones estáticas (0 rpm). Tratamiento a 37 °C se realizó a 100 rpm.

$[ECVS]_0$**:** Concentración inicial de ECVS.

El uso de modelos matemáticos para comprender y predecir la disolución de un fármaco se basa en principios científicos bien establecidos. Los experimentos realizados por Noyes y Whitney en 1897 sentaron las bases fundamentales para la comprensión de la cinética de la disolución de sólidos en medios líquidos. (Noyes y Whitney, 1897).

La ecuación de Noyes – Whitney se lleva a cabo mediante dos pasos. En el primer paso, el sólido se disuelve en la interfaz sólido-líquido, formando una capa delgada de soluto alrededor del sólido. Este paso inicial es relativamente rápido y conduce a la formación de una capa saturada de soluto en la interfaz.

En el segundo paso, el soluto disuelto en la capa de difusión debe difundirse desde esta capa hacia el seno de la disolución. Este proceso de difusión es más lento y está limitado por la rapidez de solubilidad del sólido. La velocidad de disolución del sólido depende de varios factores, como la solubilidad del soluto, la temperatura, la agitación y el área de superficie del sólido expuesta al medio líquido.

Al comprender estos dos pasos del proceso de disolución, podemos utilizar la ecuación de Noyes-Whitney para predecir y controlar la velocidad de disolución de un sólido en un medio líquido, lo que es fundamental en el diseño y la formulación de medicamentos y otros productos farmacéuticos.

En el medio biológico, la disolución viene acompañado de la absorción, por tanto, la concentración del soluto se mantiene en valores discretos muy inferiores al grado de su solubilidad, este se da para el caso donde $C \ll C_S$, donde C, es la concentración del fármaco en una solución a un tiempo t y C_S, es la concentración saturada, el cual representa la condición de sumidero o ***sink,*** el cual simula la liberación *in vitro.* En los modelos matemáticos que explican la disolución de la microcápsula se trabajó bajo esta condición.

Tabla 12. Modelos matemáticos usados para ajustar la liberación de las proteínas microencapsuladas del extracto crudo de veneno de serpiente para los casos de T1 y T2.

MODELO	ECUACIÓN
Wagner	$ln\%ND = -\mathrm{kt} + \ln\%\mathrm{ND}_0$
Orden cero	$Q_t = Q_0 + kt$
Hixon - Crowell	$\sqrt[3]{W_0} - \sqrt[3]{W_t} = K_s t$
Primer orden	$ln\%Q_t = ln\%Q + kt$

%ND: porcentaje no disuelto. $\%\mathbf{ND_0}$*:* Porcentaje inicial del fármaco en la micrpcápsula, para el modelo de Wagner. $\boldsymbol{W_0}$**:** es la cantidad inicial del fármaco en la forma farmacéutica. $\boldsymbol{W_t}$ **:** Cantidad remanente en la forma farmacéutica en el tiempo t. $\boldsymbol{Q_t}$: Cantidad de fármaco disuelto en el tiempo *t.* $\boldsymbol{Q_0}$*:* Cantidad inicial del fármaco en la solución en la mayoría de veces $Q_0 = 0$, para el modelo de orden cero. y **t**: tiempo.

Se trabajó con el modelo matemático de Wagner, debido a que este modelo matemático sostiene que las formas de liberación prolongada muestra una cinética de liberación *in vitro* de tipo pseudo orden uno, la cinética de primer orden no es capaz de ajustar la

primera parte de la liberación de la microcápsula. El modelo de Wagner explica lo que la hidrólisis de primer orden no llega a explicar.

El modelo de Hixon – Crowell toma en cuenta las siguientes características que debe tener el soluto:

- La disolución se lleva a cabo en un plano perpendicular a la superficie del sólido.
- La superficie de las microcápsulas es lisa
- La forma de las microcápsulas es esférica
- El sólido mantiene su forma al disolverse
- La agitación del medio no afecta la hidrolisis de las microcápsulas

Este modelo no explica cuando la disolución se lleva a cabo en estado estático, el modelo asume que la hidrólisis está limitado por la velocidad de hidrlisis de la microcápsula y no por la difusión a través de la matriz polimérica.

Según la farmacocinética la liberación o hidrolisis de un fármaco describe una curva logarítmica, similar a la curva que se observa en la figura 22, la gráfica posee un mejor ajuste a una función logarítmica tal como indica las referencias bibliográficas.

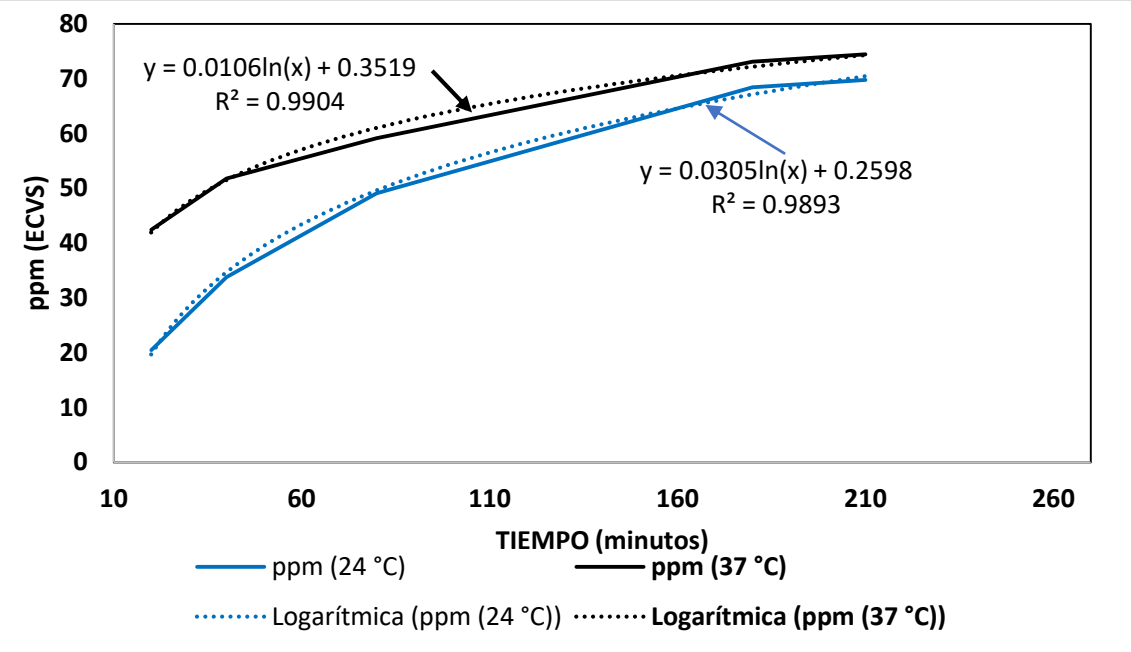


Figura 22. Curva cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.50% de alginato de sodio con 10 minutos de endurecimiento a 24 °C en condiciones estáticas y a 37 °C con agitación constante a 100 rpm y ajuste logarítmica de las curvas.

En el caso de la microencapsulación con 0.50% de alginato de sodio (tratamiento 1), en la figura 22, se muestra la curva de liberación a 24 °C, estático (R^2 = 0.9893) y a 37 °C a 100 rpm (R^2 = 0.9904). Las curvas continuas representan la liberación de la parte experimental, mientras que las líneas discontinuas representan el gráfico ideal, con un valor de $R^2 = 1$. Se observa que hay una mayor liberación transcurrido los 180 minutos y a la temperatura de 37 °C, una vez superado este tiempo las microcápsulas saturan la disolución buffer, impidiendo de esta manera que las microcápsulas sigan hidrolizándose. Este suceso se debe a que la disolución buffer (pH 7.0) desnaturaliza la proteína del extracto crudo de veneno de serpiente. La composición del buffer es el hidróxido de sodio 0.1 molar y fosfato monopotásico 0.1 molar, la disolución buffer pH 7.0 se obtuvo mediante la neutralización; el hidróxido de sodio al ser una base fuerte favorece la desnaturalización de las proteínas. Ya que a mayor temperatura favorece el proceso de difusión, debido a que la constante de difusión posee una relación directa con la temperatura del tipo "Arrhenius; por tanto, es de esperarse que a mayor temperatura se libere mayor cantidad del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS), como se observa en la figura 24.

A medida que se incrementa la hidrolisis de las microcápsulas hay un incremento del contenido de proteínas en la disolución buffer llegando a un punto de saturación en donde la concentración del seno de las microcápsulas es igual a la concentración de la disolución buffer; llegando al punto de equilibrio la concentración de las proteínas se mantiene constante.

La disminución de la absorbancia transcurrido los 210 minutos se debe a la desnaturalización de las proteínas y a la saturación de la disolución buffer.

La hidrolisis se llev a cabo mediante difusión debido a la existencia de una gradiente de concentración entre el interior de la microcápsula y el seno de la disolución buffer.

El del modelamiento matemático que se hizo a la curva obtenida durante la liberación de las proteínas del extracto crudo de veneno de serpiente (Fig. 22). Se llevó a cabo haciendo uso de los parámetros de las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 24 °C, estático y con 0.50% p/v de alginato de sodio.

Tiempo (minutos)	**Orden cero** %Q	**Primer orden** ln(%Q)	**Wagner** ln[%ND]	**Hixon - Crowell** Q^(1/3)
20	29	3.351	4.269	3.498
40	35	3.548	4.178	3.736
80	40	3.680	4.100	3.903
180	49	3.891	3.932	4.188
210	50	3.909	3.915	4.213
$\boldsymbol{R^2}$	**0.945**	**0.914**	**0.968**	**0.928**

Tabla 14. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 37 °C a 100 RPM y con 0.50% p/v de alginato de sodio.

Tiempo (minutos)	**Orden cero** %Q	**Primer orden** Ln(%Q)	**Wagner** ln[%ND]	**Hixon - Crowell** Q^(1/3)
20	14	2.629	4.456	2.750
40	23	3.125	4.347	3.244
80	28	3.332	4.205	3.671
180	41	3.714	3.991	4.098
210	47	3.845	3.975	4.124
$\boldsymbol{R^2}$	**0.971**	**0.892**	**0.960**	**0.877**

Al graficar los valores calculados con el modelo matemático de Wagner se obtuvieron las curvas, tal como se muestra en la figura 23.

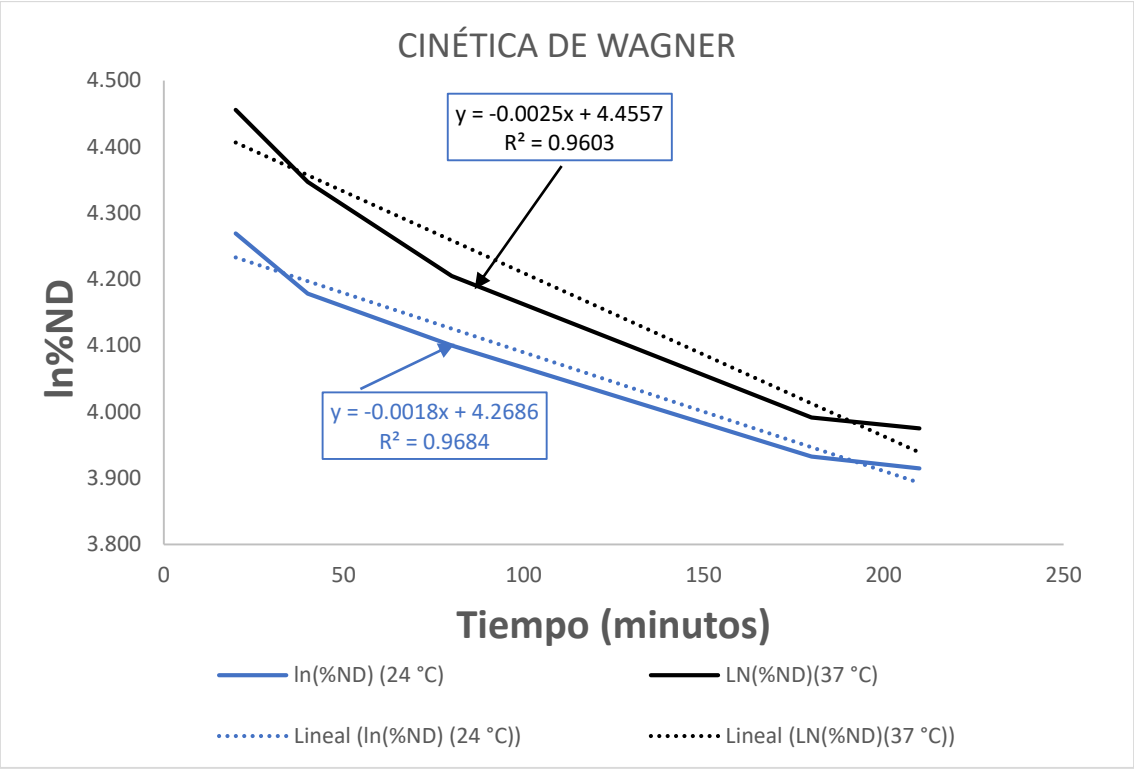


Figura 23. Modelamiento matemático de Wagner de la cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.50% de alginato de sodio a 24 °C en condiciones estáticas y a 37 °C con agitación constante a 100 rpm.

La figura 23 representa al modelo matemático de Wagner que mejor ajusta para el modelamiento de la curva cinética de liberación.

Acerca de los demás modelos matemáticos se obtuvieron valores de R^2 en el siguiente orden. Orden cero (0.97) > Wagner (0.96)> primer orden (0.89) > Hixón-Crowell (0.88) a la temperatura de 37 °C y a 24 °C, Wagner (0.97) > orden cero (0.95) > Hixón-Crowell (0.93) > primer orden (0.91) (Anexo 1 & 2).

El alto valor de $R^2 = 0.971$ con el modelamiento matemático a 24 °C de orden cero es debido a que no se toma en cuenta el parámetro de la agitación. La desigualdad de los valores de R^2 en los modelamientos matemáticos es debido a que no se considera la agitación.

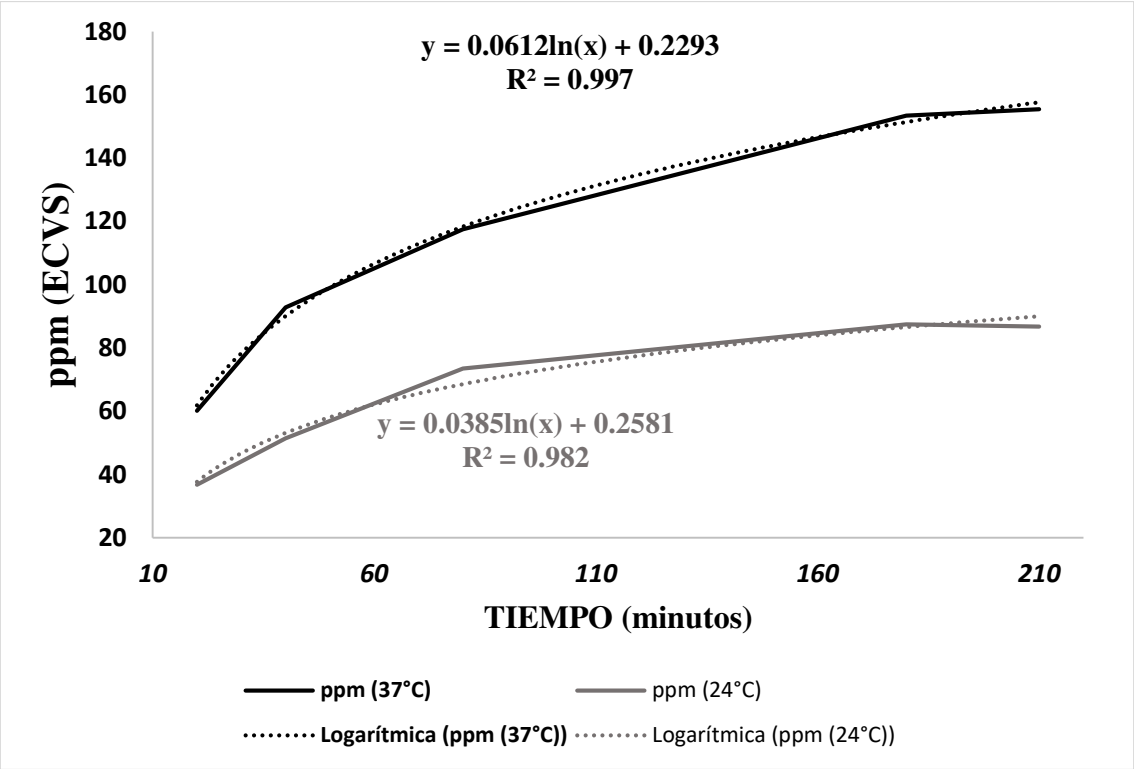


Figura 24. Curva cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.75% de alginato de sodio, con 5 minutos de endurecimiento y ajuste logarítmica de las curvas.

En el caso de la microencapsulación con 0.75% de alginato de sodio, en la figura 24 se muestra la curva de liberación a 24 °C, estático ($R^2 = 0.982$) y a 37 °C, con agitación a 100 rpm ($R^2 = 0.997$). Las curvas continuas representan la liberación de la parte experimental, mientras que las líneas discontinuas representan el gráfico ideal. Se observa que hay una mayor liberación transcurrido los 180 minutos y a la temperatura de 37 °C ($R^2 = 0.997$), una vez superado este tiempo las microcápsulas saturan la disolución buffer, es decir colapsa, impidiendo de esta manera que las microcápsulas sigan hidrolizándose. Este suceso se debe a que la disolución buffer (pH 7.0) desnaturaliza la proteína del extracto crudo de veneno de serpiente ya que a mayor temperatura se favorece el proceso de difusión, por tanto, es de esperarse que a mayor temperatura se libere mayor cantidad del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS).

La saturación de la solución buffer se determinó al momento de realizar la lectura del contenido de las proteínas en el espectro UV- Vis, transcurrido los 210 minutos se observa que el contenido de las proteínas disminuye, se mantiene constante o incrementa su valor mínimo, tal cual como muestra en la tabla 10.

En la figura 24 se observa una marcada separación de las curvas de la cinética de liberación, la marcada diferencia es debido a que la concentración del alginato de sodio aumentó en un 0.25% respecto a la figura 22. Debido a que la concentración del polímero es mayor, por tanto, la microencapsulación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) es mayor por tanto durante la hidrolisis de las microcápsulas se libera una cantidad mayor a los 37 °C. A mayor porcentaje del alginato de sodio mayor presencia del monómero gulurónico en el presente trabajo se usó alginato de sodio de la marca china con un porcentaje de 19.0% del monómero gulurónico (anexo 9), la presencia de este monómero favorece la formación en mayor cantidad de cajas de huevos favoreciendo de esta manera un mayor porcentaje de microencapsulación del extracto crudo de veneno de serpiente.

A menor tamaño de la microcápsula, la liberación del ECVS es mayor, porque aumenta el área superficial de la microcápsula, favoreciendo de esta manera la hidrolisis. Pero, para obtener microcápsulas de menor tamaño es necesario usar otra técnica de microencapsulación o disminuir el tamaño de la boquilla de la aguja.

El modelamiento matemático que se hizo a la curva obtenida durante la liberación de las proteínas del extracto crudo de veneno de serpiente (figura 24), se llevó a cabo mediante los parámetros de las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 24 °C, estático y al 0.75% p/v de alginato de sodio.

Tiempo (minutos)	**Orden cero** %Q	**Primer orden** ln(%Q)	**Wagner** ln[%ND]	**Hixon - Crowell** Q^(1/3)
20	23	3.148	4.340	3.720
40	25	3.223	4.316	3.814
80	35	3.565	4.169	4.275
180	46	3.833	3.985	4.674
210	46	3.833	3.985	4.674
R^2	***0.952***	***0.923***	***0.963***	***0.934***

Tabla 16. Valores de los parámetros de los modelos matemáticos a 37 °C a 100 RPM y al 0.75% p/v de alginato de sodio.

Tiempo (minutos)	Orden cero %Q	Primer orden ln(%Q)	Wagner ln[%ND]	Hixon - Crowell Q^(1/3)
20	27	3.304	4.288	3.918
40	42	3.737	4.061	4.527
80	53	3.973	3.847	4.897
180	69	4.240	3.420	5.354
210	70	4.253	3.390	5.377
R^2	**0.912**	**0.825**	**0.964**	**0.858**

Al graficar los valores calculados con el modelo matemático de Wagner se obtuvieron las curvas que se muestra en la figura 25.

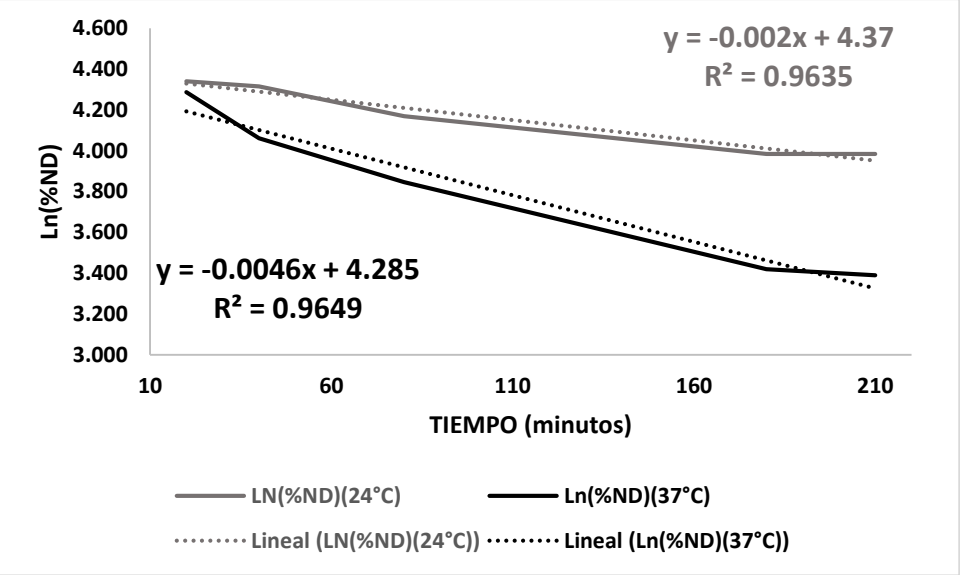


Figura 25. Modelamiento matemático de Wagner a la curva de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con 0.75% de alginato de sodio, a la temperatura de 24 °C, estático y a 37 °C, con agitación a 100 rpm.

Los gráficos de la figura 25, representa al modelamiento matemático de Wagner, el que mejor se ajustan para el modelamiento de la cinética de liberación que se muestra en la figura 25, a la temperatura de 24 °C sin agitación y a 37 °C con agitación a 100 rpm. El ajuste a la curva de la cinética de liberación del ECVS inmovilizado, se realizó haciendo uso del modelo matemático de Wagner.

La línea continua representa al gráfico de los datos experimentales, mientras que la línea discontinua representa la linealidad.

Acerca de los demás modelos matemáticos se obtuvieron valores de R^2 en el siguiente orden. Wagner (0.964)> orden cero (0.912)> Hixón-Crowell (0.858) > primer orden (0.825) a la temperatura de 37°C y a 24 °C Wagner (0.963)> orden cero (0.952)> Hixón-Crowell (0.934) > primer orden (0.923) (Anexo 1 & 2).

Tabla 17. Resultados del modelamiento matemático de la cinética de liberación de ECVS *Bothrops pictus* "Jergón de la costa" a partir de microcápsulas elaboradas a base de alginato.

			0.50% p/v ALGINATO DE SODIO			0.75% p/v ALGINATO DE SODIO		
MODELOS	TEMPERATURA °C	AGITACIÓN RPM	Con. Inicial ppm	R^2	$k(min^{-1})$	Con. Inicial ppm	R^2	$k(min^{-1})$
ORDEN CERO	24	0	150	0.95	0.1056	221	0.95	0.1270
	37	100	150	0.97	0.1558	221	0.91	0.2076
PRIMER ORDEN	24	0	150	0.91	0.0027	221	0.92	0.0037
	37	100	150	0.89	0.0054	221	0.83	0.0043
WAGNER	24	0	150	0.97	0.0018	221	0.96	0.0020
	37	100	150	0.96	0.0025	221	0.96	0.0046
HIXON - CROWELL	24	0	150	0.93	0.0035	221	0.93	0.0052
	37	100	150	0.88	0.0065	221	0.86	0.0067

4.3. *Determinación de las proteínas presente en el extracto crudo del veneno de serpiente microencapsulado por Western Blot.*

Para la determinar la presencia de proteínas se realizó el ensayo de Western Blot al extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) inmovilizado con el alginato de sodio Mediante este ensayo se logró determinar la presencia de las siguientes proteínas: ***fosfolipasas A2, metaloproteinasas tipo 1, metaloproteinasas tipo 3,*** estas proteínas no son las únicas sino las más representativas y una concentración elevada. Las proteínas antes mencionadas han sido determinadas previamente por el grupo de investigación TOXIVEN. El resultado se corroboró con el banco de datos que posee el laboratorio de investigación antes mencionado, corroborando que durante la cinética de liberación efectivamente se llegó a liberar las proteínas halladas en mayor proporción en el extracto crudo de veneno de serpiente.

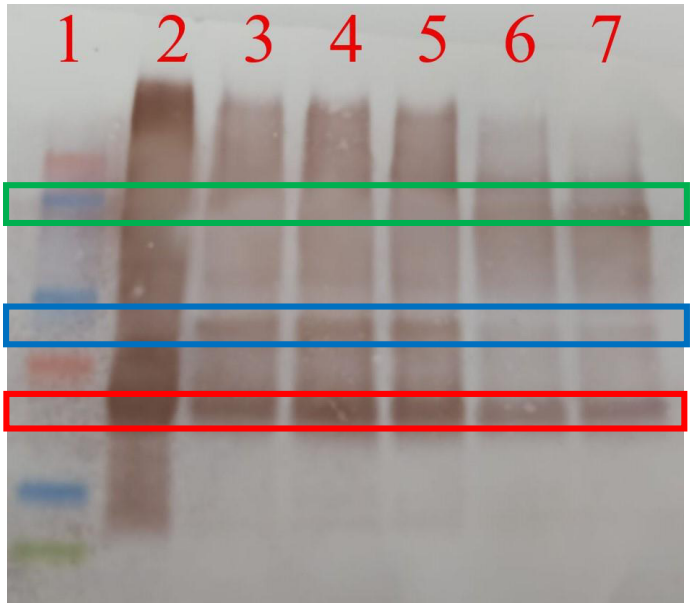


Figura 26. Gel desnaturante de poliacrilamida (SDS/PAGE) de las proteínas liberadas durante la hidrolisis de la ECVS. Carriles: 1. Marcador de peso molecular PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa Catalog number: 26619. 2. Veneno completo de *Bothrops pictus* (80 ug). 3: 24 horas de liberación. 4: 160 minutos de liberación. 5: 80 minutos de liberación. 6: 40 minutos de liberación. 7: 20 minutos de liberación. Recuadro rojo indica las bandas correspondientes a fosfolipasas A2, el recuadro azul corresponde a las bandas de metaloproteinasas tipo 1 y el recuadro verde indica las bandas metaloproteinasas tipo 3.

En la figura 26 se muestra bandas de las proteínas liberadas durante la cinética de liberación del ECVS inmovilizado con alginato de sodio. La banda 1, representa a una

banda de patrón de proteínas y sus respectivos pesos moleculares. El carril rojo representa la presencia de la proteína *fosfolipasa A2,* el carril celeste: *metaloproteinasas tipo 1*, el carrill verde: *metaloproteinasas tipo 3.*

La banda 2, representa al extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) puro de 10 mg disueltos en 6 mL de agua desionizada.

Las bandas del 3 al 7 similarmente representa la liberación de proteínas presentes en las microcápsulas que contiene el ECVS inmovilizado con alginato de sodio al 0.75% liberadas durante la hidrolisis de las microcápsulas. Las muestras fueron tomadas a 20, 40, 80, 180 y a 210 minutos, las cuales están representadas con las bandas del número 7 al 3 respectivamente.

La mayor cantidad de proteína liberada se observa en la columna 4 a un tiempo de 180 minutos, en esta columna se visualiza que la nitidez de las bandas de proteínas es mejor y el espesor de las bandas es mayor en comparación con los demás columnas, mientras que a los 210 minutos hay una disminución de la intensidad y espesor de las bandas, como se observa en la columna 3; estas características complementan la curva de hidrólisis.

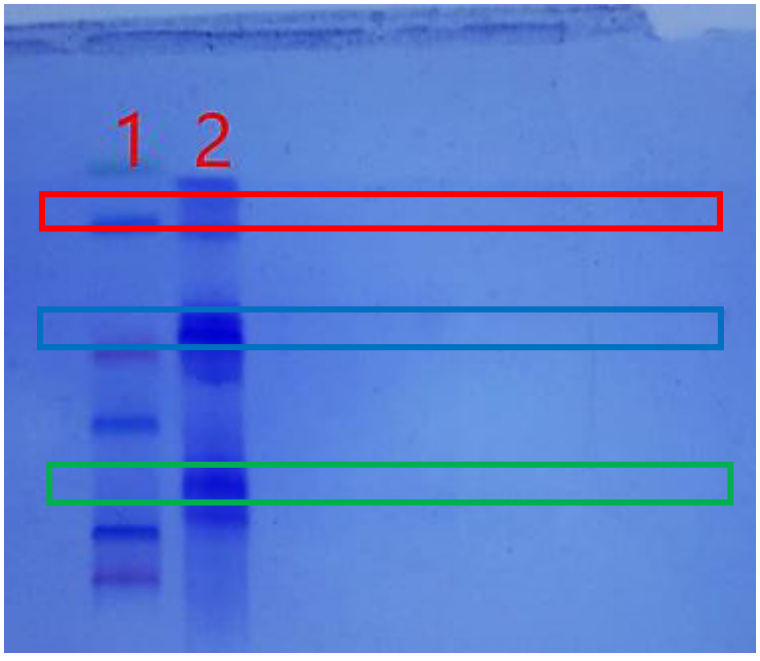


Figura 27. Electroforesis de las proteínas liberadas en la hidrolisis de la ECVS.

La banda 1 que se observa en la figura 27, representa los pesos moleculares de un patrón de proteínas, mientras que la banda 2, representa al extracto crudo de veneno de serpiente (ECVS) puro disuelto en agua desinizada. Las bandas de la hidrolisis de las microcápsulas

a los tiempos de 20, 40, 80, 180 y 210 minutos no se llega a observar debido a la baja concentración de las proteínas presentes en la disolución buffer.

4.4. *Caracterización de las microcápsulas con ECVS inmovilizada a través de microscopia óptica y SEM.*

Mediante el uso de la microscopia óptica se determinó el tamaño de las microcápsulas, donde el tamaño promedio fue de 3 mm, tal como se observa en la figura 28.

Haciendo uso de la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido se determinó la forma y el tamaño de las microcápsulas con el ECVS inmovilizado con el alginato de sodio.

La forma es casi esférica, los agujeros presentes en la microcápsula son debido a la ruptura final abrupta de la parte final de la aguja, cuando la disolución entra en contacto con la solución de cloruro de calcio.

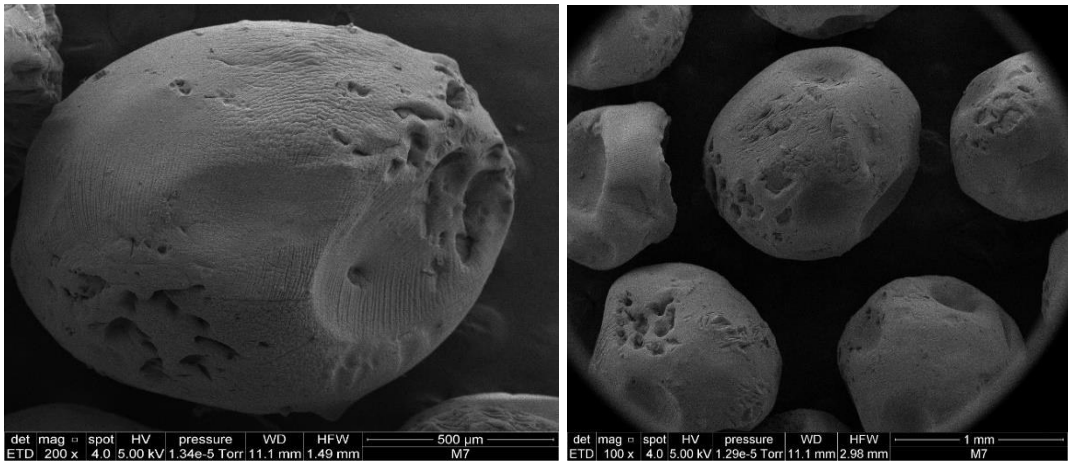


Figura 28. Forma y tamaño de las microcápsulas determinado mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (SEM)

V. CONCLUSIONES

1. Se llegó a microencapsular el extracto crudo de veneno de serpiente de 150 y 221 ppm, suspendida en una disolución de alginato de sodio al 0.50% y al 0.75%.
2. Se evaluó el modelamiento de la cinética de liberación de las microcápsulas haciendo uso de los siguientes modelos matemáticos: Wagner, Hixón- Crowell, primer orden y orden cero, de los modelos antes mencionados se tomó en cuenta el mejor ajuste lineal de los datos cinéticos, basados en los valores R^2 y de la constante de velocidad (k) tal es así que el mejor ajuste obtenido fue con el modelo matemático de Wagner (tabla 17).
3. Se determinó la presencia de proteínas presentes en mayor proporción en el extracto crudo de veneno de serpiente mediante el ensayo de Wester Blot. Estas proteínas fueron la metaloproteina I y III y fosfolípido A2.
4. Mediante el uso del SEM y de la microscopia óptica se determinó la forma y el tamaño de las microcápsulas. El tamaño promedio fue de 500 μm y posee la forma de una esfera irregular.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adolfo, R., y Huertas, P. Revisión: Microencapsulación de Alimentos Food Microencapsulation: A Review. Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín, 63(2), 5669–5684 (2010).
2. Ambrósio J, Namur DM, Magalhães EC De, Quintilio W, Helena M, Santana A, et al. Poly-lactide-co-glycolide Microparticle Sizes : A Rational Factorial Design and Surface Response Analysis. 6(8):2403–7. (2006)
3. Astray, G., Mejuto, J., Rial, R., González, C. and Simal, J. A review on the use of cyclodextrins in foods. FoodHydrocolloids. 1631-1640. (2009).
4. Avgoustakis, K. Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Second Edition - Four Volume Set, Scheme 2, 2259–2269. https://doi.org/10.1201/b18990-216. (2008).
5. AYARZA J. Extracción y caracterización de alginato de sodio procedente del alga parda Macrocystis sp. [tesis de bachiller. *PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ]*. https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/20.500.12404/6443/AYARZA_JORGE_LUIS_ALGINATO_MACROSYSTIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y. (2015).
6. Bellido, Candy, Lazo, Fanny, Ortiz, César, Rodríguez, Edith, & Yarlequé, Armando. Purificación y caracterización de una hemorragina de alto peso molecular presente en el veneno de la serpiente Bothrops Pictus. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *82*(2), 142-151. Recuperado en 13 de febrero de 2024, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2016000200005&lng=es&tlng=es. (2016).
7. Borgogna, M.; Bellich, B.; Zorzin, L.; Lapasin, R. and Cesàro, A. 2010. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. FoodChemistry. 416-423.
8. Campbell J.; Lamar W. The venomous reptiles of Latin America. New York: Crustock Publishing Associated; (1989)
9. Castro-Rosas J, Gómez-Aldapa CA, Chávez-Urbiola EA, Hernández-Bautista M, Rodríguez-Marín ML, Cabrera-Canales ZE, et al. Characterisation, storage

viabilit, and application of microspheres with Lactobacillus paracasei obtained by the extrusion technique. International Journal of Food Science & Technology. 56(4):1809-17.(2021)

10. Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. Current Opinion in Biotechnology. 18(2):184-90. (2007)
11. Chan ES, Lee BB, Ravindra P, Poncelet D. Prediction models for shape and size of ca-alginate macrobeads produced through extrusion-dripping method. J Colloid Interface Sci. 2009 Oct 1;338(1):63-72. doi: 10.1016/j.jcis.2009.05.027. Epub 2009 May 19. PMID: 4515. (1960)
12. Chantawongvuti R, Veerajetbodithat J, Jaturapiree P, Muangnapoh C. Immobilization of Lactobacillus salivarius ATCC 11741 on Loofa Sponge Coated with Chitosan for Lactic Acid Fermentation. Journal of Microbiology and Biotechnology. 20(1):110-6. (2010)
13. Ching SH, Bansal N, Bhandari B. Alginate gel particles-A review of production techniques and physical properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 57(6):1133-52. (2017)
14. Costa, P., & Sausa Lobo, J. M. Modeling and comparison of dissolution profiles. European Journal of Pharmaceutical Sciences: 13, 123-133. doi: 10.1016/s0928-0987(01)00095-1 (2001).
15. Culpi, T. A., Pasqualim, P., Fin, M. T., Sasso, D. G. B., Kaminski, G. A. T., Fujiwara, G. M., Nunes, P. M. P., Rodrigues, B. H., Dias, J. F. G., & Zanin, S. M. W. IMPORTÂNCIA DE PARÂMETROS DE CONTROLE NA ELABORAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE Ca2+- ALGINATO. Visão acadêmica, 11(1). https://doi.org/10.5380/acd.v11i1.21352 (2010).
16. Desobry, S.A., Netto, F.M. and Labuza, T.P. Comparison of spray drying, drum drying and freeze drying for -carotene encapsulation and preservation. Journal of Food Science, 62(6), 1158- 1162 (1997).
17. Dhalendra K, Utsav V, Nagesh Dewangan, Partha Jana, Ankit Jain DJ. Alginate as Promising Natural Polymer for Pharmaceutical, Food, and Biomedical Applications. Vol. 20. (2020).
18. Dong QY, Chen MY, Xin Y, Qin XY, Cheng Z, Shi LE, et al. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. International

Journal of Food Science and Technology. 48(7):1339-51 (2013).

19. Dounighi NM, Vaccine R, Zolfagharian H, Vaccine R, Rezayat M. Preparation, characterization and stability investigation of chitosan nanoparticles loaded with the Echis carinatus snake venom as a novel delivery system. Arch Razi Inst. 70(December):269–77 (2015).
20. Dounighi, N. M., Damavandi, M., Zolfagharian, H., & Moradi, S. Z. (2012). تهیه اسکورپیوس هی عقرب سم حاوی کایتوزان نانوپارتیکل خصوصیات بررسی و رسانی ژن آنتی نوین سیستم بعنوان (گادیم) لپتوروس. *DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)*. https://doi.org/10.22092/ari. 103899 (2016).
21. Dounighi, NM, Eskandari, R., Avadi, Zolfagharian, H., Sadeghi, A. y Rezayat, M. Preparación y caracterización in vitro de nanopartículas de quitosano que contienen veneno de escorpión Mesobuthus eupeus como sistema de liberación de antígenos. *La revista de animales venenosos y toxinas, incluidas las enfermedades tropicales* , *18* , 44–52. https://doi.org/10.1590/S1678-91992012000100006 (2012).
22. Draget KI, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Alginates from Algae. In Biopolymers Online. (2005).
23. Eckert C, Agnol WD, Dalle D, Serpa VG, Maciel MJ, Lehn DN, et al. Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology: Effects of matrix composition on the protection of Lactobacillus spp. from adverse conditions. Food Research International. 113:65-73 (2018).
24. Esquivel G, B.E.; Ochoa M, L.A.; Rutiaga-Quiñones, O.M. Micro. Encapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos Revista Iberoamericana de Tecnología Post cosecha, vol. 16, núm. 2, pp. 180-192 Asociación Iberoamericana de Tecnología, S.C. Hermosillo, México (2015).
25. Fang, Z. and Bhandari, B. Encapsulation of polyphenols - a review. Trends in FoodScience&Technology. 510-523 (2010).
26. Ford V, A. N., Pack, D. W., & Braatz, R. D. Mathematical modeling of drug delivery from autocatalytically degradable PLGA microspheres - A review. Journal of Controlled Release: 165(1), 29–37. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.10.015 (2013).
27. Frakolaki G, Giannou V, Topakas E, Tzia C. Effect of various encapsulating agents on the beads' morphology and the viability of cells during BB-12

encapsulation through extrusion. Journal of Food Engineering: 294:10 (2021).

28. Fredenberg, S., Wahlgren, M., Reslow, M., & Axelsson, A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. International Journal of Pharmaceutics, 415(1–2), 34–52. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.05.049 (2011).
29. Gbassi GK, Vandamme T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. Pharmaceutics. 4(1):149-63 (2012).
30. George M, Abraham TE. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. J Control Release. Aug 10; 114(1):1-14. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.017. Epub 2006 May 22. PMID: 16828914 (2006).
31. Gibbs, Bernard F.; Kermasha, Selim; Alli, Inteaz and Mulligan, Catherine N. Encapsulation in the food industry: a review. International Journal of Food Sciences and Nutrition: 50(3):213-224 (1999).
32. Gonzáles I., Fernández C., Ruíz A., & Bermejo, M. Ensayos de disolución y sus correlaciones in vivo-in vitro. *Farmacia Sudamericana, 10(1), 3-21* (noviembre de 2002).
33. Green, B.K, Scheicher, L. pressure SensitiveRecord Materials. US Patent2:217,507, ner C, (1955).
34. Helgerud, Trond; Gåserød, Olav; Fjæreide, Therese; Andersen, Peder O. and Larsen, Christian K. Alginates. In Food stabilizers, thickeners and gelling agents. (pp. 50-72). United Kingdom: WileyBlackwell (2010).
35. Henriquez C., Maguiña C., Gotuzzo, E., & Legua, P. Ofidismo por Bothrops pictus en el Hospital Nacional Cayetano Heredia: Estudio prospectivo de 23 casos. *Folia Dermatológica Peruana*, *9*(1-2) (1998).
36. Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of reléase of solid drugs dispersed in solid matrices. Journal of pharmaceutical Sciences, 52(12), 1145-1149. doi:10.1002/jps.2600521210 (Diciembre de 1963).
37. Hines, D. J., & Kaplan, D. L. Poly (lactic-co-glycolic acid) controlled release systems: experimental and modeling insights. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 30(3), 257–276. https://doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2013006475 https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.014 (2013).

38. Huertas, P. y Adolfo, R. REVISIÓN: MICROENCAPSULACIÓN DE ALIMENTOS. *Revista Facultad Nacional De Agronomía Medellín* , *63* (2), 5669–5684. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-28472010000200020&script=sci_arttext (2010).

39. Hunt JA, Chen R, van Veen T, Bryan N. Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. Journal of Materials Chemistry B. 2(33):5319-38 (2014).

40. Ito, F., Takahashi, T., Kanamura, K., & Kawakami, H. Possibility for the development of cosmetics with PLGA nanospheres. Drug Development and Industrial Pharmacy, 39(5), 752–761. https://doi.org/10.3109/03639045.2012.696653 (2013).

41. Rocha K, Gláucia F, Daniele A MT-R, , Kelly de Araújo YAS de M 1 I, Zumba I, Vilarinho D, Arnóbio Antônio da Silva-Júnior and M de FF-P. Antivenom Production against Bothrops jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Using Cross-Linked Chitosan Nanoparticles as an Immunoadjuvant. Toxins (Basel). (2018)

42. Khotimchenko YS, Kovalev VV, Savchenko OV, Ziganshina OA. Physical–Chemical Properties, Physiological Activity, and Usage of Alginates, the Polysaccharides of Brown Algae. Russian Journal of Marine Biology. 27(1):S53-S64 (2001).

43. Korsmeyer, R. W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., & Peppas, N. A. *Mechanis of solute reléase form porus hydrophilic polymers. International Journal of Pharmaceutics, 15(1), 25-35.* doi:10.1016/0378-5173(83)90064-9 (Mayo de 1983).

44. Laustsen AH. Toxin-centric development approach for next-generation antivenoms. 150:195–7 (2018).

45. Lee Y, Ji YR, Lee S, Choi MJ, Cho Y. Microencapsulation of Probiotic Lactobacillus acidophilus KBL409 by Extrusion Technology to Enhance Survival under Simulated Intestinal and Freeze-Drying Conditions. Journal of Microbiology and Biotechnology. 29(5):721-30 (2019).

46. León G, Herrera M, Segura Á, Villalta M, Vargas M, Gutiérrez JM. Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms. Toxicon [Internet]. 76:63–76. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.09.010 (2013).

47. Li L, Wang Q, Li H, Yuan M, Yuan M. Preparation , Characterization , In Vitro Release and Degradation of Cathelicidin-BF-30-PLGA Microspheres. 9(6):1–7 (2014).
48. Loksuwan, J. Characteristics of microencapsulated β-carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. FoodHydrocolloids. 928-935 (2007).
49. López C.A.F. Desarrollo de sistemas de encapsulación compuestos para la protección de extractos antioxidantes de yerba mate. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. 56-60 (2012).
50. Machatschek, R., & Lendlein, A. Fundamental insights in PLGA degradation from thin film studies. Journal of Controlled Release, 319, 276–284. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.12.044 (2020).
51. Maguiña-Vargas, C., Chincha-Lino, O., Vilcapoma-Balbín, P., & Morante, D. Actualización en clínica y terapia de mordedura de serpiente (ofidismo). Revista medica herediana : organo oficial de la Facultad de Medicina "Alberto Hurtado", Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru, *31*(1), 48–55. https://doi.org/10.20453/rmh.v31i1.3729 (2020).
52. Mctigue WCB, Perry SL. Protein Encapsulation Using Complex Coacervates: What Nature Has to Teach Us. 1907671:1–17 (2020)
53. Mesías M, Lazo F, Yarlequé A. Purificación y caracterización de un nuevo principio coagulante del veneno de la serpiente peruana Bothrops pictus. Revista de la Sociedad Química del Perú [77(3):182–90. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810634X2011000300003&script=sci_arttext (2011).
54. Mofidi, N.; Aghai-Moghadam, M. y Sarbolouki, MN. Preparación masiva y caracterización de microesferas de alginato. Bioquímica de procesos. 35(9):885-888 (2000).

Morris ER, Rees DA, Thom D, Boyd J. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerization process in alginate gelation. Carbohydrate Research. 66(OCT):145-54 (1978).

55. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Sada A, Orlando P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated Lactobacillus acidophilus and survival under simulated gastrointestinal conditions. Journal of Functional Foods. 1(3):319-23 (2009).

56. NEDOVIC, Viktor, et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. En: Procedia food science. vol. 1, p. 1806-1815.
57. OMS. Mordeduras de serpientes venenosas. (2021).
58. Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. In Journal of Nanobiotechnology (Vol. 16, Issue 1, p. 71). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8 (2018).
59. Peppas, N. Chemical and Physical Structure of Polymers as Carriers for Controlled Release of Bioactive Agents: A Review. Journal of Macromolecular Science, Part C, 23(1), 61–126. https://doi.org/10.1080/07366578308079439 (1983).
60. Prutto, M. *Fundamentos de fisicoquímica.* Mexico: Limusa, S.A (2002).
61. Putney SD. Encapsulation of proteins for improved delivery. :548–52.
62. Ramos PE, Cerqueira MA, Teixeira JA, Vicente AA. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 58(11):1864-77 (2018).
63. Ravi S, Peh KK, Darwis Y, Murthy BK, Singh TRRAJ, Mallikarjun C. Development and Characterization of Polymeric Microspheres for Controlled Release Protein Loaded Drug Delivery System. :303–9.
64. REDONDO L. Estudios de equivalencia in vitro de formulaciones genéricas. [tesis de bachiller, Universidad Complutense]. Repositorio institucional de la universidad Complutense https://eprints.ucm.es/48872/1/LAURA%20REDONDO%20FLOREZ%20%281%29.pdf (2015).
65. Robert, P., Carlsson, R.M., Romero, N. y Masson L. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosamosqueta (Rosa rubiginosa) oleoresin. Journal of the American OilChemists´ Society. Vol. 80, Número 11, 2018, páginas 1115-1120 (2003).
66. Rocha K, Gláucia-Silva F, Daniele-Silva MT-R, Nathália Kelly de Araújo YAS de M 1 I, Igor Zumba Damasceno, Denise Vilarinho Tambourgi, Arnóbio Antônio da Silva-Júnior and M de FF-P. Antivenom Production against Bothrops

jararaca and Bothrops erythromelas Snake Venoms Using Cross-Linked Chitosan Nanoparticles as an Immunoadjuvant. Toxins (Basel) (2018).

67. Santinho, A.J.P., Ureta, J.M., Freitas, O. y Pereira N.L. Physicochemical characterization and enzymatic degradation of casein microcapsules prepared by aqueous coacervation. Journal of Microencapsulation. 549-559 (2002).
68. Setapa, A., Ahmad, N., Mahali, S. M., & Amin, M. C. I. M. Mathematical model for estimating parameters of swelling drug delivery devices in a two-phase release. Polymers, 12(12), 1–15. https://doi.org/10.3390/polym12122921 (2020).
69. Silva MP, Tulini FL, Ribas MM, Penning M, Favaro-Trindade CS, Poncelet D. Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by coextrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes. Food Research International: 89: 582-90 (2016).
70. Silvarrey MC. "Caracterización, producción y encapsulación de proteínas CAPs de Echinococcus granulosus para el desarrollo de una nanovacuna (2015).
71. Steve J. Compton, Clive G. Jones, Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, Analytical Biochemistry, Volume 151, Issue 2, Pages 369-374, ISSN 0003-2697, https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3. (https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269785901903) (1985),
72. Su Y, Gu L, Zhang Z, Chang C, Li J, Julian D, et al. Encapsulation and release of egg white protein in alginate microgels : Impact of pH and thermal treatment. Food Res Int 120305–11. Available from: https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.048 (2019).
73. Takahiro Funami, Yapeng Fang, Sakie Noda, Sayaka Ishihara, Makoto Nakauma, Kurt I. Draget, Katsuyoshi Nishinari, Glyn O. Phillips, Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca2+ binding, Food Hydrocolloids, Volume 23, Issue 7, Pages 1746-1755, ISSN 0268-005X (2009),
74. Torres JJ. Comparación de la cinética de disolución de medicamentos de pantoprazol sódico en el mercado: Revisión bibliográfica. repositorioxocuammx [Internet]. [cited 2023 Apr 21]; Available from: https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/25094 (2021).

75. Trindade RA, Kiyohara PK, Araujo PS De, Bueno MH. PLGA microspheres containing bee venom proteins for preventive immunotherapy. Int J Pharm [Internet]. 423(1):124–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.027 (2012).
76. Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. ChemInform Abstract: Polymeric Systems for Controlled Drug Release. ChemInform, 31(3), nono. https://doi.org/10.1002/chin.200003275 (2010).
77. Vásquez R.M, *Comparación de la cinética de disolución de medicamentos de pantoprazol sódico en el mercado : Revisión bibliográfica*. https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/25094
78. Wagner, L. y Warthesen, J. 1995. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. Journal of FoodScience. 1048-1053 (2021).
79. Wang JP, Zhao XP, Guo HL, Zheng Q. Preparation of microcapsules containing two-phase core materials. Langmuir. Dec 7;20(25):10845-50. doi: 10.1021/la0490902. PMID: 15568832 (2004).
80. Xu, J., Chen, Y., Jiang, X., Gui, Z., & Zhang, L. Development of hydrophilic drug encapsulation and controlled release using a modified nanoprecipitation method. Processes, 7(6). https://doi.org/10.3390/pr7060331 (2019).
81. Yañez J., Salazar J. A. S., Martinez, L. C., & Ramos-Ramírez, E. G. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *ResearchGate*. https://www.researchgate.net/publication/271836989_Aplicaciones_biotecnologicas_de_la_microencapsulacion (2002).
82. Yáñez J., Salazar J.A., Chaires L., Jiménez J., Márquez M. y Ramos E.G. (Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avance y Perspectiva. 313- 319 (2002).
83. Yarlequé, Mirtha, Ortiz, César, Morante, Yolanda, & Armando, Yarlequé. Estudio comparativo de algunas propiedades bioquímicas de venenos de serpientes de diferentes regiones del mundo. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, *78*(1), 27-36. Recuperado en 22 de enero de 2024, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2012000100004&lng=es&tlng=es (2012).
84. Ye C, Chi H. A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches , applications and challenges. Mater Sci Eng C. 83(August

2017):233–46 (2018)

85. Yong K., & Mooney, D. Alginate: properties and biomedical applications. Prog Polym Sci., 106-126 (2013).

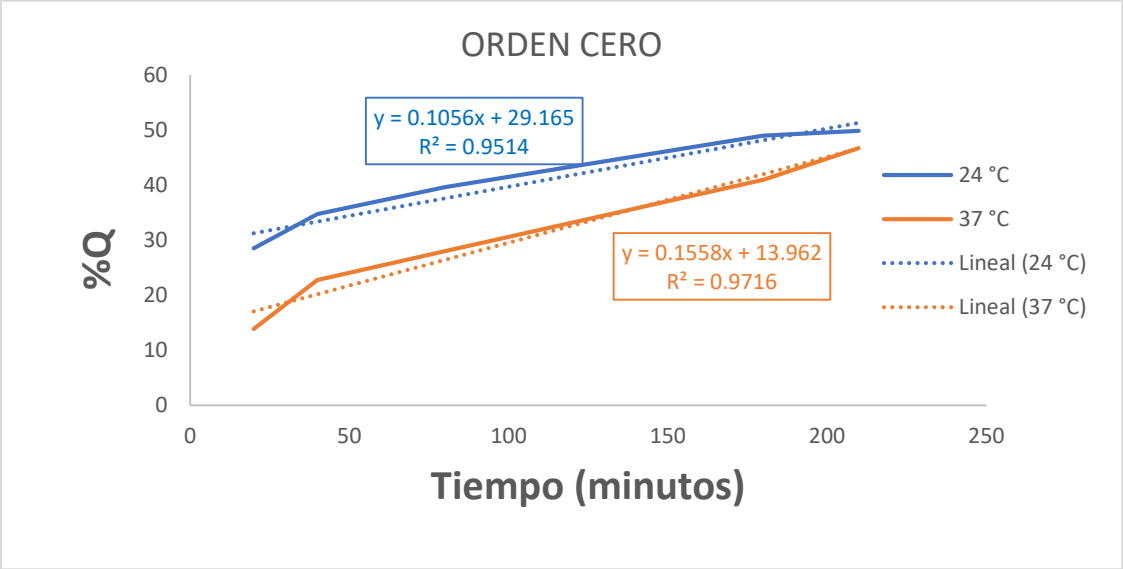
86. Yu L, Ding JD. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. Chemical Society Reviews. 37(8):1473-81 (2008).

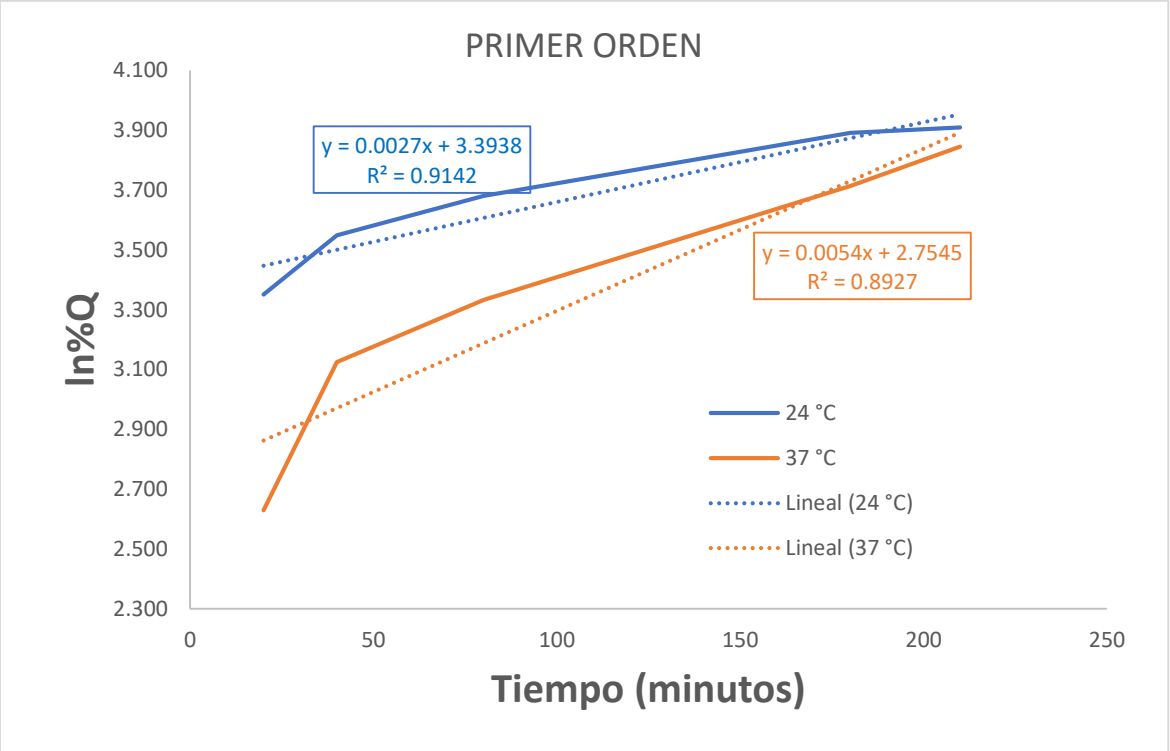
87. Zhou, S., Deng, X., & Li, X. Investigation on a novel core-coated microspheres protein delivery system. *Journal of Controlled Release*, *75*(1-2), 27-36. https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00379-0 (2001).

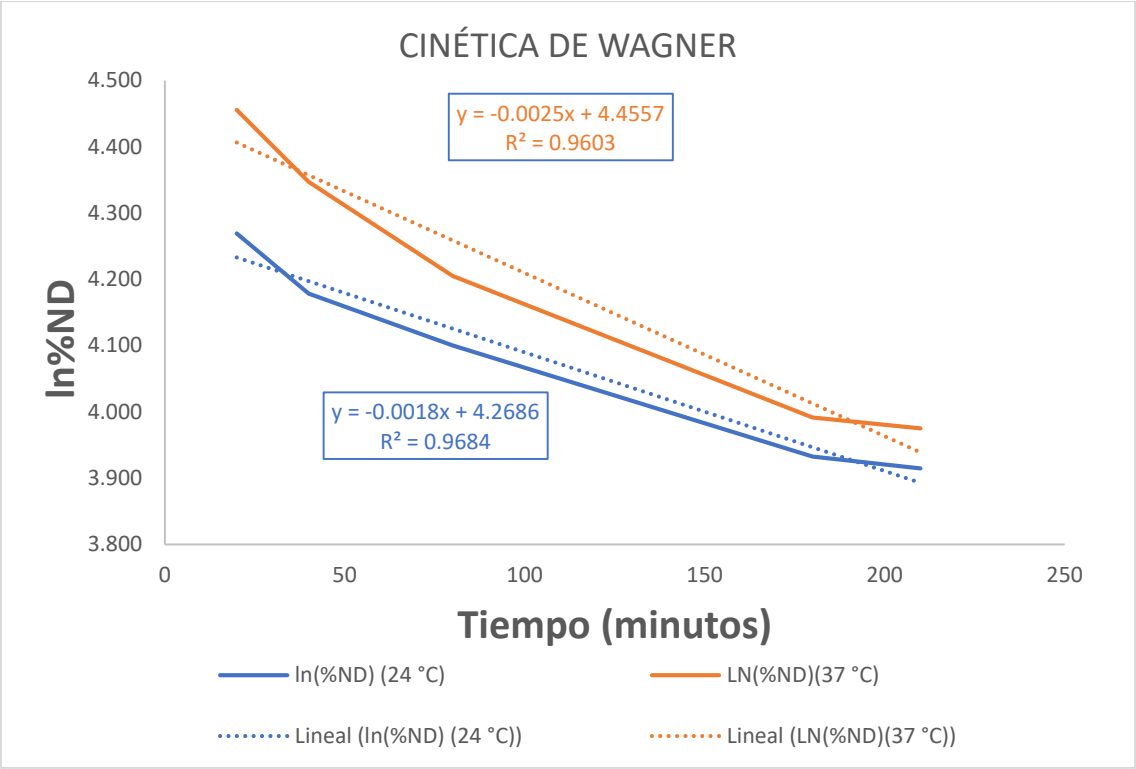
88. Zhu, Z., Min, T., Zhang, X., & Wen, Y. Microencapsulation of thymol in poly(lactide-co-glycolide) (PLGA): Physical and antibacterial properties. Materials, 12(7). https://doi.org/10.3390/ma12071133 (2019).

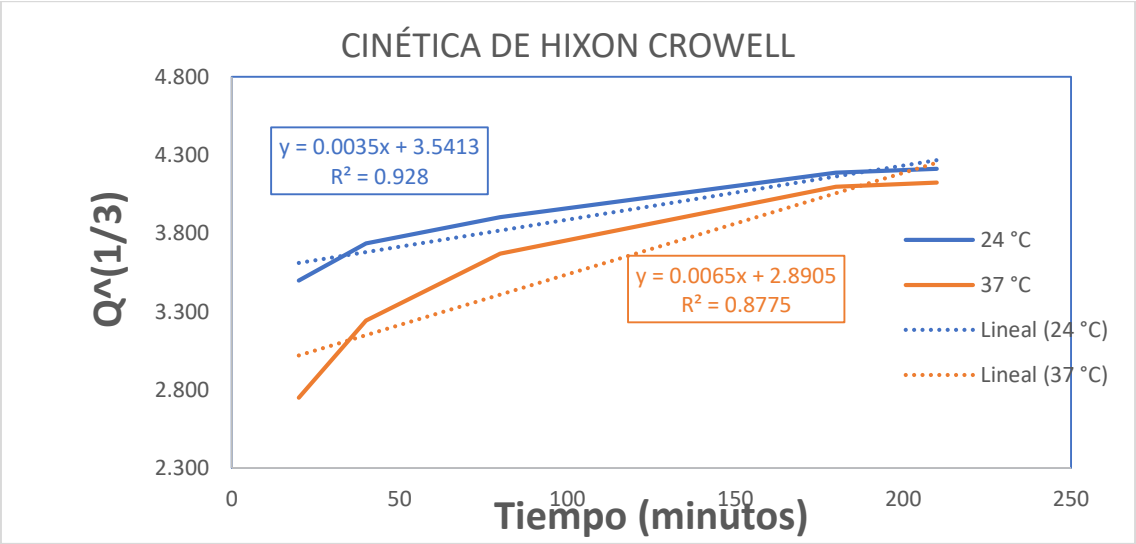
VII. ANEXOS

ANEXO N°1: Modelamiento matemático de la cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizado con alginato de sodio al 0.50%.

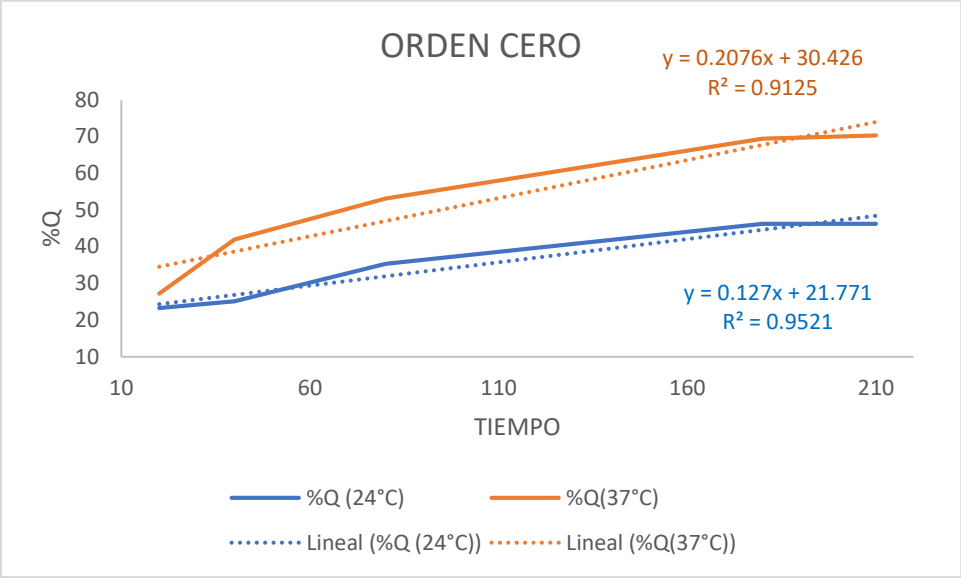


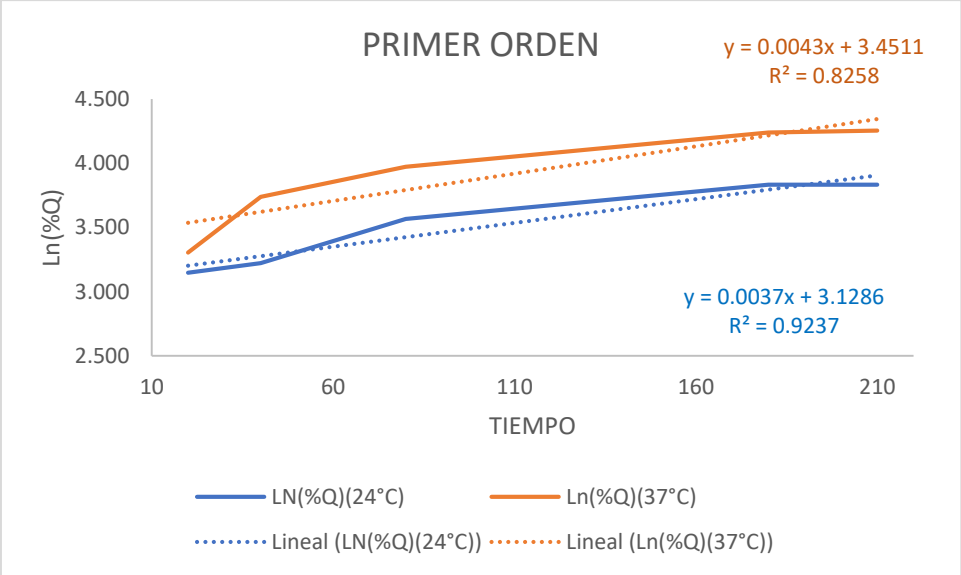


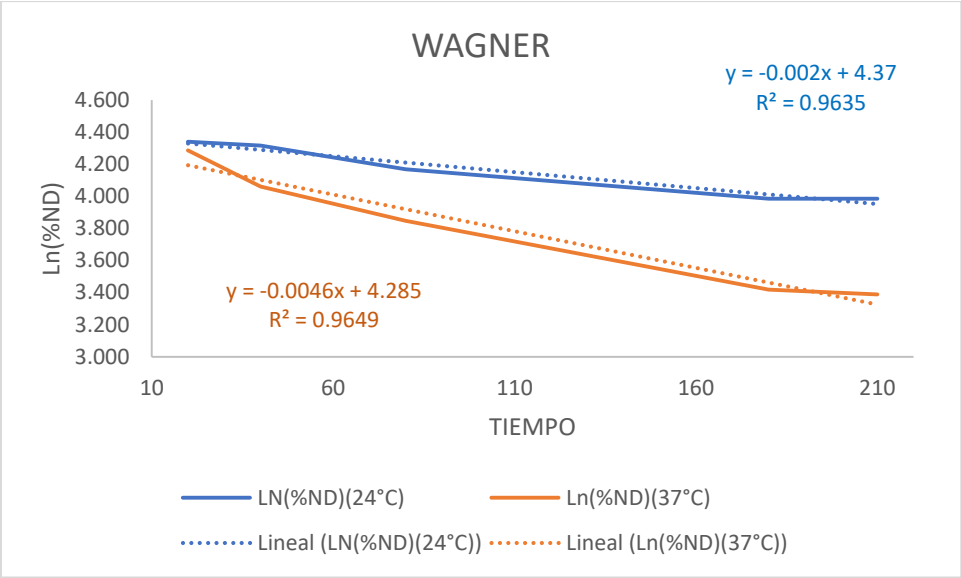

CINÉTICA DE WAGNER
y = -0.0025x + 4.4557
R² = 0.9603
y = -0.0018x + 4.2686
R² = 0.9684
ln%ND
4.500
4.400
4.300
4.200
4.100
4.000
3.900
3.800
0
50
100
150
200
250
Tiempo (minutos)
ln(%ND) (24 °C)
LN(%ND)(37 °C)
Lineal (ln(%ND) (24 °C))
Lineal (LN(%ND)(37 °C))

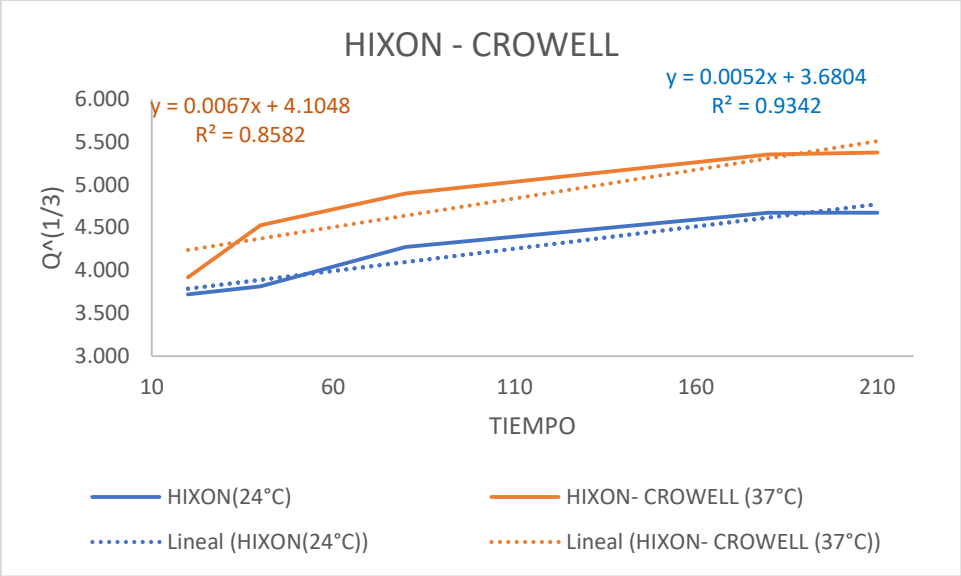

CINÉTICA DE HIXON CROWELL
y = 0.0035x + 3.5413
R² = 0.928
y = 0.0065x + 2.8905
R² = 0.8775
Q^(1/3)
4.800
4.300
3.800
3.300
2.800
2.300
0
50
100
150
200
250
Tiempo (minutos)
24 °C
37 °C
Lineal (24 °C)
Lineal (37 °C)

ANEXO N° 2: Modelamiento matemático de la cinética de liberación del extracto crudo de veneno de serpiente inmovilizado con alginato de sodio al 0.75%.






WAGNER
y = -0.002x + 4.37
R² = 0.9635
y = -0.0046x + 4.285
R² = 0.9649
Ln(%ND)
4.600
4.400
4.200
4.000
3.800
3.600
3.400
3.200
3.000
10
60
110
160
210
TIEMPO
LN(%ND)(24°C)
Ln(%ND)(37°C)
Lineal (LN(%ND)(24°C))
Lineal (Ln(%ND)(37°C))


HIXON - CROWELL
y = 0.0052x + 3.6804
R² = 0.9342
y = 0.0067x + 4.1048
R² = 0.8582
Q^(1/3)
6.000
5.500
5.000
4.500
4.000
3.500
3.000
10
60
110
160
210
TIEMPO
HIXON(24°C)
HIXON- CROWELL (37°C)
Lineal (HIXON(24°C))
Lineal (HIXON- CROWELL (37°C))

ANEXO N° 3: Espectrofotómetro UV – Vis T7S



ANEXO N° 4: Potenciómetro HANNA HI 2211



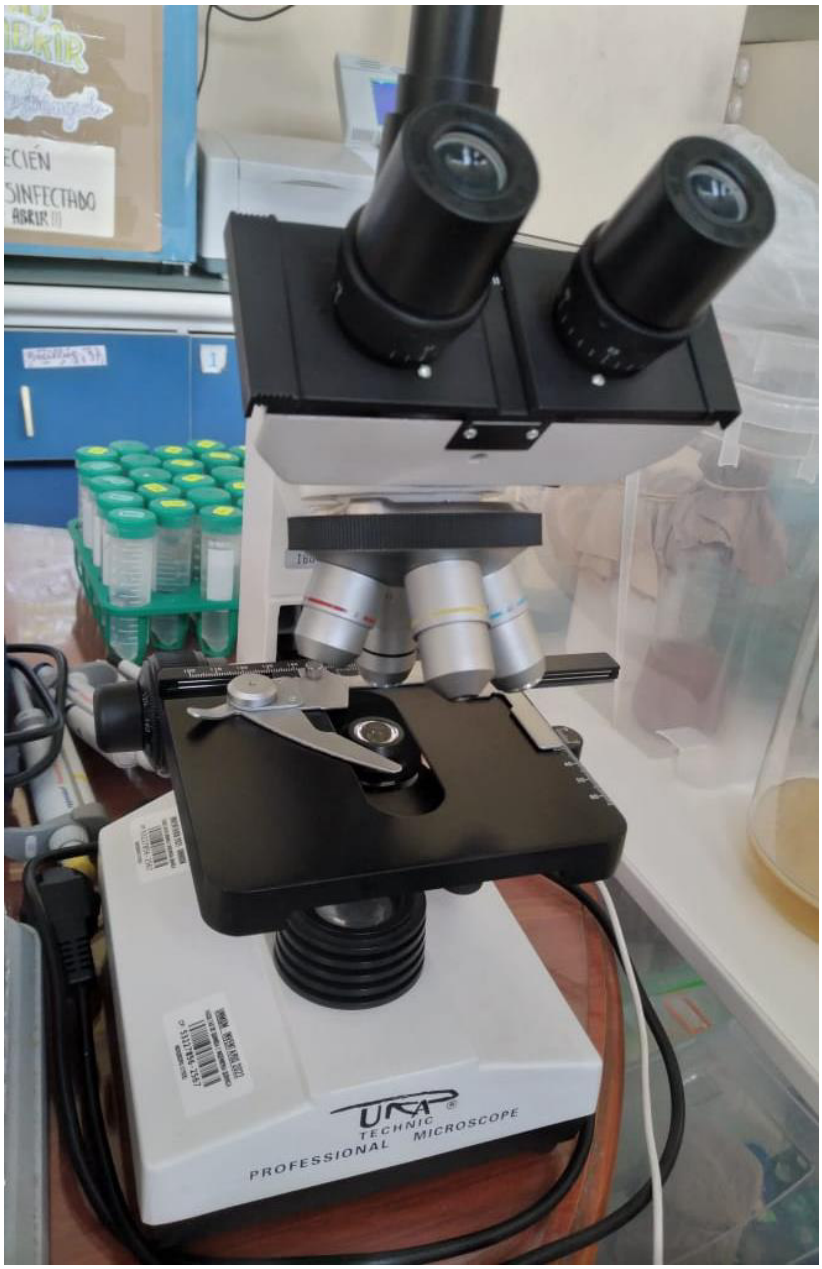
ANEXO N° 5: Incubadora agitadora



ANEXO N° 6: Autoclave



ANEXO N° 7: Microscopio electrónico.



ANEXO N° 8: Agitador



Anexo N° 9. Comparación del porcentaje de los monómeros del alginato de sodio de diferentes marcas.

	ALGINATO		
	Sigma	**Chino**	**Protanal**
% másico monómero M	74.7	81.1	29.7
% másico monómero G	25.3	19	70.3
Relación M/G	3.1	4.4	0.4

Anexo N° 10. Valores y cálculos matemáticos para determinar los parámetros de los modelos matemáticos.

tiempo	ABSORBANCIA	Q	ND
20	0.351	21	129
40	0.371	34	116
80	0.394	49	101
180	0.423	69	81
210	0.425	70	80

Q	Cantidad hidrolizada
ND	Cantidad no disuelta

Concentración inicial del ECVS = **150** ppm

Ecuación de la curve de calibración de la proteína Albúmina suero de bovino.

$$y = 0.0015x + 0.3198$$

Los valores de la cantidad hidrolizada se determinaron reemplazando los valores de la absorbancia en la ecuación lineal anterior, donde *y* representa la absorbancia y *x* representa la concentración del ECVS en los diferentes tiempos evaluados.

$$y = 0.0015x + 0.3198$$

$$0.351 = 0.0015x + 0.3198$$

$$0.351 - 0.3198 = 0.0015x$$

$$(0.351 - 0.3198)/0.0015 = x$$

$$20.8\, ppm = x$$

$$21\, ppm \approx x$$

Los valores de las cantidades no disueltas se determinó de la siguiente manera.

$$ND = concentracion\ inicial - Q$$

$$ND = 150 - 21$$

$$ND = 129\, ppm$$

Los demás cálculos se realizaron usando los valores de Q y ND.