



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.**

**MICROESFERAS COMPUESTAS DE PECTINAS Y  
ARABINOXILANOS OBTENIDAS MEDIANTE  
ELECTROASPERSIÓN COAXIAL COMO SISTEMAS  
ACARREADORES DE INSULINA**

---

Por:

Jonathan Alejandro Díaz Baca

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

Agosto 2014

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jonathan Alejandro Díaz Baca, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



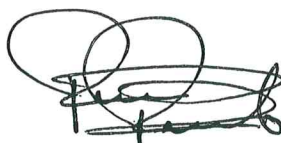
---

Dr. Agustín Rascón Chu  
Director de Tesis



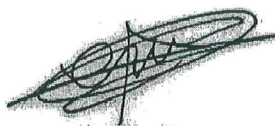
---

Dra. Elizabeth Carvajal Millán  
Asesor



---

Dr. René Balandrán Quintana  
Asesor



---

Dr. José Elías Pérez López  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por el apoyo económico y logístico brindado durante el posgrado. A los **ciudadanos mexicanos** que con sus impuestos impulsan la educación en nuestro país.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo A.C. (CIAD)**, por permitirme ser parte de su programa de posgrados y ofrecerme todas las facilidades necesarias para mi desarrollo profesional y personal.

Agradecer el apoyo económico brindando al proyecto **CONACyT 2012-01-194790**.

Agradecer de sobremanera al **Dr. Agustín Rascón Chu** por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, orientarme y compartir sus conocimientos durante este periodo de trabajo. Siempre con la mejor disposición de apoyarme para sacar a flote el proyecto, pero sobre todo para impulsar mi crecimiento profesional y personal.

A los miembros del comité, a la **Dra. Elizabeth Carvajal Millan** por su apoyo incondicional, su amplio conocimiento, y su excelente calidad humana; al **Dr. José Elías Pérez López** por su aportación técnica y teórica en la realización de este proyecto y especialmente por recibirme de la mejor manera en su grupo de trabajo; al **Dr. René Balandrán Quintana** por sus comentarios, sugerencias, y aportaciones de gran precisión y siempre con la finalidad de mejorar.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Industrial, especialmente al **M.C. Alfonso Sánchez Villegas** por su apoyo técnico, su excelente disposición de trabajo y sobre todo su amistad.

Muy especialmente a los integrantes del Laboratorio de Biopolímeros, que fue como si lugar de trabajo adoptivo, por su total apoyo tanto al proyecto como a mi persona. A las **M.C. Karla G. Martínez Robinson, Q.B. Alma C. Campa Mada y M.C. Alma R. Toledo Guillén** por su apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

Al los integrantes del Laboratorio de Polímeros del Instituto de Física (UASLP), por su gran aporte a este trabajo y su apoyo durante la estancia realizada en sus instalaciones. A la **Q.F.B. Ma. de Lourdes González González** por su apoyo técnico.

Al **Dr. Humberto González Ríos** por su aporte y conocimientos en el desarrollo del diseño experimental y análisis estadísticos de este proyecto.

Al **Dr. Arland T. Hotchkiss Jr.**, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio (ERRC-USDA), y fortalecer este trabajo.

Por último, pero no menos importante, a todos **mis compañeros y seres queridos** que estuvieron conmigo en las buenas y en la malas durante todo este tiempo, mi más sincero agradecimiento.

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, Martin Díaz Estrada y Reyna Baca Pérez, porque sin su amor, apoyo y enseñanzas nada de esto hubiese sido posible, con todo mi amor les dedico este trabajo.*

*Per Ardua Ad Astra*

## CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Justificación.....	2
Hipótesis.....	3
Objetivo General .....	3
Objetivos Específicos .....	3
<b>CAPITULO II. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
Materiales Acarreadores de Bioactivos .....	4
Liberación Controlada de Bioactivos .....	4
Microestructurados y Nanoestructurados .....	5
Polisacáridos como Acarreadores .....	6
Fabricación por Electroaspersión .....	6
Pectinas .....	7
Características Físicoquímicas .....	7
Tipos de Pectina .....	8
Propiedades de Gelificación .....	8
Fuentes de Obtención .....	10
Aplicaciones.....	10

## CONTENIDO (Continuación)

Arabinosilanos.....	11
Características Fisicoquímicas .....	12
Propiedades Reológicas .....	13
Gelificación Enzimática.....	13
Fuentes de Obtención .....	14
Aplicaciones.....	15
Liberación de Bioactivos Dirigidos a Colon .....	16
Fisiología y Anatomía del Colon .....	16
Aspectos de la Absorción en Colon .....	17
Tamaño de Partícula y sus Implicaciones.....	18
Insulina.....	19
Estructura y Propiedades.....	20
Tratamiento de Diabetes Mellitus .....	20
<b>CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
Disminución del Grado de Esterificación de Pectina .....	22
Preparación de Soluciones de Trabajo .....	23
Solubilización de la Insulina .....	23
Reología Dinámica de Baja Deformación.....	24
Fabricación de las Esferas .....	25
Tamaño y Distribución de las Esferas por Dispersion Dinamica de Luz (DDL) .....	27
Análisis Técnicas de Microscopía .....	27
Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) .....	27
Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) .....	28
Microscopía Óptica de Barrido Laser Confocal (MBLC) .....	28
Diseño Experimental .....	29



## CONTENIDO (Continuación)

Fabricación post-optimización .....	31
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>33</b>
Grado de Esterificación .....	33
Reología de las Soluciones de Trabajo .....	34
Morfología y Tamaño de las Esferas .....	40
Análisis Estadístico .....	45
Análisis de Superficie de Respuesta para Tamaño de Partícula .....	46
Análisis de Superficie de Respuesta para Coeficiente de Variación (CV) .....	53
Análisis post-optimización .....	58
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>66</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura

1	Esquema general del sistema de electroaspersión.....	26
2	Espectros de absorción FT-IR para pectina de manzana de aclareo (PMA) y pectina de manzana de aclareo desesterificada (PMAD).....	33
3	Cinética de gelificación de la solución de PMAD.....	37
4	Cinética de gelificación de la solución de Arabinosilanos ferulados (AXF).....	37
5	Cinética de gelificación de la solución de AXF + Insulina.....	39
6	Cinética de gelificación de la solución compuesta de PMAD y AXF.....	39
7	Imágenes de MEB .....	42
8	Imágenes de MET.....	43
9	Imágenes de MBLC.....	43
10	Gráfico de superficie de respuesta para tamaño de partícula, contra voltaje y concentración de etanol.....	49
11	Gráfico de superficie de respuesta para tamaño de partícula, contra la interacción de flujo y voltaje.....	49
12	Gráficos de superficie de respuesta para tamaño de partícula en la interacción de voltaje con Concentración de $\text{CaCl}_2$ , y entre el flujo y la concentración de $\text{CaCl}_2$ .....	51
13	Gráfico de superficie de respuesta para la respuesta de tamaño de partícula frente a la interacción en la solución entrecruzante.....	51
14	Gráficos de perfil de predicción para tamaño de partícula....	52
15	Gráfico de superficie de respuesta para el efecto cuadrático de la concentración de $\text{CaCl}_2$ sobre el coeficiente de variación de tamaño de partícula.....	56
16	Gráfico de superficie de respuesta para el efecto cuadrático de la concentración de $\text{CaCl}_2$ sobre el coeficiente de variación de tamaño de partícula.....	56

## LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

17	Graficos de perfil de predicción para CV.....	57
18	Imágenes de MEB de la morfología de partículas fabricadas post optimización: D1, D2 y E1, E2.....	59
19	Imágenes de MEB de la morfología de partículas fabricadas post optimización: A1, A2, B1, B2, C1, C2.....	60
20	Diámetros promedio de las partículas post-optimización.....	62

## LISTA DE TABLAS

Tabla

1	Funciones y enzimas más destacadas de los órganos del tracto gastrointestinal.....	17
2	Ensayos de reología dinámica de baja deformación de las diferentes soluciones de polisacáridos.....	24
3	Diseño experimental con los diferentes niveles ensayados para cada factor .....	30
4	Valores codificados de las diferentes corridas experimentales para la fabricación de esferas por electroaspersión .....	30
5	Condiciones de fabricación usadas en el proceso post-optimización.....	31
6	Tiempos de gelificación (tg) y valores finales del módulo de elasticidad ( $G''$ ) de las soluciones de trabajo.....	35
7	Detalles de coeficiente de regresión, error estándar y significancias para el modelo de segundo orden del tamaño de partícula.....	47
8	Detalles de coeficiente de regresión, error estándar y significancias para el modelo de segundo orden de coeficiente de variación.....	55
9	Estadística descriptiva de las muestras analizadas por MEB y procesadas en Image2X .....	61

## RESUMEN

La epidemia de diabetes ocupa los primeros lugares de mortalidad en nuestro país. Actualmente, casi diez millones de personas padecen esta enfermedad, de las cuales 1 millón tiene la diabetes tipo I. La administración de insulina vía subcutánea provoca abandono del tratamiento, y es por eso que diversas investigaciones a nivel mundial se han enfocado a desarrollar nuevos métodos de administración por vías oral y nasal, entre otras; algunos de estos métodos incluyen el uso de matrices biopoliméricas como acarreadores. Las pectinas y los arabinosilanos se proponen en el presente trabajo como matrices acarreadoras de insulina debido a sus propiedades gelificantes, y biodegradables. Se complementó la formación rápida del gel de pectina con la estabilidad del gel covalente de arabinosilanos, para fabricar microesferas del tipo núcleo-coraza por el método de electroaspersión coaxial. Para optimizar el proceso de fabricación los factores fueron: el flujo, el voltaje, concentración de sales y solvente de la solución entrecruzante. Las variables estudiadas fueron tamaño de partícula y dispersión de tamaños. Para la determinación de dichas variables se usaron las técnicas de difracción dinámica de luz, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, y microscopía de barrido laser confocal. Se obtuvieron estructuras esféricas estables y sin agregados del tipo núcleo-coraza, con un diámetro promedio menor a 2  $\mu\text{m}$ . Se obtuvieron los modelos estadísticos de optimización con una capacidad predictiva mayor al 70%, para los valores óptimos de tamaño de partícula y coeficiente de variación. Este es un método susceptible de automatización a escala industrial.

Palabras clave: Pectina, arabinosilanos, microesferas, electroaspersión, núcleo-coraza, metodología superficie de respuesta

## ABSTRACT

The diabetes epidemic occupies second place as a cause of death in our country. At the time, nearly ten million people suffer diabetes. From which 1 million shows type I diabetes. Insulin subcutaneous administration causes treatment dismissal; thus, several studies worldwide have focused on developing new methods for oral, nasal and other administration via. Some of these methods include the use of biopolymeric matrices as carriers. Pectins and arabinoxylans are proposed in the present work, as matrices haulers because of their gelling properties, and biodegradability. Complementary rapid formation of pectin gel, to the stability of slow gelling covalent arabinoxylan mechanism, was proposed to make core-shell beads by coaxial electrospray. In order to optimize the fabrication process the main factors explored were: flow, voltage, versus salt concentration and solvent content in a crosslinking solution bed. The variables studied as a response were magnitude and dispersion of particle size. For the determination of these variables, light diffraction techniques, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, and confocal laser scanning microscopy were used. Stable spherical structures of core-shell type were obtained without aggregates, with an average diameter less than 2 microns. Statistical optimization models were obtained with greater predictive power to 70% for the optimal values of particle size and coefficient of variation. This is a method susceptible to automation at industrial levels.

Keywords: Pectin, arabinoxylan, microbeads, electrospray, core-shell, surface response methodology

## **CAPITULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

La diabetes mellitus representa un grave problema de salud a nivel mundial, ha crecido tanto esta enfermedad en los últimos tiempos, que es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una epidemia (W.H.O 2012). Esta enfermedad multifactorial, tiene dos variantes principales, diabetes mellitus, I y II. En la tipo I, el cuerpo no produce insulina, y es necesaria la administración de insulina para sobrellevar y controlar la enfermedad, al igual que en algunos casos avanzados de diabetes tipo II (IDF 2013).

Según el más reciente censo nacional, en México la segunda causa de mortalidad la ocupa la diabetes (INEGI 2012). Datos de la ENSANUT (2012), indican que alrededor de 6.4 millones de adultos mexicanos han sido diagnosticados como diabéticos, de los que el 13.1% reciben tratamiento con insulina.

La administración de insulina vía subcutánea, es la terapia más común en pacientes con diabetes tipo I (ADA 2014), pero esto resulta en una actividad difícil y dolorosa, y en muchas ocasiones lleva al paciente a abandonar el tratamiento. Es por esto, que se buscan nuevos métodos de administración de insulina, que disminuyan los efectos adversos de los tratamientos tradicionales. Una de las propuestas, es la administración vía oral dirigida a colon, usando matrices biopoliméricas como acarreadores (Atchison et al. 1989).

Las condiciones fisiológicas del colon son muy favorables para que la insulina sea liberada en esta parte del intestino (Björk et al. 1993), mas no son su condiciones normales, para que se dé la absorción del péptido. En general, se requiere de un tránsito estable (evitando la exposición al pH y actividad enzimática) a través del tracto gastrointestinal, y evitar la liberación prematura de la insulina antes de su llegada al colon para su administración efectiva, ya que las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal superior, afectan severamente a la insulina, perdiendo su capacidad terapéutica (Gordon Still 2002; Maroni et al. 2012).

Como biopolímeros, las pectinas y los arabinosilanos (ambos polisacáridos de origen vegetal), tienen gran capacidad de retención de agua y los dos poseen la propiedad de gelificación. Asimismo son considerados compuestos no tóxicos, biocompatibles, bioadhesivos y biodegradables. Estas propiedades junto a la poca degradación que sufren en el tracto gastrointestinal superior, los coloca como compuestos muy atractivos en el diseño de matrices de liberación controlada dirigidas a colon (Berlanga-Reyes et al. 2009; Jung et al. 2013).

### Justificación

Debido a las desventajas de la administración de insulina vía subcutánea, es necesario el desarrollo de nuevas formas de administración, como la vía oral, que tiene como objetivo la liberación y absorción de insulina en colon. Lo anterior tiene como fin mejorar la calidad de vida de los pacientes y evitar que abandonen el tratamiento de diabetes mellitus. Con el empleo de matrices biopoliméricas acarreadoras de insulina a base de pectinas de baja esterificación y arabinosilanos ferulados, se podría llegar a un tratamiento basado en la administración oral de insulina. La aplicación complementaria de estos polisacáridos puede facilitar la fabricación por electroaspersión coaxial de estructuras esféricas cargadas con insulina a las escalas industriales.



## Hipótesis

La gelificación conjunta de pectina de bajo grado de esterificación y arabinosilanos ferulados mediante electroaspersión coaxial, permitirá la formación rápida y sin agregación, de microesferas cargadas con insulina. .

## Objetivo General

Fabricar y caracterizar microesferas compuestas de pectinas de bajo grado de esterificación y arabinosilanos ferulados, mediante electroaspersión coaxial, como sistemas acarreadores de insulina.

## Objetivos Específicos

1. Optimizar las condiciones de fabricación de microesferas de pectina de bajo grado de esterificación y arabinosilanos ferulados mediante electroaspersión coaxial.
2. Caracterizar las propiedades estructurales de las partículas formadas, mediante microscopía (electrónica de barrido, electrónica de transmisión, de barrido laser confocal).

## **CAPITULO II**

### **ANTECEDENTES**

#### **Materiales Acarreadores de Bioactivos**

La encapsulación, es un proceso en el que pequeñas partículas líquidas, sólidas o gaseosas (una sustancia activa), son atrapadas dentro de una capa polimérica porosa, que logra contenerlas. El objetivo de encapsular compuestos, es protegerlos de factores ambientales como temperatura, humedad y pH, y así evitar su deterioro, conservando su estabilidad y viabilidad. Asimismo, la encapsulación permite que el compuesto atrapado sea liberado gradualmente de la matriz que lo contiene bajo condiciones específicas en sitios deseados (Parra Huertas 2010).

Las recientes investigaciones se han enfocado en el desarrollo de sistemas nano- y microestructurados, debido a sus ventajas, entre las que destacan la capacidad de ser inyectables y la posibilidad de dirigirlas pasivamente a un sitio determinado (Yu et al. 2009; Matalanis et al. 2011; De Temmerman et al. 2012; Jung et al. 2013). Estos novedosos sistemas brindan nuevas opciones en el desarrollo de productos innovadores con efecto funcional, nutracéutico y terapéutico (Juan et al. 2010; Parra Huertas 2010)

#### **Liberación Controlada de Bioactivos**

Cuando se habla de sistemas de liberación controlada, se refiere a que en estas estructuras la liberación de compuestos bioactivos (proteínas, fármacos, vitaminas, etc.) es paulatina y está controlada por procesos de difusión o

degradación (Yu et al. 2009; Hunter et al. 2012). Unas de las ventajas de estos métodos frente a los sistemas terapéuticos tradicionales, es que presentan menos efectos secundarios, tienen un tiempo de retención prolongado, así como una consecuente mayor duración de la bioactividad, todo esto lleva a mejorar la eficiencia terapéutica (Yu et al. 2009).

Los sistemas de liberación han sido diseñados en una amplia variedad de formas y estructuras. Un tipo de matrices son los sistemas de reservorio. Estos son los más antiguos y el compuesto de carga se encuentra cubierto por una capa polimérica, la cual actúa como reguladora de la velocidad de liberación. Estos sistemas pueden ser nanopartículas con un rango de tamaño 1-200 nm y micropartículas de 0.2-100µm. Aunado a lo anterior, tienen la ventaja de usar polímeros biodegradables y tener un área superficial muy grande.

En cuanto a estructura, existen matrices sólidas e hidrogeles. En las primeras, la estructura está formada por partículas dispersas en una red polimérica sólida y continua. Los hidrogeles pueden ser físicos o químicos. Cuando la liberación de la molécula acarreada es dada por la disolución del gel se consideran físicos, si la liberación del compuesto es por la degradación, hidrólisis y digestión enzimática se consideran químicos. También están los geles que tienden a absorber líquidos por hinchamiento, lo que permite la difusión a través de los poros existentes (Baldwin et al. 1998).

### **Microestructurados y Nanoestructurados**

En la administración vía oral de fármacos, existen dos tipos principales de nano- y micropartículas, las cápsulas y las esferas. En las primeras, el bioactivo está dentro de la estructura, cubierto y rodeado por una membrana polimérica. Las esferas, están compuestas por una matriz donde el fármaco está distribuido por todo el sistema (Hunter et al. 2012). Los polímeros usados en la formación de estos sistemas, se dividen en polímeros sintéticos y naturales.

## **Polisacáridos como Acarreadores**

Los polisacáridos son ampliamente utilizados como acarreadores, pero sólo la celulosa y el almidón son considerados como excipientes estándar (Klein, 2009). La pectina y otros polisacáridos como el quitosano y los arabinosilanos se han estudiado y propuesto como matrices para la liberación de fármacos (Berlanga-Reyes et al. 2009; Yu et al. 2009; Morris et al. 2010) sin embargo no existen reportes de matrices mixtas entre pectina y arabinosilanos. Las ventajas de los polímeros de origen biológico es que se pueden obtener de fuentes renovables, son los polímeros más abundantes en la tierra y además son considerados no tóxicos y biocompatibles (Sandra 2009) formando parte de la fibra dietaria en nuestros alimentos (Andersson et al. 2009; Wicker et al. 2014).

El uso de diferentes polímeros en la formulación para la fabricación de acarreadores, facilita la modulación de propiedades fisicoquímicas de las nano- y micropartículas, como la carga de superficie o la adhesividad (Chen et al. 2011). Cada polisacárido tiene sus ventajas y desventajas y se deben tomar en cuenta sus propiedades fisicoquímicas, costo y eficiencia de encapsulación (Sansone et al. 2011).

## **Fabricación por Electroaspersión**

Existen diferentes métodos de fabricación que requieren del uso de solventes orgánicos para la preparación de vesículas y micelas poliméricas. El uso de estos solventes puede llevar a la pérdida o reducción de bioactividad de algunos fármacos, además de la toxicidad que pudieran presentar si quedaran residuos (Yu et al. 2009). Lo anterior impulsa la búsqueda de métodos de fabricación que no requieran del uso de solventes orgánicos, representando un riesgo potencial para la salud humana.

Una alternativa para evitar el uso de solventes orgánicos es la electroaspersión, una técnica no destructiva, que permite crear partículas mediante la aplicación de una fuerza electrodinámica para romper líquidos en pequeñas gotas. Este proceso es rápido y eficiente y al mismo tiempo, permite controlar el tamaño de las partículas. La electroaspersión se ha utilizado para producir partículas en la escala nanométrica, como sistemas de liberación controlada de fármacos (Wu et al. 2009) especialmente a base de polímeros.

La electroaspersión se ha usado con diferentes polímeros, sintéticos y naturales, como sílice y estireno (Hong et al. 2005), ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) y poli etilenglicol (PEG), elastina (Wu et al. 2009) y quitosano (Songsurang et al. 2011). Además se han fabricado nanoesferas de insulina por medio de esta técnica, con un tamaño de 88-100 nm y sin mostrar modificación en su actividad hormonal (Sushmitha et al. 2010), comprobando su carácter no destructivo y benéfico para cubrir moléculas con actividad biológica.

## Pectinas

Las pectinas se consideran los componentes más complejos de la pared celular y son parte esencial de la regulación de la expansión celular (Palin et al. 2012). En combinación con otros componentes contribuyen a la rigidez y elasticidad de la pared celular, favorecen la turgencia y brindan resistencia a la sequía y a las bajas temperaturas (Ovodov 2009; Voragen et al. 2009).

### **Características Físicoquímicas**

Las pectinas son heteropolisácaridos, y tienen gran variación en composición, estructura y peso molecular (Ovodov 2009). Están compuestas por residuos de ácido galacturónico unidos a través de enlaces  $\alpha$ -(1,4) (GalA), con un grupo carboxilo en el C-6. La cadena principal puede contener azúcares neutros

laterales por lo que se secciona en regiones "lisas" sin ramificaciones y en regiones ramificadas (Voragen et al. 2009).

### **Tipos de Pectina**

Los grupos carboxilo del GalA, pueden estar esterificados con grupos alquilo, metilo y acetilo (Vaclavik et al. 2007). De acuerdo a la proporción de grupos esterificados en una cadena, se asigna un índice conocido como grado de esterificación (GE). En GalA pueden existir grupos que reaccionen con amoníaco y producir carboxiamidas. Su proporción se indica mediante el grado de amidación (Anger et al. 1988; Thirawong et al. 2008). De acuerdo al GE se clasifican de la siguiente manera: alto grado de esterificación (AGE) donde más del 50% de los grupos carboxilo se encuentran esterificados, y bajo grado de esterificación (BGE) donde menos del 50% de los monómeros tienen el carboxilo esterificado. Esta característica es crucial, ya que afecta directamente el mecanismo de gelificación (Löfgren et al. 2007).

La viscosidad de soluciones de pectina es elevada, como consecuencia del tamaño de las partículas dispersas, lo que ocasiona gran resistencia al movimiento. La viscosidad depende de los siguientes factores: naturaleza de la pectina, solvente, distribución de pesos moleculares, concentración y temperatura (Kar et al. 1999a; Kar et al. 1999b; Yoo et al. 2006). Lo anterior debe ser tomado en cuenta al momento de preparar soluciones, y considerarlas para posibles aplicaciones como espesantes o gelificantes.

### **Propiedades de Gelificación**

Las pectinas son moléculas hidrofílicas que tienen gran cantidad de grupos altamente polares como los hidroxilo y los carboxilo. Cuando se encuentran dispersas en agua, algunos de los grupos carboxilo se ionizan y se enlazan con agua para formar los diferentes grupos polares en la molécula. Las cargas negativas junto con la atracción del agua, mantienen la repulsión entre

moléculas, lo que provoca la formación de un sol estable (sólido disperso en agua en fase continua) (Vaclavik y Christian 2007).

Un aspecto crucial para la formación del gel es el grado de esterificación. Las pectinas AGE gelifican en un ambiente ácido, alrededor de un pH de 3 y requieren la presencia de un co-soluto, usualmente sacarosa al 60%. La sacarosa reduce la actividad de agua, aumentando la hidrofobicidad entre las cadenas y el pH bajo reduce la ionización de los grupos, lo que provoca la formación de zonas de unión entre cadenas de pectina (Lofgren et al. 2002).

En el proceso de formación del gel, las fuerzas que mantienen separadas a las cadenas de pectina deben ser reducidas, para que en ciertos puntos exista interacción entre cadenas y se logre atrapar moléculas de agua, obteniendo una red tridimensional que dará la estructura del gel (Vaclavik y Christian 2007).

Las pectinas BGE, contrario a las AGE, gelifican sin o con poca cantidad de azúcar, pero requieren la presencia de iones calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para formar enlaces intercatenarios. Además, tienen un amplio espectro de valores de pH en los que pueden gelificar. Los enlaces intercatenarios junto con las zonas de unión forman una estructura llamada "caja de huevos" en un proceso de unión cooperativo que le brinda estabilidad y fuerza al gel sumándose a las interacciones hidrofóbicas y de Vander Waals (Braccini et al. 2001; Fraeye et al. 2009).

Este proceso de gelificación es fácilmente reversible al agregar iones de sales monovalentes como sodio ( $\text{Na}^+$ ) y potasio ( $\text{K}^+$ ) (Munarin et al. 2013). Otra característica que afecta la fuerza de los enlaces con los iones de calcio, es la distribución dentro de la cadena de grupos carboxilos no esterificados, impactando sobre la funcionalidad de los geles (Löfgren y Hermansson 2007).

Por lo tanto, la capacidad de formar geles depende no solo del tipo de pectina, (metoxilada, acetilada o amidada), sino también de su concentración, pH, contenido de sacarosa, y de la interacción con iones (Lima et al. 2010).

### **Fuentes de Obtención**

Si bien todas las plantas contienen pectina en sus paredes celulares, no todas interesan como fuente de extracción. En general, se toma en cuenta el rendimiento, tiempo y costo de extracción (entre otros), como criterios de selección de materia prima. Actualmente, se busca obtener la pectina a partir de residuos y desechos de la industria de alimentos de origen vegetal, dando valor agregado a estos subproductos

Comercialmente, la mayoría de las pectinas son obtenidas a partir de cáscaras de cítricos y de residuos de manzana. Otras fuentes de menor importancia son la remolacha azucarera, cabezas de girasol y residuos de mango. En general los frutos duros como: manzana, membrillo, ciruela, grosella y cítricos, presentan mayores rendimientos de pectina comparados con la que poseen los frutos suaves como cerezas, uvas y fresas (Srivastava et al. 2011).

### **Aplicaciones**

Las pectinas funcionan como un factor de adhesión en los alimentos y al añadirseles, actúan como estabilizantes, emulsificantes y espesantes (Qiu et al. 2009). Además, ofrecen estabilidad en condiciones ácidas y de altas temperaturas (Liu et al. 2007). También tienen efectos importantes como nutracéuticos, influyendo en la disminución de niveles sanguíneos de lípidos, glucosa y colesterol y son consideradas fibra dietética con un alto grado de fermentabilidad en el colon (Manderson et al. 2005; Qiu et al. 2009). Como fibra, las pectinas tienen diversos efectos inmuno-reguladores en el intestino, como cambiar la actividad microbiana ileal y modificar la morfología de la pared del intestino delgado (Hotchkiss et al. 2009; Voragen et al. 2009).



A lo largo del tiempo, la pectina ha sido considerada como un ingrediente seguro en los alimentos, pero en los últimos años se viene promoviendo su uso en las aplicaciones fuera del área alimentaria, como biomateriales y matrices de liberación controlada de fármacos y de genes (Munarin et al. 2013).

En los sistemas de liberación controlada este polímero puede ser aplicado como matriz, con un gran potencial en medicamentos vía nasal, oral y ocular (Wicker et al. ; Liu et al. 2003; Liu et al. 2007; Munarin et al. 2013). El campo de biomateriales, tiene una gama muy amplia de aplicaciones de nano- y micropartículas de pectina, por lo que se deben buscar estrategias para una producción de partículas de mejor calidad. Si se combinan la bioingeniería, química, ciencia de los materiales y ciencias de la salud se pueden lograr resultados más completos y de mejor calidad (Sushmitha et al. 2010).

### Arabinoxilanos

Los arabinoxilanos son polisacáridos hemicelulósicos que se encuentran en la pared celular de gramíneas y algunos pastos. Son fundamentales para mantener la integridad estructural de los vegetales (Mazumder et al. 2010). Están constituidos por moléculas de xilosa unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4) y con ramificaciones de monómeros de  $\alpha$ -L-arabinofuranosa en  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -(1,2). En las arabinosas algunas veces se encuentran residuos de ácido ferúlico, unidos mediante enlaces éster y a estas macromoléculas se les conoce como arabinoxilanos ferulados (AXF).

Sólo algunos arabinoxilanos son solubles en agua, por lo que en su mayoría no pueden ser extraídos de forma acuosa. Así, para la extracción, es importante conocer sus propiedades de solubilidad, asociadas a sus diferentes sustituyentes y a sus tipos de enlaces (Izydorczyk et al. 1995).

Entre los sustituyentes de los arabinosilanos, el ácido ferúlico juega un rol crucial en los mecanismos de gelificación, por lo que su cuantificación es muy importante. La cantidad de ácido ferúlico se reporta como grado de ferulación, relación promedio de moléculas de ácido ferúlico por cada 1000 residuos de xilosa. Un cambio en el grado de ferulación, tiene efectos directos sobre la gelificación, el comportamiento visco-elástico de las soluciones y la estructura final del gel. Los cambios son consecuencia de la alteración en los entrecruzamientos covalentes dentro del gel (Carvajal-Millan et al. 2005). Si disminuye el grado de sustitución, la viscosidad y fuerza del gel también se verán modificadas.

### **Características Fisicoquímicas**

El peso molecular de los arabinosilanos extraíbles en agua va desde 10 a 10,000 kDa y mayores de 10,000 kDa para los no extraíbles en medio acuoso (Izydorczyk y Biliaderis 1995). Las moléculas con alto peso molecular, tienen mayor capacidad de retención de agua. Esto aumenta su potencial para formar hidrogeles rígidos (Izydorczyk et al. 1992; Carvajal-Millan et al. 2005). Sin embargo el contenido de ácido ferúlico, concentración de arabinosilanos, pureza del polisacárido y la cantidad de radicales libres generados en el sistema, son determinantes en la formación y propiedades estructurales del gel (Skendi et al. 2011).

La formación de dímeros con uniones covalentes de ferulatos, es un mecanismo eficiente para lograr entrecruzamiento de polisacáridos (Niño-Medina et al. 2010). Este proceso conocido como dimerización, influye sobre las propiedades fisicoquímicas de la pared celular vegetal y del arabinosilano extraído (Tan et al. 2013). En algunas especies pertenecientes a las familias *Poaceae* y *Bromelaceae*, el ácido ferúlico se encuentra enlazado por una unión éster a la cadena de arabinosilanos (Bunzel et al. 2005) dando paso a estructuras más rígidas, estabilizadas por enlaces covalentes.

## **Propiedades Reológicas**

Los geles de AXF tienen características que les brindan estabilidad en diferentes medios, alta capacidad de absorción de agua (hasta 100% del peso seco del polímero), estabilidad frente a cambios de pH, concentración iónica y temperatura, además de tener sabor y olor neutro (Hernández-Espinoza et al. 2012).

Los arabinosilanos extraídos en medio acuoso, forman soluciones con gran viscosidad y buena capacidad de gelificación. Los geles formados por AXF se crean por medio de interacciones débiles como los puentes de hidrógeno, así como por interacciones covalentes, en donde se forman dímeros y trímeros de ácido ferúlico. Estas uniones están catalizadas por agentes oxidantes que generan radicales libres, como las enzimas lacasa y peroxidasa. De esta forma, los geles que se encuentran regidos por dichas interacciones covalentes, conocidos como geles químicos, tienen gran estabilidad frente a cambios de temperatura y pH (Carvajal-Millan et al. 2005).

## **Gelificación Enzimática**

Las enzimas peroxidasa (EC 1.11.1.7) y lacasa (EC 1.10.3.2), son capaces de catalizar la oxidación de los ácidos ferúlicos presentes en los arabinosilanos, formando radicales libres que al interactuar entre sí por acoplamiento oxidativo forman uniones covalentes, y con ello se produce un gel. La peroxidasa y la lacasa catalizan la reacción por diferentes mecanismos, la peroxidasa requiere de peróxido de hidrógeno como agente oxidante, en cambio la lacasa oxida el sustrato directamente teniendo como aceptor al oxígeno (Abang Zaidel et al. 2012). Debido a lo anterior la lacasa puede ser una mejor opción como gelificante en sistemas alimentarios o farmacéuticos.

La lacasa (bencenodiol: oxígeno oxidorreductasa) es una enzima que contiene múltiples centros activos de cobre que actúan catalizando la reducción de oxígeno molecular a agua, sin la producción de peróxido de hidrógeno (Şaşmaz et al. 2011). Al mismo tiempo, realizan la oxidación de un electrón en varios sustratos como los difenoles, monofenoles, aminas aromáticas y alifáticas (Kudanga et al. 2011).

El modo de catálisis de la lacasa está mediado por la reducción de cuatro electrones del oxígeno molecular, acoplada con la oxidación de un electrón de cuatro sustratos donantes de hidrógeno. Esta reacción es posible por el grupo de 4 átomos de cobre que forman el sitio activo de la enzima. Como resultado de la catálisis, se oxidan cuatro moléculas de sustrato para producir cuatro radicales. Estos radicales pueden desencadenar reacciones de unión covalente para formar dímeros (Kudanga et al. 2011) como los que se forman entre los ferulatos de los AXF, en el proceso de dimerización.

El entrecruzamiento por acoplamiento oxidativo puede ser del tipo homo (entre cadenas del mismo polímero) o hetero (cadenas con diferente origen). Además del ácido ferúlico en arabinoxilanos y pectinas, también se ha encontrado que los compuestos fenólicos presentes en aminoácidos (tirosina, cisteína y triptófano) pueden ser sustrato para esta enzima (Jung et al. 2012).

### **Fuentes de Obtención**

El endospermo de los cereales es el tejido vegetal con mayor contenido de arabinoxilanos (Izydorczyk y Biliaderis 1992). Las fuentes más importantes, son trigo, centeno, cebada, avena, arroz, sorgo, maíz y mijo, pero también existen otras fuentes de menor importancia, como lo son mucílago de linaza (Naran et al. 2008), pasto de pángola (Ford 1989), *Litsea glutinosa* (lauraeae) (Das et al. 2013), *Cannaedulis* (Zhang et al. 2011a), bagazo de caña de azúcar (Mellinger-Silva et al. 2011), y cáscaras de plátano (Zhang et al. 2004). La fuente de

extracción es un factor importante al momento de estudiar y manipular los arabinosilanos, ya que la estructura molecular y el grado de sustitución varían dependiendo de la fuente de extracción (Sternemalm et al. 2008).

Un aspecto a resaltar de los arabinosilanos, es que se pueden obtener a partir de subproductos industriales, sobre todo de la industria molinera. El pericarpio de trigo es un ejemplo, con un contenido de AX alrededor del 20 % (Berlanga-Reyes et al. 2011). También existen desechos de procesos artesanales e industriales, como el nejayote, un desecho acuoso de la nixtamalización del maíz, que se ha estudiado y confirmado como buena fuente de arabinosilanos (patente CIAD 278768), (Niño-Medina et al. 2009).

### **Aplicaciones**

Los arabinosilanos han sido usados para fabricar películas, para formar cápsulas blandas y fuertes para utilizarlas en farmacéutica, en fitoterapéutica y en la industria alimentaria. Las aplicaciones de materiales a base de arabinosilanos identificadas, son, entre otras: películas, recubrimientos y envases para alimentos. Además de estas aplicaciones, los diferentes usos en la biomedicina revisados por Hansen et al. (2008), dan un nuevo enfoque de aplicaciones y abren la posibilidad al desarrollo de nuevos materiales biopoliméricos.

Existen estudios sobre la viabilidad de geles de arabinosilanos como matrices para atrapar bioactivos, como las proteínas insulina y  $\beta$ -lactoglobulina, para usarlos como vehículos protectores que posteriormente serán liberadas en el colon por difusión y degradación bacteriana del gel (Berlanga-Reyes et al. 2009; Carvajal-Millan et al. 2012; Rascón-Chu et al. 2012).

También se han presentado trabajos con otros bioactivos de origen no proteico, como el licopeno (Hernández-Espinoza *et al.*, 2012). Estas publicaciones

indican, la factibilidad de formar hidrogeles de arabinosilanos para utilizarlos como matrices de liberación controlada, pero es necesario optimizar su fabricación para obtener mejores resultados de gelificación. Además de esto, existe una primera publicación donde se estudian arabinosilanos como matrices para atrapar probióticos (Morales-Ortega et al. 2014).

### Liberación de Bioactivos Dirigidos a Colon

A diferencia del intestino delgado, el colon no es un órgano común para la absorción de bioactivos. Principalmente por la baja biodisponibilidad que presentan los fármacos, al sufrir cambios en su estructura por los efectos fisiológicos del tracto gastrointestinal superior (GI), y con ello pérdida de su efecto (Katsuma et al. 2006). Por ello, se busca proteger a los bioactivos del efecto fisiológico del tracto GI, para aumentar su biodisponibilidad.

### **Fisiología y Anatomía del Colon**

El colon es una sección del intestino que comienza en el ciego y en la válvula ileocecal, terminando en el recto. Se divide en cuatro partes: colon ascendente, transversal, descendente y sigmoide. La mucosa del colon está formada por tres capas, epitelio, lámina propia y mucosa muscularis. El epitelio está constituido por una capa de enterocitos dispuestos en columnas que se encargan de la absorción. El colon está conectado al hígado a través de la vena porta y las arterias mesentéricas lo proveen de sangre (Maroni et al. 2012).

En el colon se lleva a cabo el mantenimiento de los fluidos y el balance electrolítico por medio de la reabsorción de agua y electrolitos (en la mitad proximal). También participa en el almacenamiento de las heces para su posterior expulsión (en la mitad distal) (Segarra 2006). Por estas funciones, es un órgano de gran importancia en los procesos de digestión y absorción del tracto gastrointestinal.

## Aspectos de la Absorción en Colon

Debido a sus características fisiológicas, el colon puede favorecer la absorción de péptidos y bioactivos dirigidos (Rubinstein et al. 1997). A diferencia del estómago e intestino delgado, el colon tiene un pH neutro y menor cantidad de enzimas líticas (Tabla 1). En estas condiciones, se disminuye la destrucción del fármaco (Minko 2004), lo que conlleva a necesitar una menor dosis y minimizar los posibles efectos secundarios del fármaco (Shukla et al. 2012).

**Tabla 1.** Funciones y enzimas más destacadas de los órganos del tracto gastrointestinal

Órgano	Proceso digestivo	Enzimas	pH	Ref.
<b>Boca</b>	Digestión mecánica de los alimentos	Amilasa salival	6.7	(Aframian et al. 2006)
<b>Esófago</b>	Conexión entre boca y estómago	-	-	-
<b>Estómago</b>	Almacén, digestión mecánica y química, reducción bacteriana	Pepsina	1 - 3	(Gruber et al. 1987)
<b>Intestino delgado</b>	Digestión química de carbohidratos, proteínas, lípidos, absorción de nutrientes	Enzimas pancreáticas (lipasa, tripsina, quimiotripsina,)	~6 - 7.4	(Fallingborg 1999)
<b>Colon</b>	Absorción de agua y de electrolitos	-	~7	(Sandra 2009)

(Sandra 2009).

El colon es la parte del intestino con mayor cantidad y diversidad de bacterias. Gracias a esta población bacteriana, se llevan a cabo los procesos de fermentación de proteínas y carbohidratos no digeridos, con producción de dióxido de carbono, hidrógeno, metano y ácidos grasos de cadena corta (Maroni et al. 2012).

La gran cantidad y variedad de población microbiana que existe en el colon, genera enzimas del tipo polisacaridasas como la  $\beta$ -D-glucosidasa,  $\beta$ -D-galactosidasa, amilasa, pectinasa, xilanasa,  $\beta$ -D-xylosidasa, dextranasa, entre otras. Estas enzimas participan en la desintegración de cápsulas o esferas a base de polisacáridos permitiendo la liberación del compuesto acarreado (Wang et al. 2009). Al liberarse el compuesto se promueve su disolución, necesaria para lograr permear las membranas del tracto GI, y de ahí difundirse a circulación sanguínea para llegar a su objetivo (Sandra 2009).

Otra característica importante del colon, es la motilidad propulsora, que provoca un tránsito lento y prolongado de la materia de desecho. El tiempo que dura la materia en colon, se refleja en reabsorción de agua, lo que produce una disminución en el volumen de fluido y aumento en la concentración de diferentes moléculas (Rubinstein et al. 1997). Todos estos procesos influyen en la liberación dirigida a este órgano, pues estimulan los procesos de difusión y absorción de los fármacos.

### **Tamaño de Partícula y sus Implicaciones**

El tamaño de partícula, la composición y las propiedades superficiales de los materiales usados en la micro y nano-encapsulación son fundamentales para lograr regular la internalización y el transporte a través de las barreras de la mucosa intestinal (Laroui et al. 2011). En otros reportes se ha indicado que la geometría de las partículas también es parte fundamental para regular la liberación de fármacos en los sistemas acarreadores (Champion et al. 2007).

Respecto al tamaño de partícula Lamprecht et al. (2001), señalaron que un tamaño de partícula óptimo, para el diseño de un sistema de liberación controlada, debe ser elegido por su capacidad de carga y velocidad de deposición del fármaco.



Las nanopartículas tienen ventaja en adhesión y velocidad de liberación frente a partículas de mayor tamaño, cuando el objetivo es su internalización celular por células no fagocitarias, por endocitosis como probable mecanismo (Lamprecht et al. 2001; Lacoeyille et al. 2007). De la misma manera Laroui et al. (2011) mencionaron que partículas menores a 200 nm pueden ser internalizadas por el epitelio, específicamente por las células de epitelio intestinal en las puntas de las vellosidades y/o por las células M.

Específicamente en estudios con partículas cargadas con insulina, se realizó un análisis comparativo de diferentes tamaños de partículas (180–230  $\mu\text{m}$ , 43–89  $\mu\text{m}$ , <43  $\mu\text{m}$ ), y se encontró que las partículas con mayor tamaño no presentaban absorción apreciable en el íleon, en cambio en partículas de menor tamaño sí se observó absorción de insulina con efectos hipoglucemiantes, sin detectar daños en la mucosa. Estos resultados indican que el tamaño de partícula es un factor muy importante en la biodisponibilidad de la insulina, tras su administración oral de sistemas de liberación controlada (Morishita et al. 2004).

### Insulina

La insulina es una hormona polipeptídica, secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans en el páncreas y transportada vía portal. Tiene como función controlar la homeostasis de glucosa en sangre (Maroni et al. 2012). Es degradada en el hígado y los riñones, 60% en hígado y 40% en riñón, pero en los pacientes medicados con insulina esta proporción se invierte (González et al. 2001). La administración de insulina es imprescindible en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo I y necesaria para controlar el índice glucémico en casos avanzados de diabetes mellitus tipo II (Kim et al. 2009).

## **Estructura y Propiedades**

La insulina es un péptido compuesto por 51 aminoácidos, formado por dos cadenas (A y B) unidas por un puente disulfuro. Tiene una masa molecular de 5,808 Da. Su conformación tridimensional es globular, con grupos polares al exterior y grupos no polares orientados hacia el interior (González y Martínez 2001; Maroni et al. 2012)

El efecto hormonal de la insulina se debe a los receptores de membrana capaces de reconocerla que se encuentran en la mayoría de los tejidos, pero su efecto se da principalmente en el hígado, músculo y tejido adiposo (González y Martínez 2001). Se han identificado receptores de insulina en intestino de ratas y conejos, con la mayor expresión en la membrana apical del colon (Pillion et al. 1985). Una de las hipótesis más aceptadas sobre la forma de absorción de la insulina en el colon, es que está mediada por permeación de la mucosa, en un proceso conocido como transcitosis (Bendayan et al. 1994; Xia et al. 2001; Maroni et al. 2012)

## **Tratamiento de Diabetes Mellitus**

La forma tradicional de administración de insulina es vía subcutánea, en forma de inyección. Desde las primeras décadas del siglo XX se ha intentado la administración vía oral pero debido a que la insulina es sensible a factores fisiológicos como pH y actividad enzimática, es necesario protegerla para mantener su funcionalidad (Pillai et al. 2001; Chen et al. 2011).

Se han propuesto métodos como la nano- y la micro-encapsulación con biopolímeros, para fabricar acarreadores y protectores en la administración vía oral de insulina. Se han producido esferas de forma irregular y de tamaños alrededor de 500 nm – 90 µm, que han logrado proteger a la insulina del daño enzimático y por pH. También en ensayos de liberación *in vivo* de insulina oral, se ha detectado la presencia de insulina en colon de ratas, la que

posteriormente mostró efecto terapéutico (Sarmiento et al. 2007; Kim et al. 2009).

Uno de los grandes retos en estos sistemas, es controlar la cantidad de insulina liberada, para evitar los posibles riesgos hipoglucémicos que pudiera provocar un exceso de insulina en circulación (Kim et al. 2009). En estos estudios se determinó que los resultados farmacológicos y de biodisponibilidad están lejos de los valores deseables, y tienen poca consistencia, por lo que es necesario seguir estudiando estos procesos.

## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

Para la fabricación de las matrices se usó pectina extraída de manzana (*Malus domestica* Borkh.) de aclareo con un grado de esterificación de 41 % (PMA). A esta pectina se le aplicó un tratamiento de desesterificación química para disminuir el grado de esterificación. Los AXF utilizados, fueron proporcionados por el Grupo de Investigación de Biopolímeros de CIAD, extraídos de pericarpio de maíz (*Zea mays*) con la técnica descrita por Carvajal-Millan et al. (2007); como molécula de carga se usó insulina recombinante humana (SAFC-91077C-SIGMA), y como agentes gelificantes se utilizaron la enzima lacasa (SIGMA 53739) para el entrecruzamiento de AXF, y cloruro de calcio (Sigma-Aldrich, C50080) para la gelificación de pectina.

#### Disminución del Grado de Esterificación de Pectina

Se realizó una desesterificación química de PMA, sometiéndola a un tratamiento alcalino, con una solución 2M de NaOH<sub>2</sub> (Productos químicos Monterrey S.A, 36904), en agitación constante por un periodo de 2h, todo el proceso protegido de la luz. Después se agregó una solución de HCl 4M (Sigma-Aldrich, 258148) frío (4 °C), se agitó manualmente y con la misma solución ácida se ajustó a un pH de 2-2.2. Posteriormente, se agregó etanol frío (4°C) en una relación final de 70 % etanol, se mezcló y se almacenó en refrigeración por 24 h. Por último se filtró la mezcla con ayuda de un equipo de filtración al vacío y usando filtros de fibra de vidrio (Whatman™ 1825-047). Los sedimentos sobre el filtro se secaron en una estufa a una temperatura de 60 °C por 12 h, para su posterior pulverizado con mortero.

La determinación del grado de esterificación de la pectina post-tratamiento (PMAD, pectina de manzana de aclareo desesterificada), se realizó por espectroscopía infrarrojo, en un equipo FT-IR Nicolet® Protege 460 (Madison, WI, USA) de acuerdo a la técnica descrita por Urias-Orona et al. (2010). Se obtuvieron los espectros de la pectina inicial y de la pectina tratada. Para determinar el grado de esterificación, se utilizó una estimación matemática, en base a la relación del área de la banda correspondiente a los grupos carboxilo ( $1650\text{ cm}^{-1}$ ) frente al área de la banda correspondiente a los grupos esterificados ( $1750\text{ cm}^{-1}$ ), como se indica en la ecuación 1.

(1)

$$GE = \frac{\text{Area grupos esterificados}}{(\text{Area grupos esterificados} + \text{Area grupos carboxilo})} \times 100$$

### Preparación de Soluciones de Trabajo

Las soluciones de PMAD y AXF se prepararon de forma individual. La solución de PMAD se preparó al 1 % (p/v) en agua bidestilada, y se dejó en agitación constante por un periodo de 24 h para lograr su máxima dispersión. La solución de AXF se preparó al 6 % (p/v) en una solución tampón (ácido acético/acetato de sodio, pH 5.5), de igual manera, para lograr su máxima dispersión, se dejó en agitación constante por un periodo de 24 h. Una vez que se obtuvieron las dispersiones de ambos polisacáridos, se filtraron a través de un filtro metálico para jeringa, con malla de acero con diámetro de orificio de  $350\mu\text{m}$ .

### Solubilización de la Insulina

Este proceso se realizó de acuerdo al trabajo previo de Martínez-López et al. (2013). Consistió en preparar una solución de insulina a una concentración de  $3.6\text{ mg/mL}$ , de este apartado en adelante, esta solución será mencionada como "pool de insulina". El pool de insulina se mezcló con la solución de AXF (6%) en un proporción 1:1, quedando una solución a una concentración final de 3 % del polisacárido (Solución AXF-Ins).

## Reología Dinámica de Baja Deformación

Con el fin de determinar las características visco-elásticas de los geles formados por la PMAD, AXF, AXF-Ins, y las mezclas de PMAD-AXF-Ins, se realizaron análisis de reología dinámica de baja deformación (RDBD). La evaluación de los tiempos de gelificación ( $T_g$ ), y la fuerza de los geles, en las distintas mezclas (Tabla 2) se llevó a cabo utilizando un reómetro híbrido (Discovery HR-2, TA instruments, EE.UU.), de acuerdo al método de Urias-Orona et al. (2010). La cinética de gelificación se realizó a temperatura constante de 25 °C, 2.5% de deformación, y 0.25 Hz de frecuencia.

**Tabla 2.** Ensayos de reología dinámica de baja deformación de las diferentes soluciones de polisacáridos

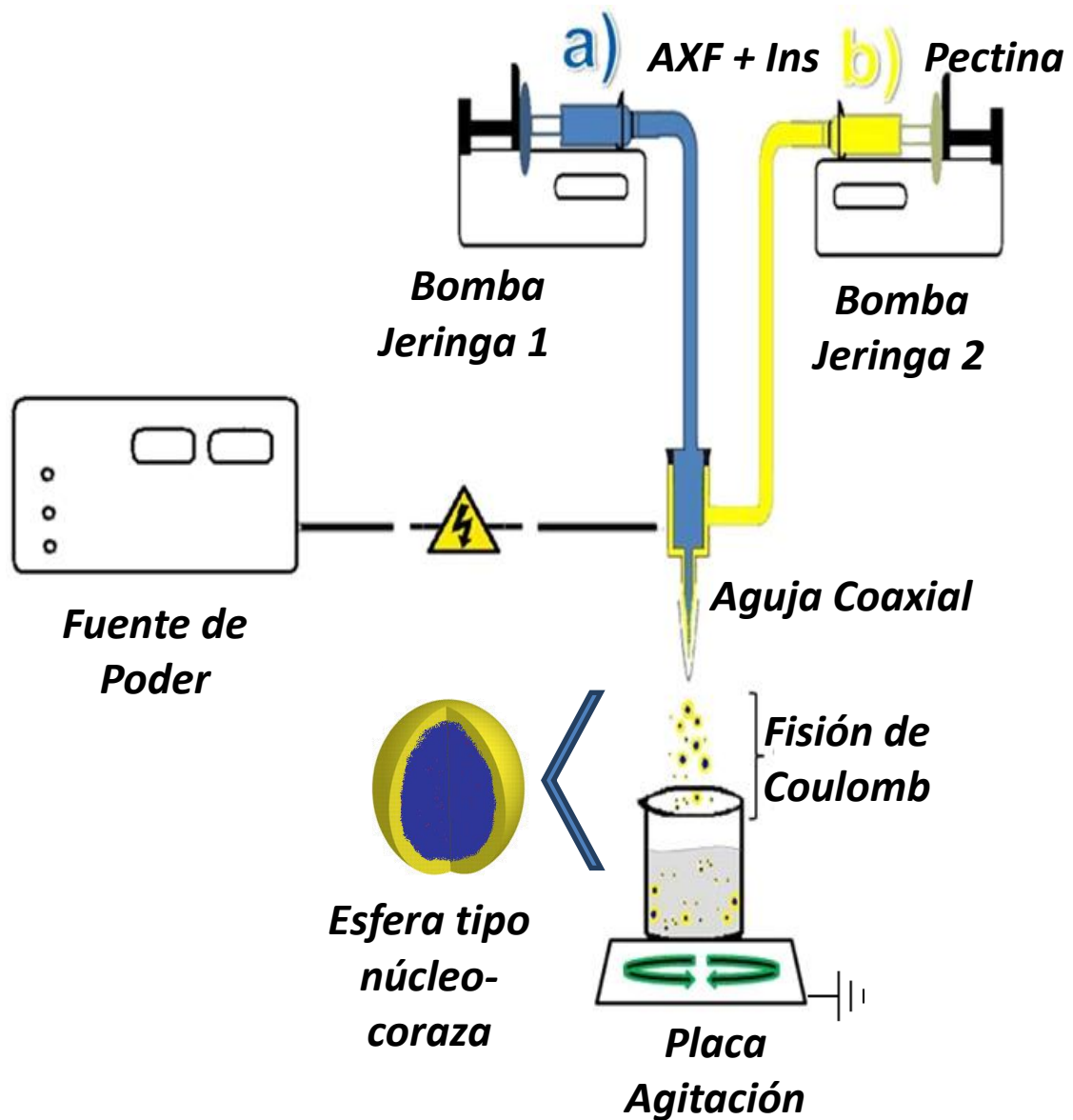
<b>Componentes</b>	<b>Entrecruzante</b>
PMAD 1% (p/p)	CaCl <sub>2</sub> (2.2% p/v)
AXF 3% (p/p)	Lacasa (0.037 U/ $\mu$ L)
AXF 3% (p/p) + Insulina 3.6mg/mL	Lacasa (0.037 U/ $\mu$ L)
AXF 3% (p/p) + PMAD 1% (p/p)	CaCl <sub>2</sub> (2.2 % p/v)
	Lacasa (0.037 U/ $\mu$ L)

## Fabricación de las Esferas

Una vez que se determinaron las características visco-elásticas de los geles, se procedió con la fabricación de las esferas. Se fabricaron por la técnica de electroaspersión con flujo coaxial. El sistema de electroaspersión coaxial consistió en: un controlador de voltaje (Profector <sup>TM</sup>, Dublin, Irlanda) y dos bombas programables para jeringa (WorldPrecision Instruments, AL-1000) conectadas independientemente a la aguja coaxial, como control de flujo. Para recibir la aspersion de gotas, se preparó una solución entrecruzante a base de etanol (control de polaridad) y CaCl<sub>2</sub> a diferentes concentraciones.

La inyección de las soluciones poliméricas se realizó con un volumen de 100 µL de cada polisacárido. Por un lado, la jeringa que alimentaba la parte externa de la aguja con la solución de PMAD, y la parte central de la aguja, fue alimentada con la solución de AXF-Ins y 1.25 U/mL de lacasa. La recepción de la aspersion se realizó en un volumen de 10 mL de la solución de entrecruzante, con agitación constante a 200 rpm (Corning<sup>®</sup>, PC-420D) durante el tiempo de fabricación, y una agitación posterior de 2 h como periodo de curado del gel. Las muestras se almacenaron en solución a 4 °C. El esquema de electroaspersión se muestra en la figura 1.

El flujo de inyección, el voltaje aplicado y las proporciones de concentración en la solución entrecruzante, se manejaron en base el diseño experimental descrito más adelante en la Tabla 3.



**Figura 1.** Esquema general del sistema de electroaspersión. Se observa el sistema coaxial alimentado por las soluciones de pectina y arabinosilanos, con la fuente de poder controlando el voltaje aplicado, y la solución entrecruzante recibiendo las microgotas formadas por fisión de Coulomb.



## Tamaño y Distribución de las Esferas por DLS

Se hizo un estudio de tamaño y distribución poblacional de las esferas, en las diferentes corridas de la fabricación, usando el método denominado dispersión dinámica de luz (DDL). Esta técnica utiliza la espectroscopia de correlación de fotones, que determina el tamaño de partícula mediante la medición de la tasa de las fluctuaciones en la intensidad de la luz láser dispersada por las partículas a medida que se difunden a través de un fluido (BeckmanCoulter, Inc, 2014).

Las mediciones se realizaron en un analizador granulométrico (Delsa™ Nano C Particle analyzer, BeckmanCoulter). Se depositaron 2 mL de la muestra etanólica (en fresco) dentro de celdas desechables rectangulares de poliestireno (SARSTEDT AG & Co). La incidencia de la luz láser fue a una longitud de onda de 658 nm. Las microesferas se analizaron en la solución de entrecruzante original, por triplicado y se tomaron los datos de cada medición, el promedio y coeficiente de variación, como descriptores de la “población” de esferas.

## Análisis por Técnicas de Microscopía

### **Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)**

Esta microscopía se basa en la producción de un haz de electrones finamente enfocado y que hace un barrido (escaneado) a través de la muestra, las señales que surgen de la interacción entre el haz de electrones y la muestra puede ser monitoreada en forma de imágenes, gráficos, y/o grabaciones digitales, entre otras formas (Danilatos 1988).

Por medio de esta microscopia, se logró observar la morfología y geometría de las esferas y corroborar su tamaño y dispersión. Las mediciones se realizaron en un equipo JEOL JSM-6610/LV30 Kv scanning electron microscopy (JEOL USA, Inc.), en modo de bajo vacío, con voltaje de 20kV a diferente

amplificaciones según lo requerido por cada muestra. Las muestras se observaron sobre una superficie de silicio y fueron evaporadas bajo una luz incandescente de 60W por 2 h, previo a su análisis. Las imágenes obtenidas se analizaron principalmente sobre las esferas de tamaños mayores a 1  $\mu\text{m}$ . Así mismo se realizó análisis elemental puntual mediante la técnica de espectrometría de energía dispersa (EDS) a un ángulo de 35°.

### **Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)**

Esta técnica consiste en irradiar una pequeña muestra con un haz de electrones de corriente de densidad uniforme. Los electrones son emitidos por una pistola electrónica por emisión termoiónica, Schottky, o campo. La distribución de la intensidad de electrones detrás de la muestra, crea una imagen con un sistema de lentes, compuesto por tres a ocho lentes, en una pantalla fluorescente. La imagen puede ser grabada en formato digital a través de una pantalla fluorescente, junto con una placa de fibra óptica a una cámara CCD (Reimer et al. 2008).

Se usó un microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM-1230, 120 kV high contrast transmission electron microscope, JEOL USA, Inc.). Complementando los análisis de microscopía, se empleó la espectrometría de energía dispersa (EDS). Para lograr observar las muestras en imagen digital, se depositaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra sobre una celdilla de cobre con recubrimiento de formvar-carbon (Electron Microscopy Sciences). Se trabajó con un voltaje de aceleración de 100 kV, con magnificaciones de 4,000X hasta 120,000X. El análisis por EDS se obtuvo con un ángulo de inclinación de 45°.

### **Microscopía Óptica de Barrido Laser Confocal (MBLC)**

Este método de microscopía tiene la capacidad de reducir en gran medida el resplandor fuera de enfoque que se puede observar en un microscopio de fluorescencia convencional de campo amplio. La MBLC proporciona una mejor

resolución a lo largo del eje "Z" y permite hacer un seccionamiento óptico de las muestras analizadas (Hepler et al. 1998).

Por esta técnica microscópica se observó en un sistema confocal espectral de alta resolución Leica TCS SPE con un microscopio invertido DMI4000 B (Leica Microsystems, Alemania). Por medio de la autofluorescencia se observó la localización tridimensional de la proteína (insulina+lacasa) dentro de las esferas. Las condiciones para observar la fluorescencia fueron las longitudes de onda de 635 nm en excitación y 620-680 nm para la emisión, determinado por escaneo espectral de la longitud de onda con mayor señal (Leica Microsystems). Se observó a una magnificación de 40x y 100x (con aceite de inmersión).

### Diseño Experimental

Para la optimización de las condiciones de fabricación de las esferas respecto al tamaño de partícula y dispersión de diámetros, se utilizó un diseño compuesto central rotatorio (CCR) con un arreglo factorial  $2^4$  (Tabla 3) con un nivel central (0), dos niveles axiales ( $-\alpha$  y  $\alpha$ ), y dos niveles factoriales (-1 y 1). Los factores estudiados fueron:  $X_1$ , flujo de inyección;  $X_2$ , voltaje del campo eléctrico;  $X_3$ , concentración de etanol;  $X_4$ , concentración de  $\text{CaCl}_2$ ; ( $X_3$  y  $X_4$  se encuentran en diferentes proporciones en la solución de recepción). El total de corridas experimentales, con los niveles codificados correspondientes de cada combinación de factores se muestran en la Tabla 4.

Las variables respuesta fueron, diámetro promedio de las esferas y coeficiente de variación (como medida de cuantificación de la dispersión de tamaño de las esferas que se presentó dentro de cada corrida) expresado en porcentaje.

**Tabla 3.** Diseño experimental con los diferentes niveles ensayados para cada factor.

Arreglo	Factores	Niveles				
		$-\alpha$	$-1$	$0$	$1$	$\alpha$
Factorial $2^4$	Flujo (mL/h)	0.05	0.1625	0.275	0.3875	0.5
	Voltaje (kV)	8	10	12	14	16
	Concentración etanol (%)	50	62.5	75	87.5	100
	Concentración $\text{CaCl}_2$ (%)	2	6.5	11	15.5	20

**Tabla 4.** Valores codificados de las diferentes corridas experimentales para la fabricación de esferas por electrospersión.

Corrida No.	Valores codificados	Corrida No.	Valores codificados
<b>1</b>	-1,-1,-1,-1	<b>15</b>	-1, 1, 1,-1
<b>2</b>	-1, 1,-1,-1	<b>16</b>	-1,-1, 1,-1
<b>3</b>	0,0,- $\alpha$ ,0	<b>17</b>	-1, 1,-1,1
<b>4</b>	0,0,0,0	<b>18</b>	1,-1,1,1
<b>5</b>	0,0,0,0	<b>19</b>	1, 1,1,-1
<b>6</b>	1, 1, -1, 1	<b>20</b>	0, 0, 0, 0
<b>7</b>	$\alpha$ ,0,0,0	<b>21</b>	1, -1, -1, 1
<b>8</b>	-1, 1, 1, 1	<b>22</b>	1, -1, 1, -1
<b>9</b>	0,0,0,0	<b>23</b>	0, 0, 0, $\alpha$
<b>10</b>	0,- $\alpha$ ,0,0	<b>24</b>	- $\alpha$ , 0, 0, 0
<b>11</b>	-1,-1,-1,1	<b>25</b>	0, 0, 0, - $\alpha$
<b>12</b>	-1,-1, 1,1	<b>26</b>	1, -1, -1, -1
<b>13</b>	0, $\alpha$ ,0,0	<b>27</b>	1, 1, 1, 1
<b>14</b>	0,0, $\alpha$ , 0	<b>28</b>	1, 1, -1,-1

Nota: Los valores centrales (0000) se realizaron por cuadruplicado para asegurar la repetibilidad y rotabilidad del diseño. El cero (0) indica punto central u origen; el signo negativo y positivo, indican nivel bajo y alto del factor, respectivamente. La letra  $-\alpha$  y  $\alpha$  indican el axial negativo y positivo, respectivamente.

## Fabricación Post-optimización

De acuerdo con el diseño experimental (Tabla 3) y el análisis estadístico por metodología de superficie de respuesta (Figuras 14 y 17), se determinaron las condiciones óptimas de fabricación, para el tamaño de partícula de  $1\mu$  y la menor variación posible. Con estas condiciones se realizaron nuevas corridas experimentales (Tabla 5), con dos repeticiones de cada condición, se denota: A, A2, B, B2, C, C2, D, D2, E, E2. Las microesferas obtenidas fueron analizadas por MEB, para comprobar su morfología, y determinar tamaño de partícula, asimismo para corroborar la efectividad de las condiciones de fabricación.

**Tabla 5.** Condiciones de fabricación usadas en el proceso post-optimización

Corrida	Voltaje (Kv)	Flujo (mL/h)	Conc. Etanol (%)	Conc. CaCl <sub>2</sub> (%)
A	16	0.175	98	8
B	8.3	0.208	51.5	9
C	11	0.972	75	11
D	14.5	0.142	89.5	11
E	12	0.275	75	2.5

Después de la fabricación, las muestras se “lavarón” para eliminar el etanol presente en el medio, y el cloruro de calcio. Lo anterior con el fin de reducir las posibles interferencias que pudiera causar la concentración de cloruro de calcio, y dejar las muestras en un medio acuoso. La muestra fue filtrada por un filtro para jeringa de malla de acero. Se dividió la muestra en alícuotas de 2 mL, se centrifugó por 10 min a 3,000 rpm (microcentrifuga Eppendorf-5415D, Alemania). Se descartó el sobrenadante y el pellet formado se resuspendió con 1 mL de agua ultrapura, por último las alícuotas de la misma muestra se mezclaron en un solo recipiente.

Después se tomaron 2 mL de la muestra, y se filtró a través de filtros para jeringa (Acrodisc® LC de 13 mm, membrana de PVDF 0.2 $\mu$ m, Pall). El líquido

filtrado se descartó, y el residuo en el filtro se resuspendió con 1 mL de agua ultrapura. Las muestras se almacenaron a 4 °C.

Una vez que las muestras fueron lavadas y filtradas se procedió con el análisis por MEB. Se tomaron 10  $\mu$ L de la muestra "lavada" y se colocaron en un portaobjetos de vidrio, se secaron a temperatura ambiente con ayuda de un flujo constante de nitrógeno durante 2 h. Una vez secas, las muestras se recubrieron mediante electrodeposición de oro, y se observaron en un microscopio FEI Quanta 200F (FEI Company, Hillsboro, OR, EE.UU.) a diferentes ampliaciones y con un voltaje de aceleración de 10 kV.

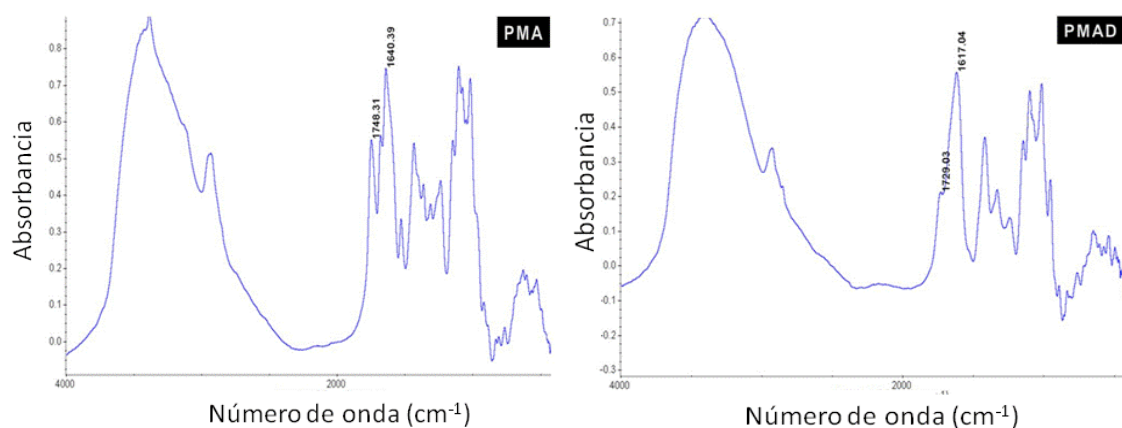
Por último, las imágenes generadas se analizaron por medio del software de dominio abierto ImageJ2X (Rawak Software, Inc). Se midieron los diámetros de las esferas en cada muestra. El análisis se realizó en cada fotografía capturada de cada campo. Aproximadamente 10 campos por muestra fueron tomadas al azar para estas mediciones. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el paquete estadístico NCSS 2007, y se obtuvieron las medidas de tendencia central (media, mediana y moda) para cada muestra.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### Grado de Esterificación

Se logró disminuir el grado de esterificación de la pectina hasta en un 86%, teniendo un grado de esterificación final de  $5.57 \pm 1.41$  (media  $\pm$  error estándar). En la figura 2 observamos los espectros de absorción para las pectinas PMA y PMAD.



**Figura 2.** Espectros de absorción FT-IR para las pectinas sin tratamiento (PMA) y las pectinas desesterificadas (PMAD). Se observa la drástica disminución del área de los 1750 en el espectro PMAD, respecto al PMA, evidencia de la disminución de metilación de los grupos carboxilo presentes.

A partir de las soluciones de PMAD (de muy bajo metoxilo) y de AXF-insulina, se realizó la fabricación de microesferas por electroaspersión coaxial, considerando que el grado de esterificación tan bajo aceleraría el proceso de nucleación con calcio, para conservar la estructura esférica de las microgotas formadas en la electroaspersión.

### Reología de las Soluciones de Trabajo

Conocer los valores de tiempo de gelificación, y firmeza de los geles formados por las soluciones de trabajo, fue crucial. En el caso de la pectina, se buscaba que la gelificación fuera lo más rápido posible para lograr conservar la estructura esférica de las microgotas formadas en la electroaspersión. Por otro lado, los geles de AXF tendrían que ajustarse a los tiempos de fabricación, para prevenir la obstrucción del sistema de inyección; con un tiempo de gelificación que permitiese manipular las soluciones al inicio de la fabricación, y una vez comenzada la misma, tener valores bajos de firmeza en las primeras dos horas después de agregada la lacasa. Los valores del tiempo de cruce de las distintas soluciones de trabajo, de los módulos de elasticidad ( $G'$ ) y viscosidad ( $G''$ ), conocido como el tiempo de gelificación, se muestran en la tabla 6.

En la tabla 6 se puede observar la complementariedad de los polímeros en función de  $G'$  y  $tg$ . Los valores observados por separado y en combinación se reflejaran así mismo en los estudios de reología.

El análisis visco-elástico de la solución de PMAD, se muestra en la figura 3. Se observa que desde el inicio de la cinética, los valores de  $G'$  son mayores a los de  $G''$ , indicando la presencia de un gel desde el inicio de la cinética. El mecanismo es tan rápido, prácticamente instantáneo, que el tiempo que tarda el equipo en realizar la primera medición ( $\approx 60$  seg), es demasiado como para detectar el cruce de los dos módulos.



**Tabla 6.** Tiempos de gelificación (tg) y valores finales del módulo de elasticidad (G'') de las soluciones de trabajo.

<b>Solución + Entrecruzante</b>	<b>tg<sup>*</sup> (min)</b>	<b>G'<sub>f</sub><sup>*</sup> (Pa)</b>
<i>PMAD + CaCl<sub>2</sub></i>	0.138 ± 0.00	824.976 ± 129.39
<i>AXF + Lacasa</i>	129.223 ± 10.78	3.252 ± 1.52
<i>AXF + Lacasa + Insulina</i>	6.365 ± 2.32	2.645 ± 0.65
<i>PMAD + AXF + Ins. + CaCl<sub>2</sub> + Lacasa</i>	0.137 ± 0.00	19.7342.34

\*Valores promedio ± error estándar

Los valores finales encontrados en el módulo G' de la solución de PMAD son mayores a los encontrados por Agoda-Tandjawa et al. (2012), quienes usaron una pectina comercial de bajo metoxilo (28 GE) en una solución de 1% en presencia de 3 mM de CaCl<sub>2</sub>, ellos obtuvieron un valor de G' alrededor de 6 Pa en 20 h, mucho menor comparada con la que se obtuvo en este estudio. Las diferencias pueden estar ligadas a los distintos grados de esterificación, donde un menor grado de esterificación propicia mayores puntos de interacción electrostática, al existir mayor número de grupos carboxilo disponibles; lo que se refleja en el aumento en la firmeza y en la velocidad de formación del gel. También se ha demostrado que el aumento en la concentración de iones de calcio, propicia un aumento en la fuerza de geles de pectina BGE (Gigli et al. 2009).

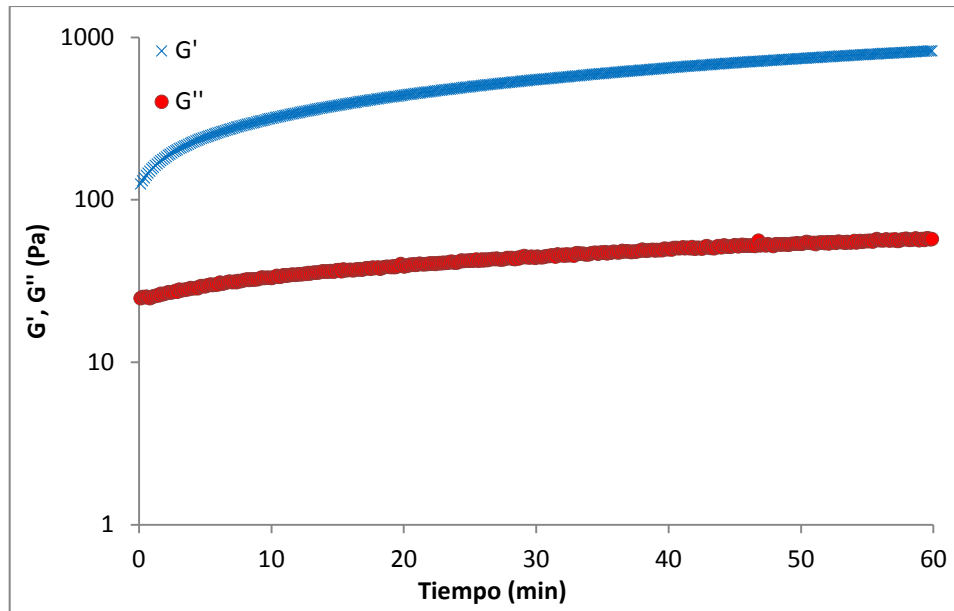
En el gel de AXF-lacasa (Figura 4), se observa una cinética de gelificación con un periodo de inestabilidad en el módulo elástico, de alrededor de 80 minutos, en donde las uniones covalentes, catalizadas por la oxidación mediada por lacasa, son insuficientes para estabilizar el sistema. Lo anterior probablemente debido a la baja concentración de lacasa, pero sobre todo el pH. El punto de cruce se da a las dos horas, y el gel tuvo una firmeza de 3.25 Pa, al los 180 minutos. En comparación con el trabajo de (Carvajal-Millan et al. 2006) donde se usó AXF a la misma concentración (3%), mayor concentración de lacasa y menor pH (5), el comportamiento reológico fue diferente al presente. En este

caso se encontraron un tiempo de gelificación menor y estabilidad del módulo elástico desde el inicio de la cinética.

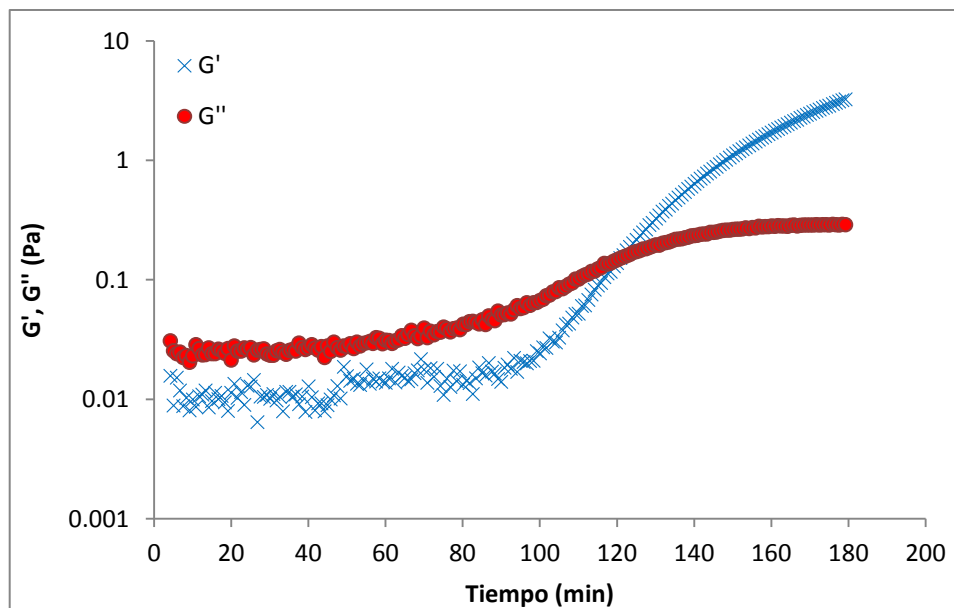
La cinética de gelificación de la solución de AXF e insulina, inducida por lacasa se muestra en la figura 5. A diferencia de la cinética mostrada en la solución de AXF sin insulina, el módulo  $G'$  muestra estabilidad desde el inicio, el tiempo de gelificación es más rápido (6.37 min) y en el periodo de 180 minutos se alcanza el "plateau". Asociado a esto, al final de la cinética se obtuvo una fuerza de gel de 2.645 Pa, valor por debajo del obtenido en el gel sin insulina.

Las diferencias encontradas entre los tiempos de gelificación de AXF mediados por lacasa, sin y con insulina se deben a los cambios en la composición de las soluciones. Por un lado, tenemos disminución de pH, al momento de agregar HCl y ácido glutámico a la solución, el pH original disminuye y esto provoca que la lacasa sea más eficiente en su proceso oxidativo. Por otro lado tenemos mayor concentración de componentes en la segunda solución, si bien es la misma concentración de AXF, el total de la solución es más concentrada. El aumento en concentración propicia un mayor número de puntos de entrecruzamiento o contactos entre las cadenas de arabinosilanos, acelerando el proceso de gelificación.

Las diferencias entre la fuerza de los geles de AXF, con y sin insulina, se encuentran ligadas al cambio de velocidad de gelificación mediado por la lacasa. Kuuva et al. (2003) mencionan, que si el entrecruzamiento mediado por lacasa es demasiado rápido, las cadenas poliméricas no tienen el tiempo suficiente para acomodarse, ocasionando un gel con menor número de enlaces covalentes, por lo tanto un gel más débil. Aunado a lo anterior, la posible formación de microagregados de insulina, pudieran estar debilitando la red tridimensional que forma el gel.



**Figura 3.** Cinética de gelificación de la solución de PMAD (1% p/p) inducida por  $\text{CaCl}_2$ . Las condiciones de la cinética fueron 25 °C, 2.5% de deformación y 0.25 Hz de frecuencia.

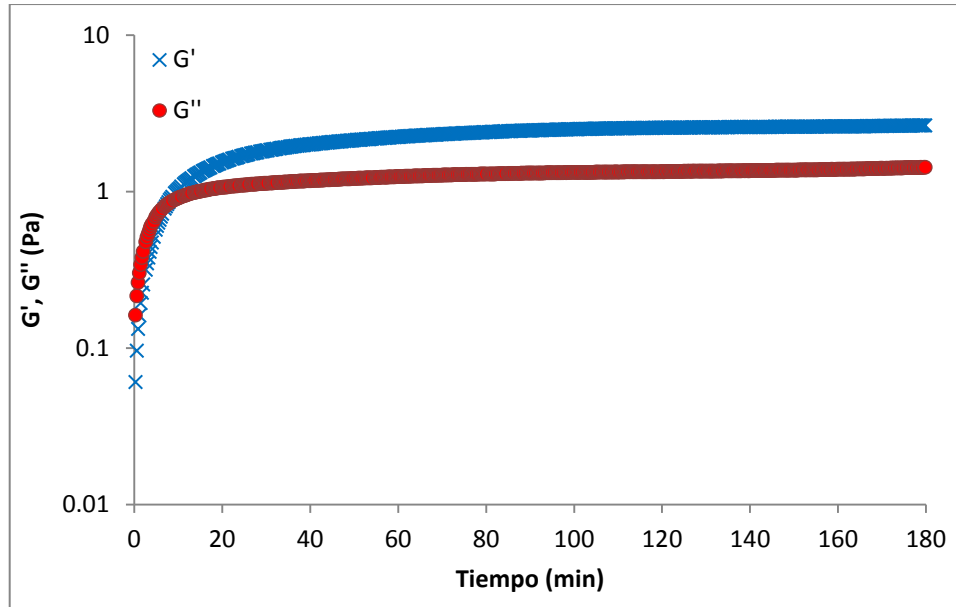


**Figura 4.** Cinética de gelificación de la solución de AXF (3% p/p) inducida por lacasa (0.037 U/ $\mu\text{L}$ ). Las condiciones de la cinética fueron 25 °C, 2.5% de deformación y 0.25 Hz de frecuencia.

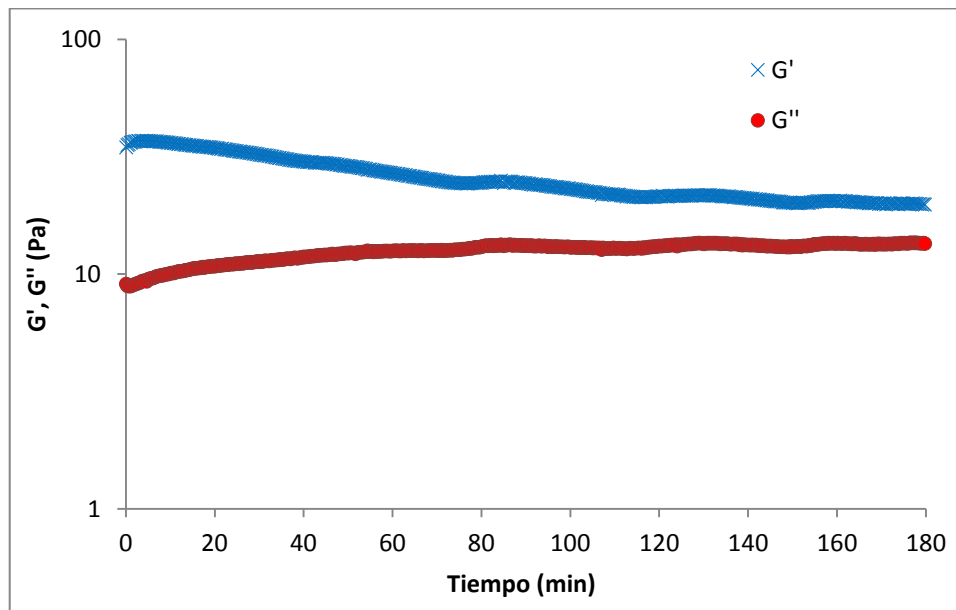
Por último, se tiene la reología de los geles mixtos de PMAD y AXF-insulina (Figura 6). A la fecha, no existen reportes acerca del estudio o utilización de una matriz mixta de pectina y arabinosilanos. En principio se observa que el mecanismo de gelificación dominante es el de la pectina mediado por calcio. De inicio el módulo  $G'$ , se encuentra por arriba del módulo  $G''$ , indicando la formación de un gel de manera prácticamente instantánea. Pero con el paso del tiempo, el diferencial entre  $G'$  y  $G''$  va disminuyendo, sobre todo por el descenso de  $G'$ . El valor de  $G'$  final es menor al de  $G'$  inicial, un comportamiento atípico para los estudios de reología en sistemas de gelificación mediados tanto por calcio como por lacasa. Por otro lado, el valor inicial de  $G'$  es menor al valor inicial de  $G'$  en el gel PMAD-Ca, pero mayor comparado con los geles de AXF-lacasa.

El comportamiento atípico antes mencionado en el sistema mixto (Figura 6), se puede explicar por la interacción de diferentes factores. En primer lugar, el sistema mixto de PMAD y AXF mostró cierto grado de incompatibilidad, al observarse una solución heterogénea y sin mezclarse por completo. Otro factor importante, y que también pudiera tener influencia en la incompatibilidad del sistema, es la gran cantidad de compuestos presentes en la solución (pectina, arabinosilanos,  $\text{CaCl}_2$ , lacasa, HCl, ácido glutámico, ácido acético, acetato de sodio, insulina) lo que provoca una solución saturada, repulsión o atracción de cargas y modificación del pH.

También se tiene que tomar en cuenta las interacciones posibles entre la lacasa y el calcio, como lo mencionan Kuuva et al. (2003). La tasa de gelificación inducida por la lacasa decrece en presencia de calcio, si bien este estudio se realizó en pectina ferulada, el sistema tiene los mismos mecanismos de gelificación, y este mismo fenómeno pudiera estar ocurriendo en el sistema PMAD-AXF.



**Figura 5.** Cinética de gelificación de la solución de AXF (3% p/p) + Insulina (3.6mg/mL), inducida por lacasa (0.037 U/ $\mu$ L). Las condiciones de la cinética fueron 25 °C, 2.5% de deformación y 0.25 Hz de frecuencia.



**Figura 6.** Cinética de gelificación de la solución compuesta de PMAD (1% p/p) de AXF (3% p/p) + Insulina (3.6mg/mL), inducida por lacasa (0.037 U/ $\mu$ L). Las condiciones de la cinética fueron 25 °C, 2.5% de deformación y 0.25 Hz de frecuencia.

Finalmente, es importante destacar que este sistema mixto no es igual al que existe en las microesferas. Ya que en las esferas se encuentran separadas las soluciones de PMAD y arabinosilanos, la gelificación de ambos se da en diferentes etapas. Si bien el análisis reológico no explica del todo la reología de la esfera completa, con los datos anteriormente mencionados podemos tener una idea de los que ocurre en los geles separados y en una posible región de transición donde se encontrarían en mezcla la pectina y el arabinosilano. Las microgotas formadas en la electroaspersión, gelifican al contacto con la solución entrecruzante; la solución de AXF-ins empieza a gelificar antes de la aspersion, aumentando la elasticidad con el tiempo, y en corridas mayores a 10 minutos la solución ya es un gel, pero muy débil, capaz de fluir; la región de transición, teóricamente sería la zona más inestable de la esfera y el punto más débil de la misma,

### Morfología y Tamaño de las Esferas

Para lograr regular la internalización y el transporte a través de las barreras de la mucosa intestinal, el tamaño de partícula, la composición, las propiedades superficiales y la geometría de las partículas son fundamentales. Particularmente, el tamaño de partícula en partículas cargadas con insulina, es un factor muy importante en la biodisponibilidad de la insulina. En base a estudios previos y reportados por Lamprecht et al. (2001); Morishita et al. (2004); Lacoeyille et al. (2007); Laroui et al. (2011) y de acuerdo a la capacidad del método de fabricación, se determinó que el tamaño de esfera optimo fuese de 1 $\mu$ m.

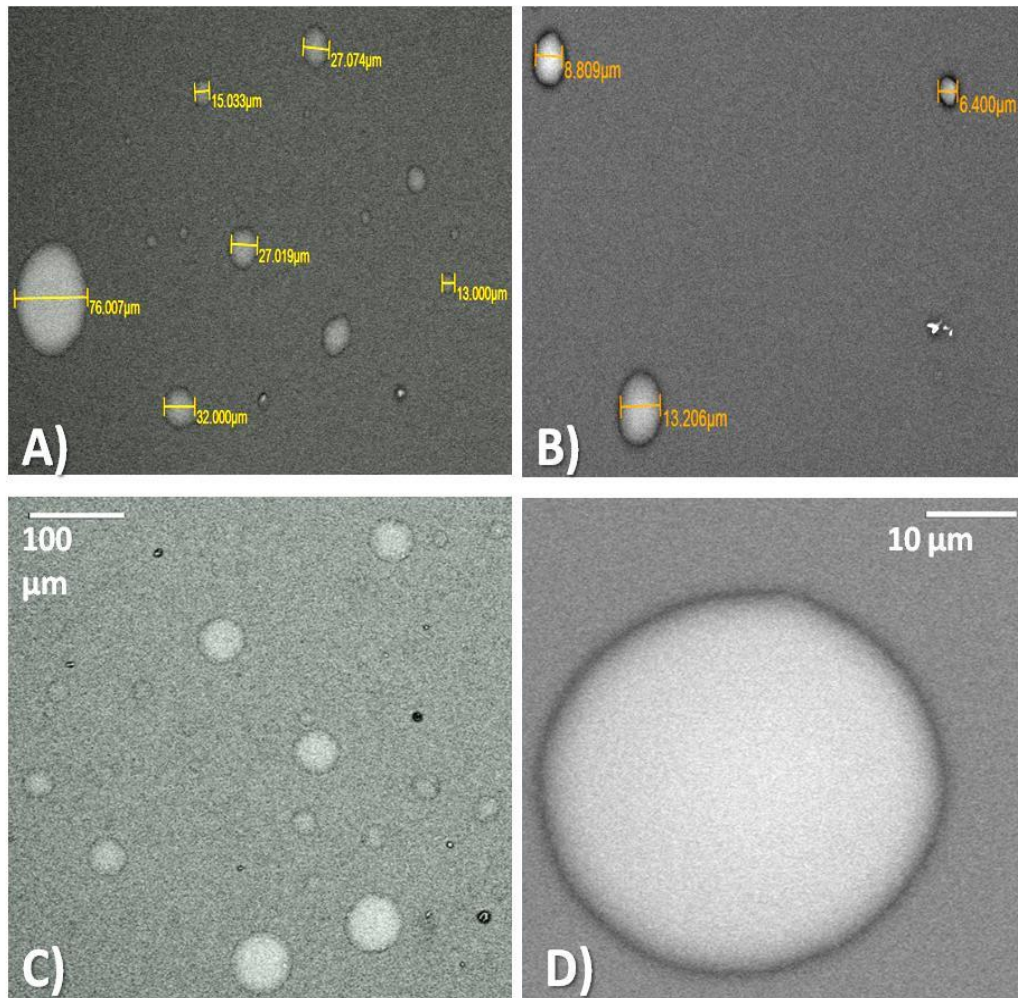
Se considera que 1 $\mu$ m, es lo suficientemente pequeña para lograr la adhesión al epitelio intestinal y la liberación de insulina, pero lo adecuadamente grande para evitar la internalización de las esferas por las células epiteliales. Con ello se promueve la degradación de la matriz biopolimérica, liberación de insulina y su posterior absorción en el colon.

Los valores promedio de los diámetros de las esferas, obtenidos por ensayos de DDL en cada corrida experimental, se encuentran en un rango de 0.58-28.89  $\mu\text{m}$ , y 16 de las 28 corridas experimentales tienen diámetros promedio menores a 3  $\mu\text{m}$ . En cuatro corridas experimentales se encontraron diámetros promedio menores a 1  $\mu\text{m}$ , estas se tomaron como representativas en las imágenes de microscopía (Figuras 3-5). Por otra parte, las muestras presentaron altos índices de dispersión en valores diametrales, en el rango de 3% a 55% de C.V., siendo diferente para cada corrida experimental.

En las imágenes de MEB, (Figura 7) se observaron solo las esferas mayores a 1  $\mu\text{m}$ , limitado por la capacidad de resolución del equipo en el modo de bajo vacío. En estas imágenes se destaca la geometría y simetría esférica de las estructuras, así como la estabilidad de las mismas, al no encontrar evidencia de agregación.

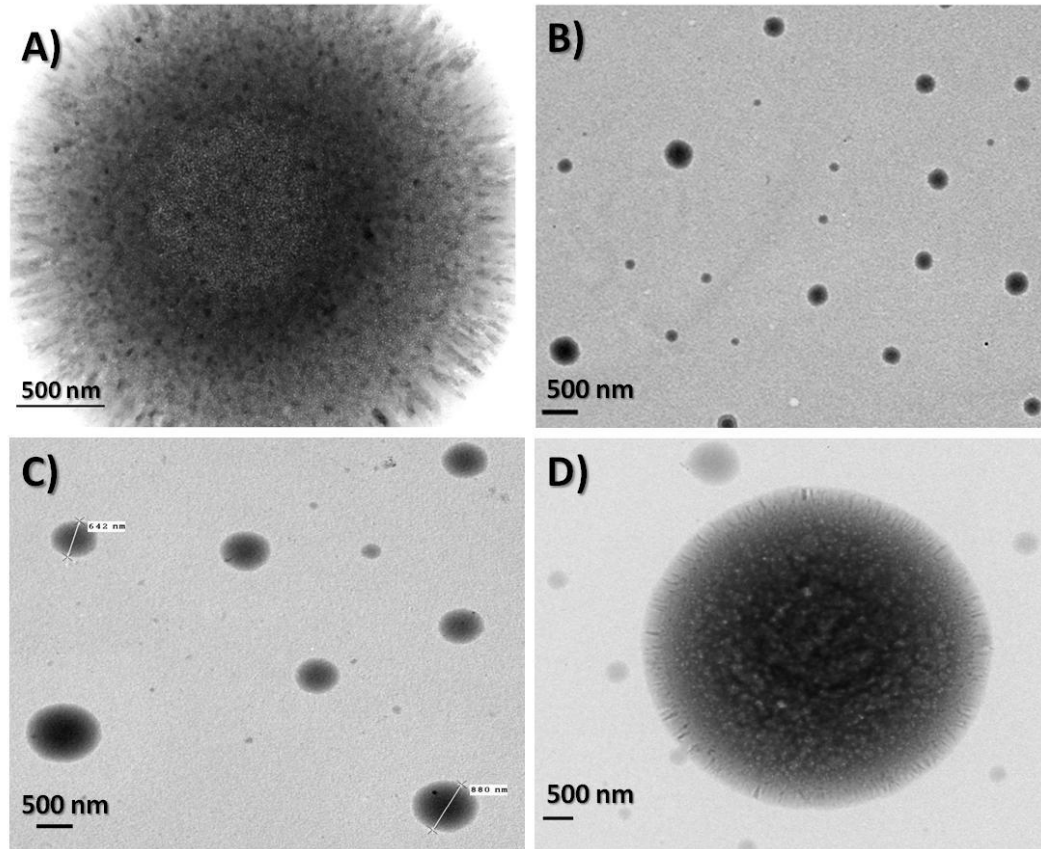
En las imágenes de MET (Figura 8), sí se logró observar estructuras menores a 1  $\mu\text{m}$ . Los resultados de geometría y simetría previamente encontrados en las imágenes de MEB, son respaldados con las imágenes obtenidas por MET, encontrando resultados similares. La diferencia que se destaca de estas imágenes frente a las de MEB, son las imágenes donde se distingue una posible estructura de las esferas del tipo núcleo-coraza. Otro dato relevante que se encontró en estas microscopias, fue la existencia de una especie de región de interface entre la pectina y los AXF-insulina.

Por otro lado, en las imágenes de CLSM que se muestran en la Figura 9, se aprecia auto-fluorescencia de las proteínas presentes. Las esferas poseen efectivamente un núcleo que contiene proteínas (principalmente insulina). La fluorescencia se ubica únicamente en la parte central de las esferas, y se puede observar el contorno de las mismas en una tonalidad opaca, sin fluorescencia, correspondiente a la cubierta de polisacáridos.

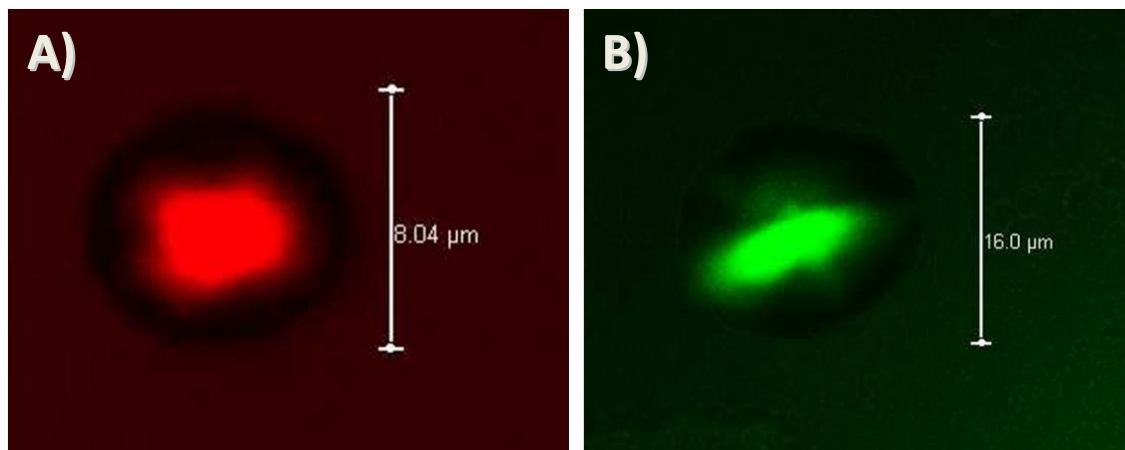


**Figura 7.** Imágenes de MEB. Se describen las condiciones de flujo de inyección, voltaje aplicado, concentración de etanol, concentración de  $\text{CaCl}_2$ . A) 0.275 mL/h, 12 kV; 75 %, 20%  $\text{CaCl}_2$ ; B) 0.388 mL/h, 14 kV; 87.5 %, 6.5 %; C) 0.5 mL/h, 14 kV, 87.5 %, 15.5 %; D) 0.275 mL/h, 12 kV; 75%, 2 %.





**Figura 8.** Imágenes de MET, con tinción negativa. Se describe las condiciones de flujo de inyección, voltaje aplicado, concentración de etanol, concentración de  $\text{CaCl}_2$ . A) 0.275 mL/h, 12 kV; 75 %, 2%  $\text{CaCl}_2$ ; B) 0.163 mL/h, 14 kV; 100 %, 15.5 %; C) 0.163 mL/h, 14 kV, 87.5 %, 6.5%; D) 0.163 mL/h, 14 kV; 100 %, 15.5 %.



**Figura 9.** Imágenes de CLSM. Se describen las condiciones de flujo de inyección, voltaje aplicado, concentración de etanol, concentración de  $\text{CaCl}_2$ . A) 0.5 mL/h, 14 kV; 87.5 %, 15.5 %  $\text{CaCl}_2$ ; B) 0.163 mL/h, 14 kV; 87.5 %, 15.5 %.

Los resultados demuestran que las esferas poseen un núcleo (donde se encuentra la insulina) y una coraza (mayoritariamente formada de pectina). Aunado a las imágenes, también se realizó un video modelación 3D (no mostrada) con el software propio del microscopio usado (standard Leica software platform). En esta modelación, se comprobó que las estructuras al interior de las partículas son aproximadamente esféricas constituyendo un núcleo claro y definido.

Con la información antes mencionada, se demuestra que la combinación de PMAD y AXF en un sistema coaxial, permite la formación y estabilización de los hidrogeles, para lograr obtener microesferas estables. La PMAD permitió conservar la estructura esférica de las microgotas formadas en la electroaspersión, evitando la agregación de los geles de AXF-Insulina. Lo anterior, gracias a su rápido mecanismo de gelificación al interaccionar con  $\text{Ca}^{+2}$ . Por otro lado, los AXF al formar geles químicos, mantuvieron atrapada a la insulina en la parte central de la esfera, delimitándose a la zona interna de la misma, a lo que llamamos el núcleo.

Algunos autores, como Ghayempour et al. (2013), han trabajado previamente con sistemas de electroaspersión coaxial, en este caso con alginato (que posee un mecanismo de gelificación similar a la pectina). En sus resultados encontraron, al igual que en este trabajo, la formación de estructuras simétricas y esféricas, sin evidencia de aglomeración. Esto nos indica que la nucleación del calcio en la superficie de las esferas con polisacáridos aniónicos, ayuda a la estabilización de las partículas y de sus cargas.

Por otro lado, respecto al tamaño de las esferas, se encontró que tanto el diámetro como la dispersión variaron en cada corrida experimental. En un trabajo previo publicado por Cao et al. (2014), se reportó la fabricación de esferas con una morfología de núcleo-coraza, por electroaspersión coaxial de PLA-PEG, y se encontraron diámetros promedio de alrededor de  $3\mu\text{m}$ . Con esta

evidencia se determina que el sistema de electroaspersión acoplada a una aguja coaxial, es efectivo para la fabricación de esferas del tipo núcleo-coraza ya sea con polímeros sintéticos, o polímeros naturales.

A diferencia de otros estudios donde se utilizan otros métodos de fabricación (Sarmiento et al. 2007; Zhang et al. 2011b), en nuestro sistema, la electroaspersión permitió ubicar a la insulina en el núcleo de la esfera, y no dispersa en toda la estructura. Este arreglo espacial beneficia la conservación de las propiedades de la insulina. Al contar con una coraza protectora de pectina, y estar atrapada dentro de una red covalente de arabinosilanos, en conjunto, esta "armadura" evitará su liberación y degradación prematura.

### Análisis Estadístico

Los datos de cada corrida experimental se utilizaron para modelar el efecto de los cuatro factores ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ) sobre el tamaño de esfera y su coeficiente de variación. Los datos se analizaron por la metodología de superficie de respuesta (MSR) ajustando un modelo polinomial de segundo orden (ecuación 2). El diseño, así como el análisis de los datos se realizaron en el software estadístico JMP® 11.1.0 2013 de SAS Institute Inc.

Después de analizar los datos mediante MSR, se buscó el modelo predictivo más adecuado en base a la significancia de los diferentes parámetros y al coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Por lo que el modelo original se ajustó, eliminando los parámetros con las probabilidades más altas y con la menor modificación de la  $R^2$ . Los parámetros lineales quedaron excluidos de su eliminación, debido a que son los factores directos que conforman el diseño. Para encontrar los valores óptimos de los factores estudiados y analizar el comportamiento de las interacciones, se realizaron los gráficos de perfil predictivo y perfil de superficie, solo para los parámetros significativos en el modelo.

(2)

*Tamaño de partícula*

$$\begin{aligned} &= \beta_0 + \beta_1(X_1) + \beta_2(X_2) + \beta_3(X_3) + \beta_4(X_4) + \beta_{11}(X_1)^2 + \beta_{22}(X_2)^2 \\ &+ \beta_{33}(X_3)^2 + \beta_{44}(X_4)^2 + \beta_{12}(X_1 \times X_2) + \beta_{13}(X_1 \times X_3) + \beta_{14}(X_1 \times X_4) \\ &+ \beta_{23}(X_2 \times X_3) + \beta_{24}(X_2 \times X_4) + \beta_{34}(X_3 \times X_4) \end{aligned}$$

*Dónde:*

$\beta_0$  = *Intercepto*

$X_1$  = *Flujo*

$X_2$  = *Voltaje*

$X_3$  = *Concentración de etanol*

$X_4$  = *Concentración de CaCl<sub>2</sub>*

$\beta_1$  = *Coefficiente de regresión lineal para X<sub>1</sub>*

$\beta_2$  = *Coefficiente de regresión lineal para X<sub>2</sub>*

$\beta_3$  = *Coefficiente de regresión lineal para X<sub>3</sub>*

$\beta_4$  = *Coefficiente de regresión lineal para X<sub>4</sub>*

$\beta_{11}$  = *Coefficiente de regresión para el efecto cuadrático de X<sub>1</sub>*

$\beta_{22}$  = *Coefficiente de regresión para el efecto cuadrático de X<sub>2</sub>*

$\beta_{33}$  = *Coefficiente de regresión para el efecto cuadrático de X<sub>3</sub>*

$\beta_{44}$  = *Coefficiente de regresión para el efecto cuadrático de X<sub>4</sub>*

$\beta_{12}$  = *Coefficiente de regresión para la interacción X<sub>1</sub> con X<sub>2</sub>*

$\beta_{13}$  = *Coefficiente de regresión para la interacción X<sub>1</sub> con X<sub>3</sub>*

$\beta_{14}$  = *Coefficiente de regresión para la interacción X<sub>1</sub> con X<sub>4</sub>*

$\beta_{23}$  = *Coefficiente de regresión para la interacción X<sub>2</sub> con X<sub>3</sub>*

$\beta_{24}$  = *Coefficiente de regresión para la interacción X<sub>2</sub> con X<sub>4</sub>*

$\beta_{34}$  = *Coefficiente de regresión para la interacción X<sub>3</sub> con X<sub>4</sub>*

### Análisis de Superficie de Respuesta para Tamaño de Partícula

En la ecuación 3 se muestra el modelo matemático predictivo para el tamaño de partícula después de su ajuste. El modelo presenta una capacidad predictiva  $R^2 = 0.731$ , y con una significancia de  $p=0.0102$ . Para la variable tamaño de partícula, ninguno de los factores lineales fueron significativos ( $p>0.05$ ), al igual que los parámetros cuadráticos ( $p>0.05$ ), por lo que estos últimos fueron eliminados de la ecuación de predicción (exceptuando el término cuadrático de  $X_3$ , que muestra una tendencia hacia significancia). Por el contrario, todas las interacciones entre factores resultaron significativas ( $p<0.05$ ) como se observa en la Tabla 7.

El modelo indica que los factores individuales por si solos no tienen influencia significativa sobre el tamaño de partícula, y es necesaria la interacción de estos para lograr una predicción. De acuerdo con esto, se predice que para controlar el tamaño de partícula, es necesario modificar los factores en forma de combinaciones, y no por la manipulación individual de alguno de ellos.

(3)

**Tamaño de partícula**

$$\begin{aligned}
 &= -52.488 - 6770.748(\text{Flujo}) + 397.411(\text{Voltaje}) \\
 &- 40.049(\text{Conc. Etanol}) + 247.409(\text{Conc. CaCl}_2) \\
 &- 11623.54(\text{Flujo} \times \text{Voltaje}) + 2047.410(\text{Flujo} \times \text{Conc. Etanol}) \\
 &- 120.480(\text{Voltaje} \times \text{Conc. Etanol}) + 8.714(\text{Conc. Etanol})^2 \\
 &- 5474.928(\text{Flujo} \times \text{Conc. CaCl}_2) + 294.301(\text{Voltaje} \times \text{Conc. CaCl}_2) \\
 &- 46.109(\text{Conc. Etanol} \times \text{Conc. CaCl}_2)
 \end{aligned}$$

**Tabla 7.** Detalles de coeficiente de regresión, error estándar y significancias para el modelo de segundo orden del tamaño de partícula.

Parámetros	Coefficiente de regresión	Error estándar	Probabilidad
<b>Constante del modelo</b>	-52.488	7072.689	0.9942
$X_1$	-6770.748	7132.886	0.3575
$X_2$	397.411	396.321	0.3319
$X_3$	-40.049	63.508	0.5378
$X_4$	247.409	176.143	0.1805
$X_1 * X_2$	-11623.54	4514.651	0.0211*
$X_1 * X_3$	2047.410	722.344	0.0126*
$X_2 * X_3$	-120.480	40.135	0.0089*
$(X_3)^2$	8.714	4.58	0.0765**
$X_1 * X_4$	-5474.928	2006.511	0.0155*
$X_2 * X_4$	294.301	111.487	0.0186*
$X_3 * X_4$	-46.109	17.838	0.0207*

\*Diferencias significativas  $p > 0.05$

\*\*No significativo, pero indica una tendencia

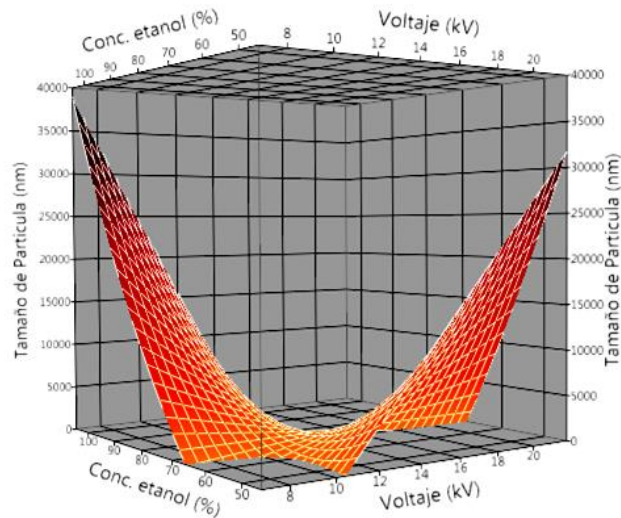
La interacción con mayor influencia ( $p=0.0089$ ) sobre el tamaño de partícula fue la interacción entre el voltaje del campo eléctrico y la concentración de etanol

en la solución de gelificación. En la Figura 10 se muestra el gráfico de superficie de respuesta, donde se observa un comportamiento del tipo silla, es decir la respuesta de tamaño de partícula aumenta o disminuye a partir del centro. A partir del centro surgen dos curvas ascendentes, la curva más pronunciada hacia los valores altos de voltaje y flujo.

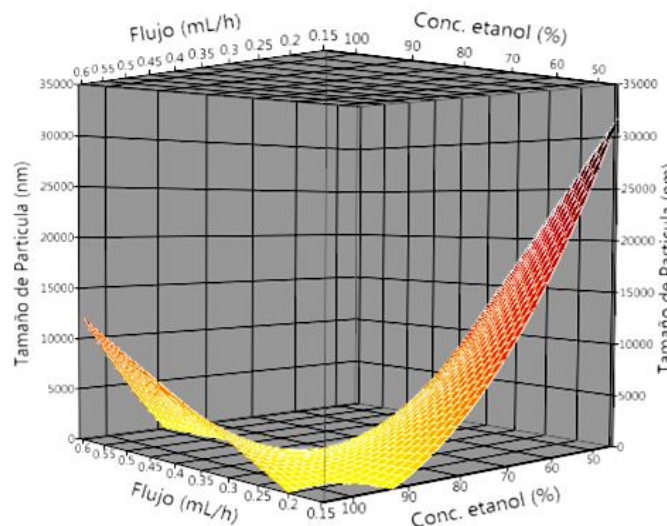
La segunda interacción en importancia ( $p=0.0126$ ) fue flujo de inyección contra concentración de etanol. En esta interacción se muestra una superficie de respuesta (Figura 11) del tipo silla, pero con una fuerte tendencia ascendente en el nivel bajo de porcentaje de etanol. La zona de menor valor en tamaño de partícula se encuentra a concentraciones altas de etanol y niveles del flujo de medio a bajo.

Los efectos interactivos de entre flujo y concentración de  $\text{CaCl}_2$ , y voltaje y  $\text{CaCl}_2$  frente a la respuesta de tamaño de partícula, tuvieron una significancia de  $p=0.0155$  y  $p=0.0186$  respectivamente. Ambas interacciones resultan en un gráfico de superficie de respuesta del tipo silla (Figura 12), con la interacción de valores medios de los factores para una respuesta baja de tamaño de partícula. De igual forma que en las anteriores interacciones, existen curvas ascendentes a partir del centro, con un máximo para los niveles bajos de voltaje en su interacción con  $\text{CaCl}_2$ , y un máximo para los niveles altos de  $\text{CaCl}_2$  al interactuar con niveles bajos de flujo.

La interacción de los dos componentes de la solución entrecruzante, concentración de  $\text{CaCl}_2$  y concentración de etanol, resultó significativa ( $p=0.0207$ ). Esta interacción tiene un punto de silla entre los niveles medios de ambos factores. La respuesta hacia los extremos máximos es similar, en ambos casos en los niveles altos, con una silla prácticamente simétrica (Figura 13).



**Figura 10.** Gráfico de superficie de respuesta para tamaño de partícula, contra voltaje y concentración de etanol.



**Figura 11.** Gráfico de superficie de respuesta para tamaño de partícula, contra la interacción de flujo y voltaje

Los componentes propios de electroaspersión, flujo del polisacárido, y voltaje del campo eléctrico, fueron significativos en su interacción ( $p=0.0211$ ). Al analizar la interacción de estos dos parámetros por medio de la MSR, resulta en un gráfico del tipo silla sobre los valores de medio a bajo voltaje, y nivel medio de flujo, como se puede observar en la figura 13. Se encontraron máximos en

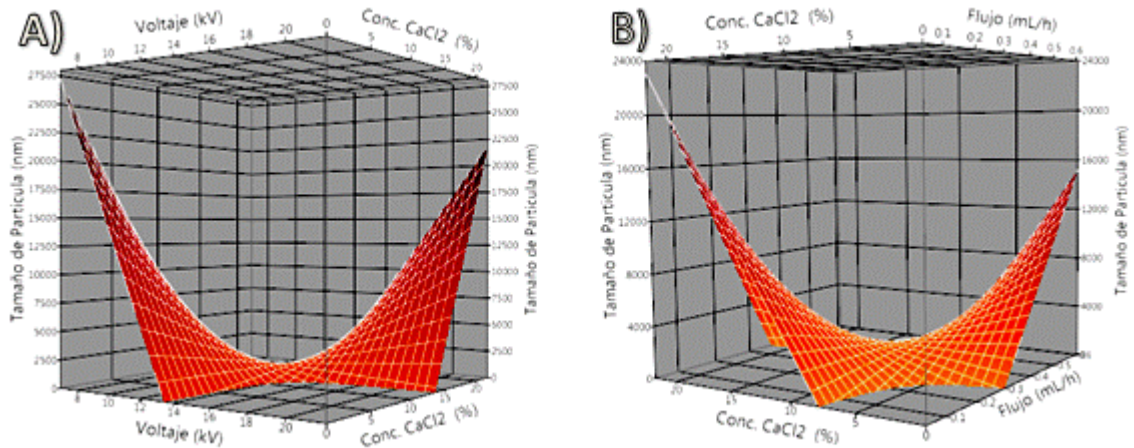
voltajes altos y valores de flujo bajos, con la misma tendencia a niveles altos de flujos y valores bajos de voltaje.

La respuesta óptima en el entorno experimental para tamaño de partícula se consideró de  $1\mu\text{m}$ . En el modelo obtenido por la metodología de superficie de respuesta no se logró obtener una solución matemática para cada valor, probablemente debido a que sólo las interacciones de los factores fueron significantes, no así los factores individuales. Lo anterior, y manipulando los perfiles predictivos a través de la herramienta de MSR, tenemos que existe más de una solución posible de los valores óptimos de los niveles para la respuesta deseada.

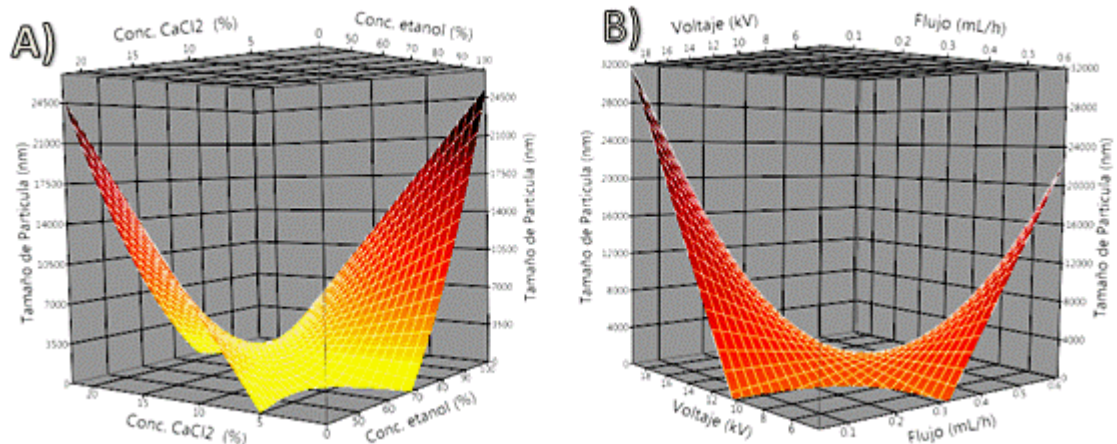
En la figura 14 se observan tres diferentes soluciones (b, c, d) para obtener aproximadamente el mismo valor en el tamaño de partícula. En estos perfiles se muestra que los factores flujo, voltaje y concentración de  $\text{CaCl}_2$  tienen un comportamiento lineal, mientras que concentración de etanol tiene un efecto cuadrático. En las figuras 14b y 14c se simula la combinación de nivel de flujo bajo con nivel de voltaje medio, y nivel de flujo bajo con nivel de voltaje alto, respectivamente. En el primer caso, al aumentar todos los factores el tamaño de partícula aumentaría, y sólo la disminución de concentración de etanol provocaría un aumento en tamaño; para el segundo perfil, a voltajes altos, la disminución de flujo y de etanol se reflejaría en un aumento de tamaño, contrario a la concentración de  $\text{CaCl}_2$ , que al aumentar también incrementaría el tamaño de partícula.

En el caso de la figura 14d, tres de los cuatro factores se encuentran en el nivel medio, con excepción de concentración de  $\text{CaCl}_2$ , que se sitúa en el nivel bajo; en este modelo se observa que voltaje y flujo tienen tendencias contrarias: si aumentara el flujo aumentaría el tamaño de partícula, contrario al voltaje, donde se presenta una relación inversamente proporcional.

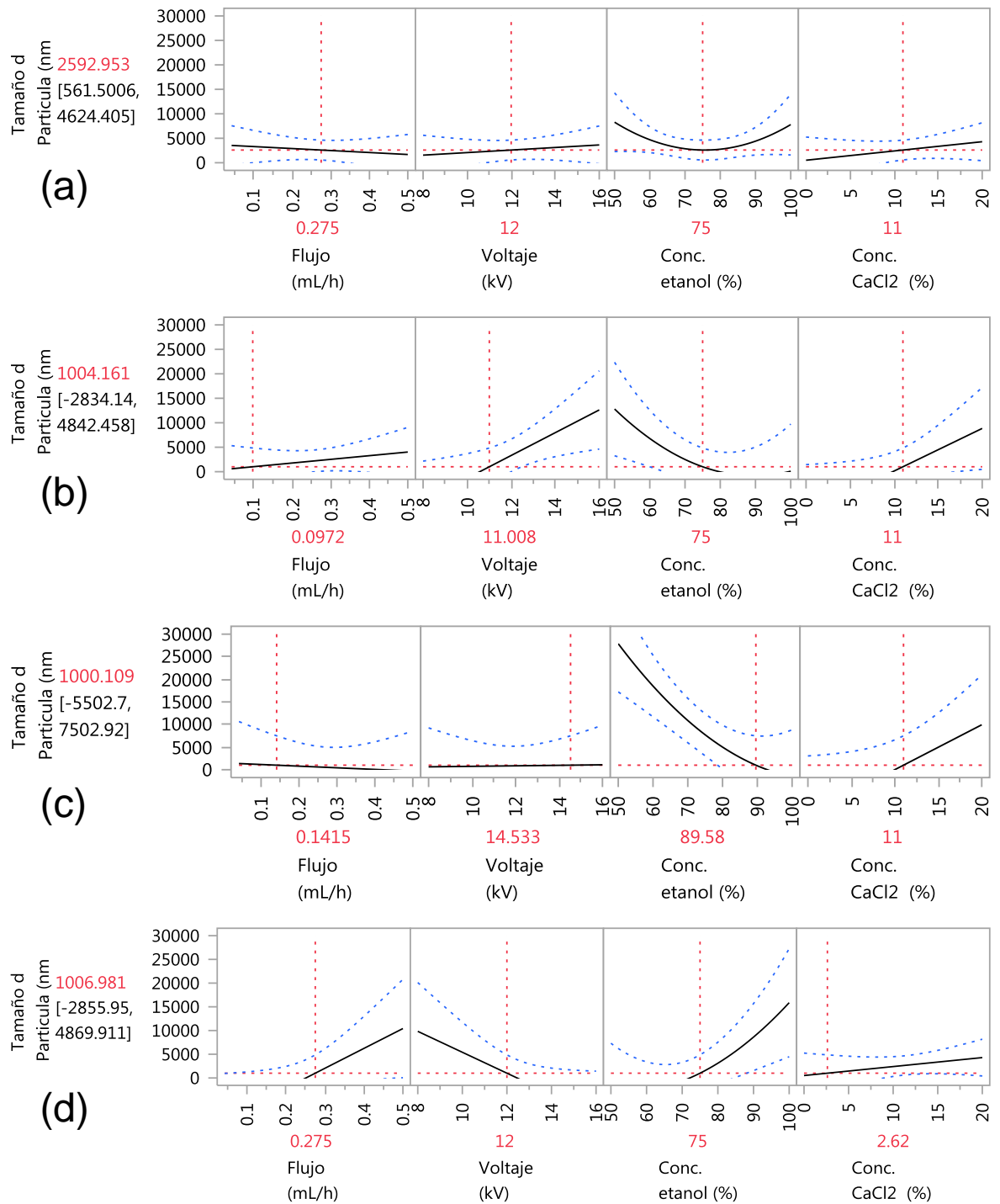




**Figura 12.** Gráficos de superficie de respuesta para Tamaño de partícula en la interacción de voltaje con concentración de CaCl<sub>2</sub> (A), y entre el flujo y la concentración de CaCl<sub>2</sub> (B)



**Figura 13.** (A) Gráfico de superficie de respuesta para la respuesta de tamaño de partícula frente a la interacción dentro de la solución entrecruzante, entre concentración de etanol y concentración de CaCl<sub>2</sub>. (B) Gráfico de superficie de respuesta para la interacción de los factores de electrospersión flujo y voltaje para la respuesta de tamaño de partícula.



**Figura 14.** Gráficos de perfil de predicción para tamaño de partícula sobre la respuesta óptima para los niveles de flujo, voltaje, concentración de etanol, y concentración de CaCl<sub>2</sub>. Las líneas verticales en rojo indican el nivel óptimo de cada factor, y las líneas horizontales en rojo, señalan la respuesta del tamaño de partícula hacia la combinación de los factores. a) perfil predictivo con los niveles medios de los cuatro factores. En b), c), d), se tomó como valor óptimo el tamaño de partícula de 1 μm (1000 nm).

## Análisis de Superficie de Respuesta para CV

Una vez que se analizaron los datos mediante MSR, se encontraron las significancias de los factores estudiados ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Se buscó el modelo matemático más adecuado para predecir el coeficiente de variación.

El primer modelo planteado (ecuación 4) tuvo que ser modificado, trabajando únicamente con los factores que presentaron las probabilidades más altas, y cuidando que el coeficiente de determinación disminuyera lo menos posible. Los parámetros lineales quedaron excluidos de su eliminación, puesto que son los factores directos que conforman el diseño. Se encontraron los valores óptimos de los cuatro factores, analizando el comportamiento de las interacciones y parámetros significativos ( $p > 0.05$ ), los perfiles de predicción y gráficos de superficie.

El modelo matemático predictivo reducido (ecuación 5) para el coeficiente de variación presentó una capacidad predictiva de  $R^2 = 0.79$ , con un nivel de significancia  $p = 0.0059$ . En este modelo la única variable lineal significativa ( $p > 0.05$ ) fue el flujo, y dentro de los términos cuadráticos únicamente mostró significancia ( $p > 0.05$ ) la concentración de  $\text{CaCl}_2$  (Tabla 8). Respecto a las interacciones, sólo en la interacción flujo contra concentración de  $\text{CaCl}_2$  se encontró una  $p > 0.05$ . Lo anterior nos indica que el flujo y la concentración de  $\text{CaCl}_2$  son los factores con mayor influencia sobre la variación del tamaño de partícula.

(4)

*Coefficiente de variación*

$$\begin{aligned} &= \beta_0 + \beta_1(X_1) + \beta_2(X_2) + \beta_3(X_3) + \beta_4(X_4) + \beta_{11}(X_1)^2 + \beta_{22}(X_2)^2 \\ &+ \beta_{33}(X_3)^2 + \beta_{44}(X_4)^2 + \beta_{12}(X_1 \times X_2) + \beta_{13}(X_1 \times X_3) + \beta_{14}(X_1 \times X_4) \\ &+ \beta_{23}(X_2 \times X_3) + \beta_{24}(X_2 \times X_4) + \beta_{34}(X_3 \times X_4) \end{aligned}$$

$\beta_0$  = Intercepto

$X_1$  = Flujo

$X_2$  = Voltaje

$X_3$  = Concentración de etanol

$X_4$  = Concentración de  $\text{CaCl}_2$

$\beta_1$  = Coeficiente de regresión lineal para  $X_1$

$\beta_2$  = Coeficiente de regresión lineal para  $X_2$

$\beta_3$  = Coeficiente de regresión lineal para  $X_3$

$\beta_4$  = Coeficiente de regresión lineal para  $X_4$

$\beta_{11}$  = Coeficiente de regresión para el efecto cuadrático de  $X_1$

$\beta_{22}$  = Coeficiente de regresión para el efecto cuadrático de  $X_2$

$\beta_{33}$  = Coeficiente de regresión para el efecto cuadrático de  $X_3$

$\beta_{44}$  = Coeficiente de regresión para el efecto cuadrático de  $X_4$

$\beta_{12}$  = Coeficiente de regresión para la interacción  $X_1$  con  $X_2$

$\beta_{13}$  = Coeficiente de regresión para la interacción  $X_1$  con  $X_3$

$\beta_{14}$  = Coeficiente de regresión para la interacción  $X_1$  con  $X_4$

$\beta_{23}$  = Coeficiente de regresión para la interacción  $X_2$  con  $X_3$

$\beta_{24}$  = Coeficiente de regresión para la interacción  $X_2$  con  $X_4$

$\beta_{34}$  = Coeficiente de regresión para la interacción  $X_3$  con  $X_4$

(5)

*Coefficiente de variación*

$$\begin{aligned} &= 17.995 + 40.501(\text{Flujo}) + 1.065(\text{Voltaje}) - 0.288(\text{Conc. Etanol}) \\ &- 0.482(\text{Conc. CaCl}_2) + 127.964(\text{Flujo})^2 - 11.914(\text{Flujo} \times \text{Voltaje}) \\ &- 0.094(\text{Voltaje} \times \text{Conc. Etanol}) - 0.012(\text{Conc. Etanol})^2 \\ &- 11.082(\text{Flujo} \times \text{Conc. CaCl}_2) + 0.456(\text{Voltaje} \times \text{Conc. CaCl}_2) \\ &- 0.060(\text{Conc. Etanol} \times \text{Conc. CaCl}_2) + 0.481(\text{Conc. CaCl}_2)^2 \end{aligned}$$

Los coeficiente de regresión, error estándar y probabilidades de cada parámetro se pueden observar en la Tabla 8. La concentración de  $\text{CaCl}_2$  en su forma cuadrática fue el factor con mayor injerencia ( $p=0.0001$ ) sobre el modelo,

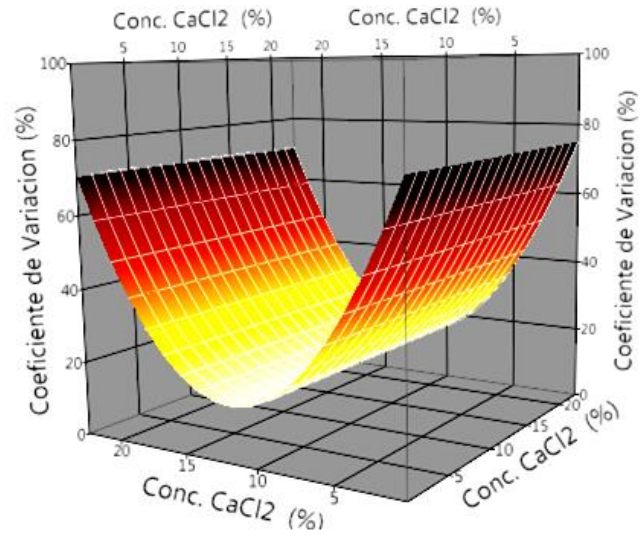
teniendo efecto positivo sobre el coeficiente de variación. Para este factor, los valores más bajos de CV se encuentran entre los niveles de 10 y 15% de concentración; y los niveles más altos de CV los encontramos en los extremos de baja y alta concentración de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 15).

**Tabla 8.** Detalles de coeficiente de regresión, error estándar y significancias para el modelo de segundo orden de coeficiente de variación.

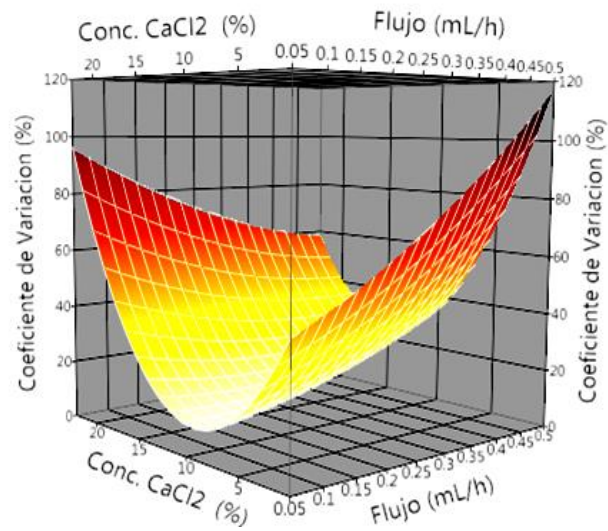
Parámetros	Coeficiente de regresión	Error estándar	Probabilidad
<b>Constante del modelo</b>	17.995	18.251	0.3409
$X_1$	40.501	18.224	0.0432*
$X_2$	1.065	1.008	0.3086
$X_3$	-0.288	0.162	0.0967
$X_4$	-0.482	0.449	0.3013
$(X_1)^2$	127.964	153.365	0.4181
$X_1 * X_2$	-11.914	11.438	0.3153
$X_2 * X_3$	-0.094	0.102	0.3699
$(X_3)^2$	-0.012	0.012	0.3171
$X_1 * X_4$	-11.082	5.0835	0.0468*
$X_2 * X_4$	0.046	0.283	0.1288
$X_3 * X_4$	-0.060	0.045	0.2050
$(X_4)^2$	0.480	0.094	0.0001*

\*Diferencias significativas  $p > 0.05$

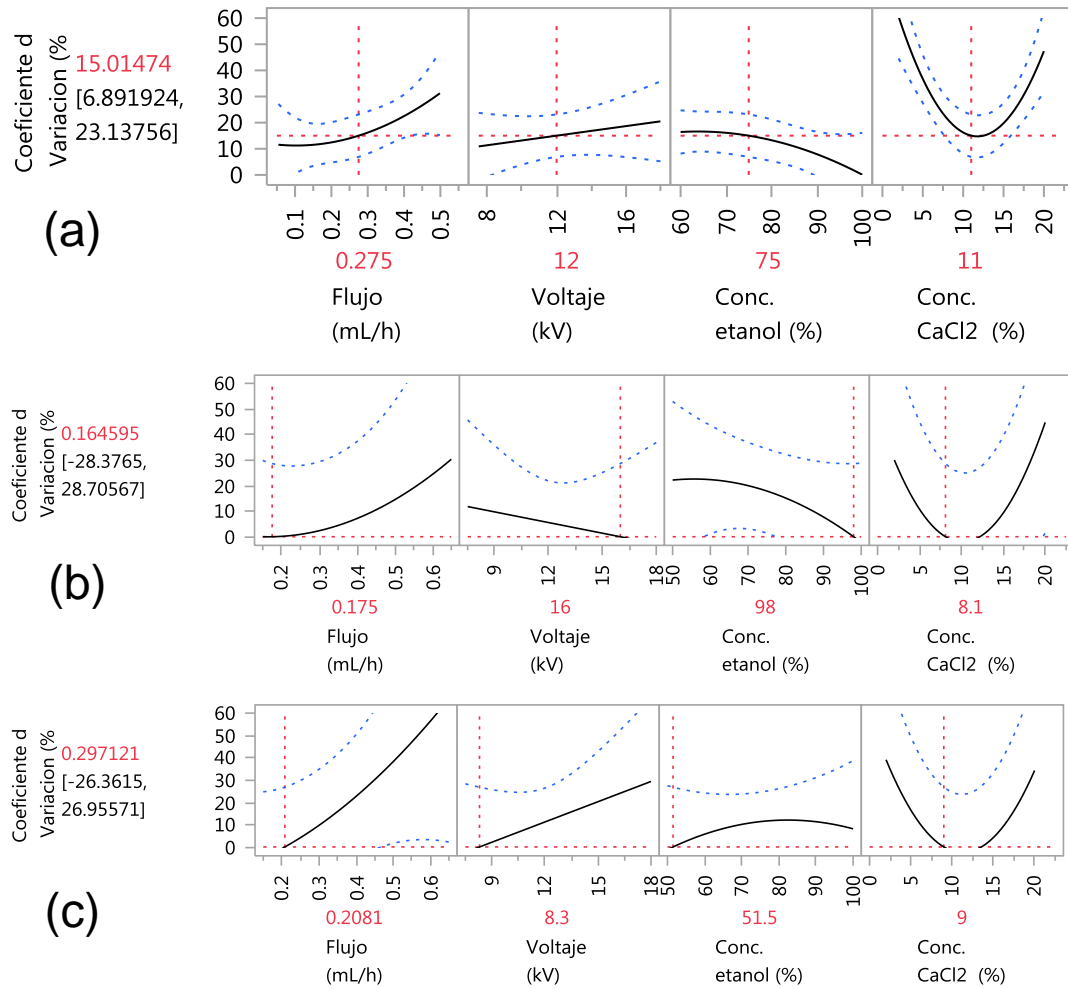
Se observó efecto ( $p=0.0432$ ) positivo del flujo en su parámetro lineal, contrario a la interacción del flujo con concentración de  $\text{CaCl}_2$  que arrojó un efecto ( $p=0.0468$ ) negativo. En la Figura 16 se puede ver el gráfico de MSR, que indica que los valores más bajos para el CV se localizan a concentraciones de  $\text{CaCl}_2$  de alrededor de 11% con un flujo de inyección bajo. Conforme aumenta el flujo, los valores de CV aumentan, hasta llegar al máximo con la combinación de flujos altos y concentraciones bajas de  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 15.** Gráfico de superficie de respuesta para el efecto cuadrático de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre el coeficiente de variación de tamaño de partícula.



**Figura 16.** Gráfico de superficie de respuesta para el efecto cuadrático de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  sobre el coeficiente de variación de tamaño de partícula.



**Figura 17.** Gráficos de perfil de predicción para CV sobre la respuesta óptima para los niveles de flujo, voltaje, concentración de etanol, y concentración de CaCl<sub>2</sub> respecto al coeficiente de variación en tamaño de partícula. Las líneas verticales en rojo indican el nivel óptimo de cada factor, y las líneas horizontales en rojo, señalan la respuesta del coeficiente de variación hacia la combinación de los factores. a) Perfil predictivo con los niveles medios de los cuatro factores; b) y c) perfiles predictivos para el valor de CV más bajo posible con las diferentes combinaciones de los factores.

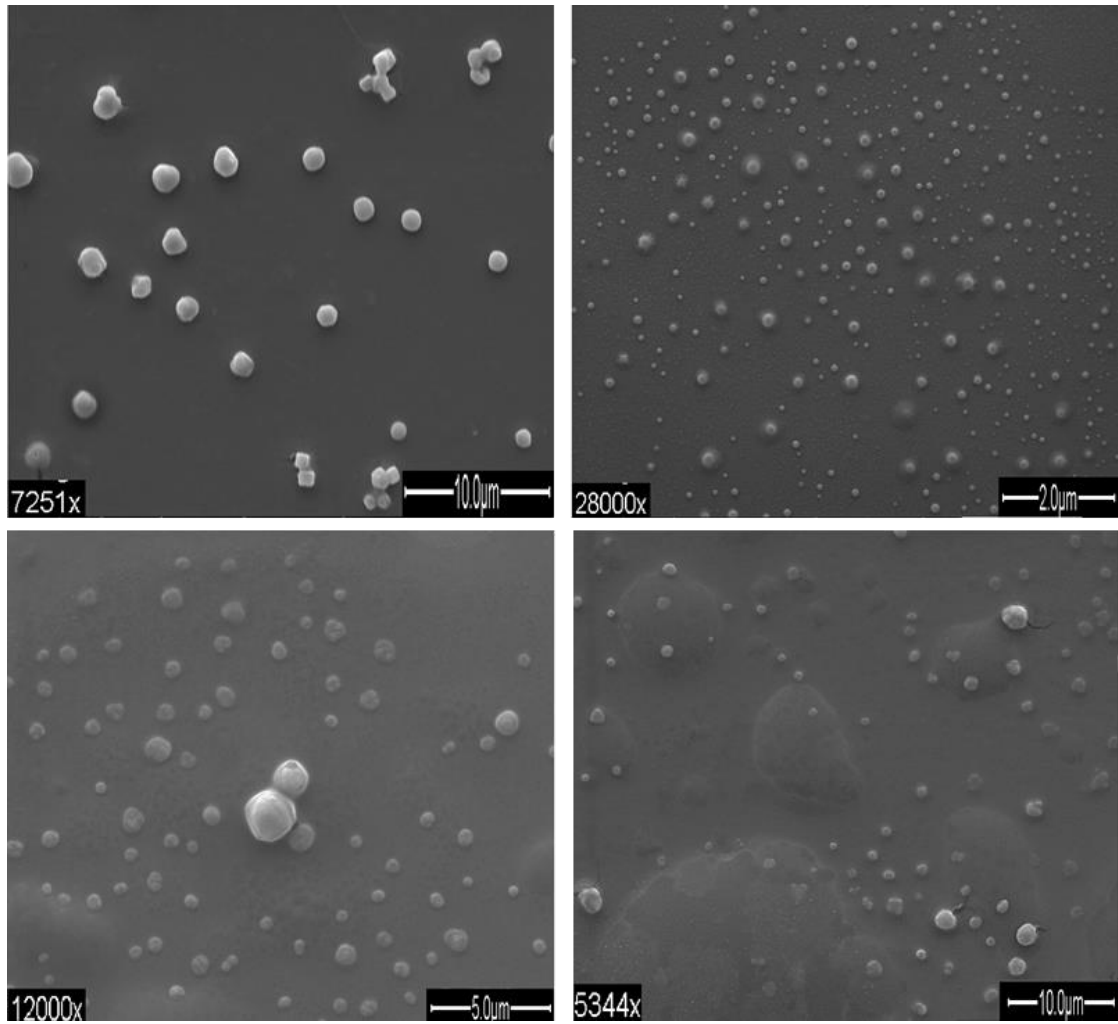
En el modelo obtenido por la metodología de superficie de respuesta (ecuación 5) se obtuvo una solución matemática con un valor de 35.55% en CV. Para cada factor los valores fueron: flujo= 0.48 mL/h, voltaje= 26.40 kV, concentración de etanol= 25.91%, y concentración de  $\text{CaCl}_2$ = 4.24%. Esta solución de modelo se desechó, ya que los valores de voltaje y etanol se encuentran por fuera del rango de los datos analizados, por lo que se basó en el perfil de predicción para determinar los valores críticos de cada factor.

En el perfil de predicción (Figura 17a) se observa la posible respuesta de coeficiente de variación a partir de los valores medios de cada factor. Para la optimización se observan dos soluciones (Figura 17b y 17c) para obtener el menor coeficiente de variación posible. En el perfil (b) se simula la combinación de nivel de flujo 0.175 mL/h, con nivel de voltaje 16 kV, 98 % de etanol y 11 % de concentración de  $\text{CaCl}_2$ , para obtener un coeficiente de variación de 0.17 %. Por otro lado, en el perfil (c), se obtiene un CV de 0.30 % con la combinación de un flujo a 0.208 mL/h, con un campo eléctrico de 8.3 kV, y una solución entrecruzante con concentraciones de 51.5 % de etanol y 9 %  $\text{CaCl}_2$ . Excepto por el factor voltaje, que tiene un comportamiento predictivo lineal, el resto de los factores muestran un efecto cuadrático.

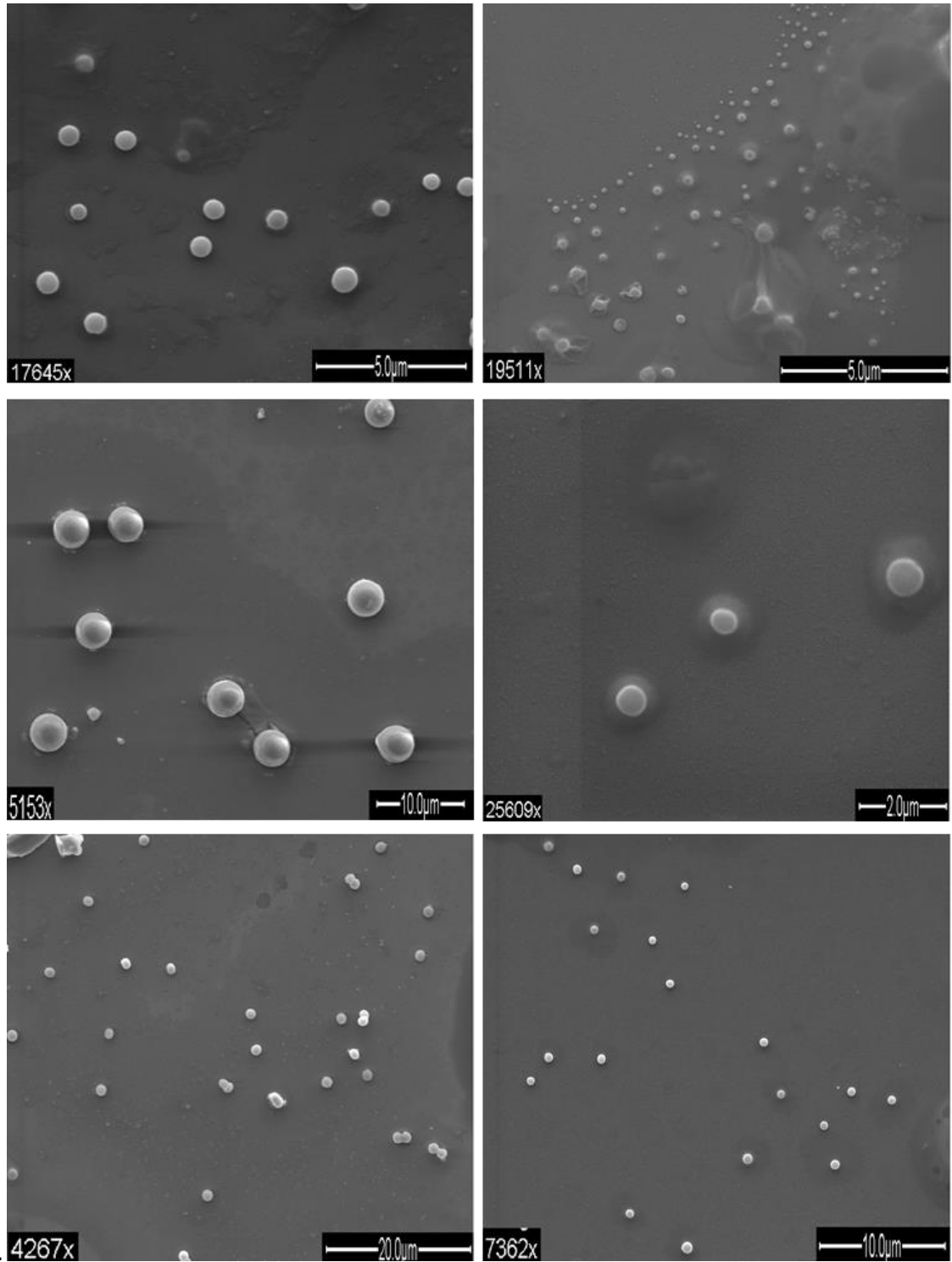
### Análisis Post-optimización

Se obtuvieron imágenes por MEB con mejor resolución, respecto a las primeras imágenes obtenidas en MEB en modo de bajo voltaje (Figura 3). En las figuras 1 y 2, se muestra una imagen representativa para cada muestra analizada; en las imágenes se observaron estructuras independientes, esféricas y sin presencia de agregados. Además de esto, la interferencia causada por el calcio fue eliminada, validando la eficacia del proceso de filtrado y limpieza de las muestras. Las características de las imágenes antes mencionadas permitieron usar el software de procesamiento de imágenes para obtener datos numéricos sobre el diámetro de las esferas.





**Figure 18.** Imágenes de MEB de la morfología de partículas fabricadas post optimización: D1, D2 y E1, E2. D1, D2 (arriba, izquierda-derecha) y E1, E2 (abajo, izquierda-derecha).



**Figure 19.** Imágenes de MEB de la morfología de partículas fabricadas post optimización: A1, A2, B1, B2, C1, C2. A1, A2 (arriba, izquierda-derecha), B1, B2 (medio, izquierda-derecha) y C1, C2 (abajo, izquierda-derecha).

Con los datos numéricos arrojados por el software, se obtuvieron las medidas de tendencia central de cada muestra que se observan en la Tabla 9. Estos valores son de ayuda para evaluar la variación respecto al tamaño de partícula dentro de cada muestra. En general, las muestras se ajustaron muy cerca de los valores esperados de alrededor de 1  $\mu\text{m}$ , con una variación menor como se observa en el error estándar.

Los resultados confirman que el diseño experimental para la optimización del proceso de fabricación es adecuado para la obtención de tamaños de partícula promedio de 1  $\mu\text{m}$ . La variación de los tamaños dentro de cada muestra se redujo (Tabla 9), en comparación con los resultados previos dentro de este trabajo.

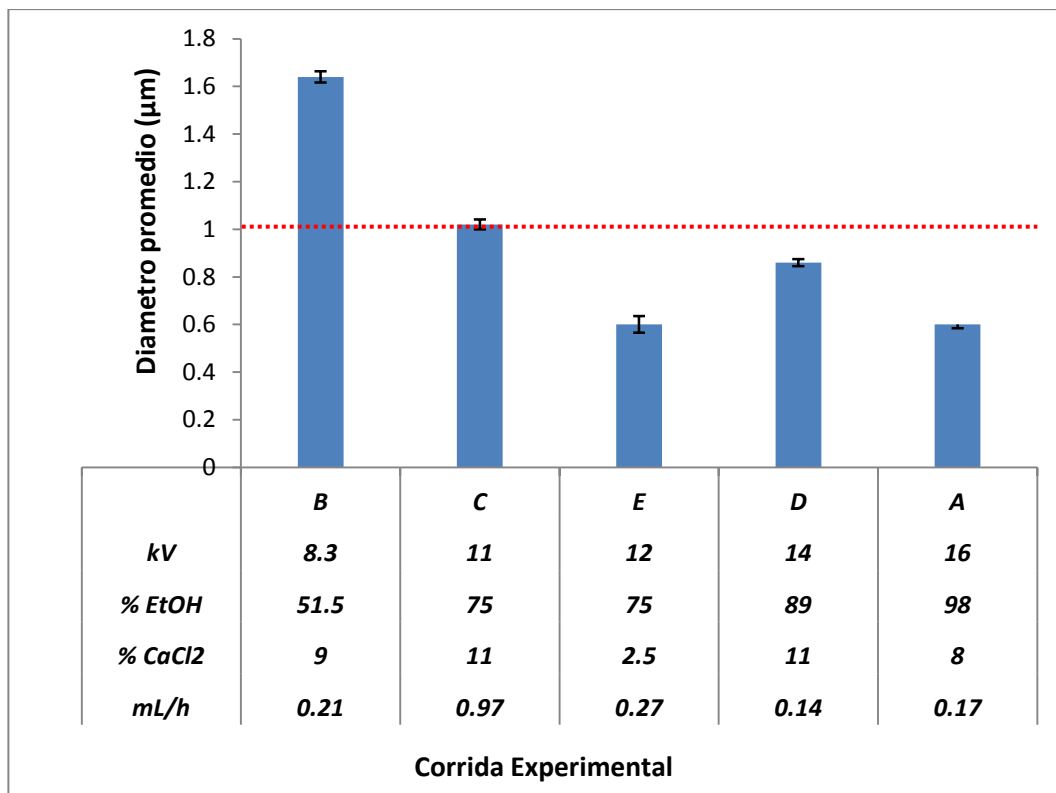
**Tabla 9.** Estadística descriptiva de las muestras analizadas por MEB y procesadas en ImageJ2X.

<b>Muestra</b>	<b>Media (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>Mediana (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Moda (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
<b>A</b>	0.60	0.015	0.46	-
<b>B</b>	1.64	0.054	1.13	1.81
<b>C</b>	1.02	0.024	0.94	-
<b>D</b>	0.86	0.035	0.56	0.32
<b>E</b>	0.60	0.021	0.41	0.28

En el gráfico 20, se observan los valores promedio para cada corrida experimental, con sus condiciones propias arrojadas por el análisis MSR. Los dos factores más significativos (voltaje y concentración de etanol) se encuentran en orden ascendente; en este orden se nota una tendencia del efecto de ambas condiciones, en una relación inversamente proporcional los valores más bajos probados arrojaron el tamaño de partícula más alto obtenido. Este comportamiento se puede explicar sobre el efecto que tiene un voltaje bajo en la formación de un cono de Taylor menos agudo, dando como resultado

formación de microgotas más grandes. De igual manera, el efecto de la polaridad del solvente para mantener separadas a las partículas en la solución de entrecruzamiento, evitando su posible fusión, se ve disminuido cuando la concentración de etanol es menor.

Se comprueban también los resultados obtenidos en el análisis por MSR, donde se muestra el punto de silla, es decir la zona óptima de trabajo, para los valores medios de cada factor, mismos valores que presenta el ensayo C.



**Figura 20.** Diámetros promedio de las partículas post-optimización para cada combinación de parámetros post-optimización. Las barras de error indican error estándar de la media. La línea punteada indica el tamaño óptimo (1 µm).

Otro factor a tener en cuenta es que las imágenes de microscopía se obtuvieron con una mejor resolución, lo que permite observar la morfología con más detalle. Se puede inferir que la alta variación en tamaño de partícula encontrada en los primeros análisis por DLS, pudo ser ocasionada en gran parte por interferencia causada por las altas concentraciones de cloruro de calcio presente en las muestras. Lo anterior, sin dejar fuera la variación provocada por las propias condiciones de fabricación. El  $\text{CaCl}_2$  en exceso pudo generar interferencias por nucleación alrededor de las partículas.

En base a los resultados, la optimización del proceso de fabricación se ha completado con éxito en las condiciones óptimas del ensayo C, con un promedio de  $1.02 \pm 0.024 \mu\text{m}$  en tamaño de partícula. Se estableció un protocolo para la limpieza de las microesferas intercambiando el solvente del medio etanólico a agua y disminuyendo la concentración de cloruro de calcio presente en la solución entrecruzante.

## **CAPITULO V**

### **CONCLUSIONES**

La gelificación conjunta de PMAD y AXF, permitió la formación rápida y sin agregación, de microesferas cargadas con insulina mediante electroaspersión coaxial. La optimización de los parámetros de fabricación de las microesferas con un tamaño promedio de 1  $\mu\text{m}$ , son de 11 Kv y 0.972 ml/h, con recepción en una solución entrecruzante de 75 % de etanol con 11% de  $\text{CaCl}_2$ . Los valores anteriores son producto de un análisis estadístico de superficie de respuesta, donde se obtuvo un modelo matemático con una capacidad predictiva del 70 %.

Las microesferas fabricadas bajo estas condiciones fueron simétricas, estables y sin agregación, con un promedio en tamaño de partícula de  $1.02 \pm 0.24 \mu\text{m}$ . Las microesferas presentaron un núcleo con insulina y arabinosidos y aparentemente una coraza de pectina. Para que esta coraza de pectina lograra la estabilización de las partículas formadas y se eliminara la agregación, fue necesario obtener una pectina con grado de esterificación menor al 10%. El método de hidrólisis alcalina implementado permitió la disminución del grado de esterificación de pectina hasta en un 86%. Se determinaron las concentraciones de PMAD, AXF y lacasa, en función de las características visco-elásticas ideales de sus geles, condicionadas por el sistema de electroaspersión coaxial.

## Perspectivas

Debido a su estructura, composición y tamaño, estas microesferas son prometedoras para futuras pruebas de degradación y liberación en condiciones similares al tracto gastrointestinal humano. Se recomienda realizar futuras evaluaciones en el control glicémico *in vivo* en modelos animales y establecer un protocolo para la conservación en seco de las microesferas. El método de electroaspersión coaxial utilizado en el presente trabajo, es un método semiautomatizado y escalable a nivel industrial; lo que permite fabricar este tipo de partículas con alta repetibilidad y en volúmenes superiores a la escala de laboratorio. Esta última característica, favorece la apropiación social de los resultados de este trabajo en el mediano plazo.

## REFERENCIAS

- Abang Zaidel, D. N., I. S. Chronakis, A. S. Meyer, D. N. Abang Zaidel, I. S. Chronakis y A. S. Meyer. (2012). Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: Kinetics and rheology. *Food Hydrocolloids*. 28(1): 130-140.
- ADA. (2014, April 7, 2014). "Insulin Delivery." American Diabetes Association. Retrieved 07/05/2014, from <http://www.diabetes.org/living-with-diabetes>.
- Aframian, D. J., T. Davidowitz y R. Benoliel. (2006). The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral diseases*. 12(4): 420-423.
- Agoda-Tandjawa, G., S. Durand, C. Gaillard, C. Garnier y J. L. Doublier. (2012). Rheological behaviour and microstructure of microfibrillated cellulose suspensions/low-methoxyl pectin mixed systems. Effect of calcium ions. *Carbohydrate Polymers*. 87(2): 1045-1057.
- Andersson, R., G. Fransson, M. Tietjen y P. Åman. (2009). Content and Molecular-Weight Distribution of Dietary Fiber Components in Whole-Grain Rye Flour and Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(5): 2004-2008.
- Anger, H. y G. Dongowski. (1988). Amidated pectins—characterization and enzymatic degradation. *Food Hydrocolloids*. 2(5): 371-379.
- Atchison, J. A., W. E. Grizzle y D. J. Pillion. (1989). Colonic absorption of insulin: an in vitro and in vivo evaluation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 248(2): 567-572.
- Baldwin, S. P. y W. Mark Saltzman. (1998). Materials for protein delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 33(1–2): 71-86.
- Bendayan, M., E. Ziv, D. Gingras, R. Ben-Sasson, H. Bar-On y M. Kidron. (1994). Biochemical and morpho-cytochemical evidence for the intestinal absorption of insulin in control and diabetic rats. Comparison between the effectiveness of duodenal and colon mucosa. *Diabetologia*. 37(2): 119-126



- Berlanga-Reyes, C. M., E. Carvajal-Millan, J. Lizardi-Mendoza, A. R. Islas-Rubio y A. Rascón-Chu. (2011). Enzymatic Cross-Linking of Alkali Extracted Arabinoxylans: Gel Rheological and Structural Characteristics. *International journal of molecular sciences*. 12(9): 5853-5861.
- Berlanga-Reyes, C. M., E. Carvajal-Millán, J. Lizardi-Mendoza, A. Rascón-Chu, J. Marquez-Escalante y A. L. Martínez-López. (2009). Maize Arabinoxylan Gels as Protein Delivery Matrices. *Molecules*. 14(4): 1475-1482.
- Björk, J., J. Nilsson, R. Hultcrantz y C. Johansson. (1993). Growth-Regulatory Effects of Sensory Neuropeptides, Epidermal Growth Factor, Insulin, and Somatostatin on the Non-Transformed Intestinal Epithelial Cell Line IEC-6 and the Colon Cancer Cell Line HT 29. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 28(10): 879-884.
- Braccini, I. y S. Pérez. (2001). Molecular Basis of Ca<sup>2+</sup>-Induced Gelation in Alginates and Pectins: The Egg-Box Model Revisited. *Biomacromolecules*. 2(4): 1089-1096.
- Bunzel, M., J. Ralph y H. Steinhart. (2005). Association of non-starch polysaccharides and ferulic acid in grain amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) dietary fiber. *Molecular Nutrition & Food Research*. 49(6): 551-559.
- Cao, L., J. Luo, K. Tu, L. Q. Wang y H. Jiang. (2014). Generation of nano-sized core-shell particles using a coaxial tri-capillary electrospray-template removal method. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 115(212-218).
- Carvajal-Millan, E., C. Berlanga-Reyes, A. Rascón-Chu, A. L. Martínez-López, J. A. Márquez-Escalante, A. C. Campa-Mada y K. G. Martínez-Robinson. (2012). In vitro Evaluation of Arabinoxylan Gels as an Oral Delivery System for Insulin. *MRS Online Proceedings Library*. 1487(null-null).
- Carvajal-Millan, E., S. Guilbert, J.-L. Dublier y V. Micard. (2006). Arabinoxylan/protein gels: Structural, rheological and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*. 20(1): 53-61.
- Carvajal-Millan, E., V. Landillon, M. H. Morel, X. Rouau, J. L. Dublier y V. Micard. (2005). Arabinoxylan gels: impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*. 6(1): 309-317.

- Carvajal-Millan, E., A. Rascón-Chu, J. A. Márquez-Escalante, V. Micard, N. P. d. León y A. Gardea. (2007). Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers*. 69(2): 280-285.
- Champion, J. A., Y. K. Katare y S. Mitragotri. (2007). Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 121(1-2): 3-9.
- Chen, M. C., K. Sonaje, K. J. Chen y H. W. Sung. (2011). A review of the prospects for polymeric nanoparticle platforms in oral insulin delivery. *Biomaterials*. 32(36): 9826-9838.
- Danilatos, G. D. 1988. Foundations of Environmental Scanning Electron Microscopy. En: W. H. Peter (eds.). *Advances in Electronics and Electron Physics*. Academic Press, 109-250 p.
- Das, D., S. Maiti, T. K. Maiti y S. S. Islam. (2013). A new arabinoxylan from green leaves of *Litsea glutinosa* (Lauraceae): Structural and biological studies. *Carbohydrate Polymers*. 92(2): 1243-1248.
- De Temmerman, M. L., J. Rejman, R. E. Vandebroucke, S. De Koker, C. Libert, J. Grooten, J. Demeester, B. Gander y S. C. De Smedt. (2012). Polyelectrolyte LbL microcapsules versus PLGA microparticles for immunization with a protein antigen. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 158(2): 233-239.
- ENSANUT. 2012. Encuesta Nacional de Salud. Mexico, Instituto Nacional de Salud Publica. I.
- Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bulletin*. 46(3): 183-196.
- Ford, C. W. (1989). A feruloylated arabinoxylan liberated from cell walls of *Digitaria decumbens* (pangola grass) by treatment with borohydride. *Carbohydrate research*. 190(1): 137-144.
- Fraeye, I., E. Doungla, T. Duvetter, P. Moldenaers, A. Van Loey y M. Hendrickx. (2009). Influence of intrinsic and extrinsic factors on rheology of pectin-calcium gels. *Food Hydrocolloids*. 23(8): 2069-2077.
- Ghayempour, S. y S. M. Mortazavi. (2013). Fabrication of micro-nanocapsules by a new electrospaying method using coaxial jets and examination of effective parameters on their production. *Journal of Electrostatics*. 71(4): 717-727.

- Gigli, J., C. Garnier y L. Piazza. (2009). Rheological behaviour of low-methoxyl pectin gels over an extended frequency window. *Food Hydrocolloids*. 23(5): 1406-1412.
- González, O., M. y A. Martínez, E. . (2001). Las insulinas. *Investigación en Salud*. 99(III): 62-65.
- Gordon Still, J. (2002). Development of oral insulin: progress and current status. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 18(S1): S29-S37.
- Gruber, P., M. A. Longer y J. R. Robinson. (1987). Some biological issues in oral, controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1(1): 1-18.
- Hansen, N. M. y D. Plackett. (2008). Sustainable films and coatings from hemicelluloses: a review. *Biomacromolecules*. 9(6): 1493-1505.
- Hepler, P. y B. S. Gunning. (1998). Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma*. 201(3-4): 121-157.
- Hernández-Espinoza, A. B., M. I. Piñón-Muñiz, A. Rascón-Chu, V. M. Santana-Rodríguez y E. Carvajal-Millan. (2012). Lycopene/Arabinoxylan Gels: Rheological and Controlled Release Characteristics. *Molecules*. 17(3): 2428-2436.
- Hong, S. H., J. H. Moon, J. M. Lim, S. H. Kim y S. M. Yang. (2005). Fabrication of spherical colloidal crystals using electrospray. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 21(23): 10416-10421.
- Hotchkiss, A. T., R. Rastall, G. Gibson, I. Eliaz, L. S. Liu y M. Fishman. 2009. New bioactive and biobased product applications of pectin. En: H. A. Schols, R. G. F. Visser y A. G. J. Voragen (eds.). *Pectins and Pectinases* Wageningen Academic Publishers, 305-312 p.
- Hunter, A. C., J. Elsom, P. P. Wibroe y S. M. Moghimi. (2012). Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: A pathophysiological perspective. *Maturitas*. 73(1): 5-18.
- IDF. (2013). "Types of Diabetes." International Diabetes Federation. Retrieved 03/04/2013, 2013, from <http://www.idf.org/>.
- Inc., B. C. (2014). "Delsa™ Nano C "Beckman Coulter Inc. . 2014.

- INEGI. (2012). "Estadísticas de Mortalidad, México. ."Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2014, from [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx).
- Izydorczyk, M. S. y C. G. Biliaderis. (1992). Effect of molecular size on physical properties of wheat arabinoxylan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40(4): 561-568.
- Izydorczyk, M. S. y C. G. Biliaderis. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*. 28(1): 33-48.
- Juan, Q., F. Víctor y M. Aldemar. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Tumbaga*. 1(5): 93-118.
- Jung, J., R. D. Arnold y L. Wicker. (2013). Pectin and charge modified pectin hydrogel beads as a colon-targeted drug delivery carrier. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. 104(116-121).
- Jung, J. y L. Wicker. (2012). Laccase mediated conjugation of heat treated  $\beta$ -lactoglobulin and sugar beet pectin. *Carbohydrate Polymers*. 89(4): 1244-1249.
- Kar, F. y N. Arslan. (1999a). Characterization of orange peel pectin and effect of sugars, l-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solutions. *Carbohydrate Polymers*. 40(4): 285-291.
- Kar, F. y N. Arslan. (1999b). Effect of temperature and concentration on viscosity of orange peel pectin solutions and intrinsic viscosity–molecular weight relationship. *Carbohydrate Polymers*. 40(4): 277-284.
- Katsuma, M., S. Watanabe, H. Kawai, S. Takemura y K. Sako. (2006). Effects of absorption promoters on insulin absorption through colon-targeted delivery. *International journal of pharmaceutics*. 307(2): 156-162.
- Kim, B. S., J. M. Oh, H. Hyun, K. S. Kim, S. H. Lee, Y. H. Kim, K. Park, H. B. Lee y M. S. Kim. (2009). Insulin-Loaded Microcapsules for In Vivo Delivery. *Molecular Pharmaceutics*. 6(2): 353-365.
- Kudanga, T., G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz y S. Burton. (2011). Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and microbial technology*. 48(3): 195-208.

- Kuuva, T., R. Lantto, T. Reinikainen, J. Buchert y K. Autio. (2003). Rheological properties of laccase-induced sugar beet pectin gels. *Food Hydrocolloids*. 17(5): 679-684.
- Lacoeuille, F., E. Garcion, J. P. Benoit y A. Lamprecht. (2007). Lipid nanocapsules for intracellular drug delivery of anticancer drugs. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 7(12): 4612-4617.
- Lamprecht, A., U. Schafer y C. M. Lehr. (2001). Size-dependent bioadhesion of micro- and nanoparticulate carriers to the inflamed colonic mucosa. *Pharmaceutical research*. 18(6): 788-793.
- Laroui, H., D. S. Wilson, G. Dalmaso, K. Salaita, N. Murthy, S. V. Sitaraman y D. Merlin. (2011). Nanomedicine in GI. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 300(3): G371-383.
- Lima, M. S., E. P. Paiva, S. A. C. Andrade y J. A. Paixão. (2010). Fruit pectins – A suitable tool for screening gelling properties using infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*. 24(1): 1-7.
- Liu, L., M. Fishman y K. Hicks. (2007). Pectin in controlled drug delivery – a review. *Cellulose*. 14(1): 15-24.
- Liu, L., M. L. Fishman, J. Kost y K. B. Hicks. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*. 24(19): 3333-3343.
- Löfgren, C. y A.-M. Hermansson. (2007). Synergistic rheological behaviour of mixed HM/LM pectin gels. *Food Hydrocolloids*. 21(3): 480-486.
- Lofgren, C., P. Walkenstrom y A. M. Hermansson. (2002). Microstructure and rheological behavior of pure and mixed pectin gels. *Biomacromolecules*. 3(6): 1144-1153.
- Manderson, K., M. Pinart, K. M. Tuohy, W. E. Grace, A. T. Hotchkiss, W. Widmer, M. P. Yadhav, G. R. Gibson y R. A. Rastall. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and environmental microbiology*. 71(12): 8383-8389.
- Maroni, A., L. Zema, M. D. Del Curto, A. Foppoli y A. Gazzaniga. (2012). Oral colon delivery of insulin with the aid of functional adjuvants. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 64(6): 540-556.

- Matalanis, A., O. G. Jones y D. J. McClements. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*. 25(8): 1865-1880.
- Mazumder, K. y W. S. York. (2010). Structural analysis of arabinoxylans isolated from ball-milled switchgrass biomass. *Carbohydrate research*. 345(15): 2183-2193.
- Mellinger-Silva, C., F. F. Simas-Tosin, D. N. Schiavini, M. F. Werner, C. H. Baggio, I. T. Pereira, L. M. da Silva, P. A. J. Gorin y M. Iacomini. (2011). Isolation of a gastroprotective arabinoxylan from sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 102(22): 10524-10528.
- Minko, T. (2004). Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56(4): 491-509.
- Morales-Ortega, A., E. Carvajal-Millan, F. Brown-Bojorquez, A. Rascon-Chu, P. Torres-Chavez, Y. L. Lopez-Franco, J. Lizardi-Mendoza, A. L. Martinez-Lopez y A. C. Campa-Mada. (2014). Entrapment of probiotics in water extractable arabinoxylan gels: rheological and microstructural characterization. *Molecules*. 19(3): 3628-3637.
- Morishita, M., T. Goto, N. A. Peppas, J. I. Joseph, M. C. Torjman, C. Munsick, K. Nakamura, T. Yamagata, K. Takayama y A. M. Lowman. (2004). Mucosal insulin delivery systems based on complexation polymer hydrogels: effect of particle size on insulin enteral absorption. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 97(1): 115-124.
- Morris, G. A., S. M. Kök, S. E. Harding y G. G. Adams. (2010). Polysaccharide drug delivery systems based on pectin and chitosan. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 27(1): 257-284.
- Munarin, F., M. C. Tanzi y P. Petrini. (2013). Corrigendum to 'Advances in biomedical applications of pectin gels' [*International Journal of Biological Macromolecules* 51 (2012) 681–689]. *International journal of biological macromolecules*. 55(0): 307.
- Naran, R., G. Chen y N. C. Carpita. (2008). Novel Rhamnogalacturonan I and Arabinoxylan Polysaccharides of Flax Seed Mucilage. *Plant Physiology*. 148(1): 132-141.
- Niño-Medina, G., E. Carvajal-Millán, J. Lizardi, A. Rascon-Chu, J. A. Marquez-Escalante, A. Gardea, A. L. Martinez-Lopez y V. Guerrero. (2009). Maize processing waste water arabinoxylans: gelling capability and cross-linking content. *Food Chemistry*. 115(4): 1286-1290.

- Niño-Medina, G., E. Carvajal-Millán, A. Rascon-Chu, J. Marquez-Escalante, V. Guerrero y E. Salas-Muñoz. (2010). Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications. *Phytochem Rev.* 9(1): 111-120.
- Ovodov, Y. S. (2009). Current views on pectin substances. *Russ J Bioorg Chem.* 35(3): 269-284.
- Palin, R. y A. Geitmann. (2012). The role of pectin in plant morphogenesis. *Bio Systems.* 109(3): 397-402.
- Parra Huertas, R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín.* 63(2): 5669-5684.
- Pillai, O. y R. Panchagnula. (2001). Insulin therapies - past, present and future. *Drug discovery today.* 6(20): 1056-1061.
- Pillion, D. J., V. Ganapathy y F. H. Leibach. (1985). Identification of insulin receptors on the mucosal surface of colon epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry.* 260(9): 5244-5247.
- Qiu, N.-x., Y.-x. Tian, S.-t. Qiao y H. Deng. (2009). Apple Pectin Behavior Separated by Ultrafiltration. *Agricultural Sciences in China.* 8(10): 1193-1202.
- Rascón-Chu, A., A. L. Martínez-López, C. Berlanga-Reyes, E. Carvajal-Millan, A. C. Campa-Mada, A. A. Gardea y A. Orozco-Avitia. (2012). Arabinoxylans Gels as Lycopene Carriers: in vitro Degradation by Colonic Bacteria. *MRS Online Proceedings Library.* 1487(null-null).
- Reimer, L. y K. Helmut. 2008. Elements of a Transmission Electron Microscope. En: (eds.). *Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation.* Springer New York, 75-138 p.
- Rubinstein, A., B. Tirosh, M. Baluom, T. Nassar, A. David, R. Radai, I. Gliko-Kabir y M. Friedman. (1997). The rationale for peptide drug delivery to the colon and the potential of polymeric carriers as effective tools. *Journal of Controlled Release.* 46(1-2): 59-73.
- Sandra, K. 2009. Polysaccharides in Oral Drug Delivery ? Recent Applications and Future Perspectives. En: (eds.). *Polysaccharide Materials: Performance by Design.* American Chemical Society, 13-30 p.

- Sansone, F., T. Mencherini, P. Picerno, M. d'Amore, R. P. Aquino y M. R. Lauro. (2011). Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. *Journal of Food Engineering*. 105(3): 468-476.
- Sarmiento, B., A. Ribeiro, F. Veiga, D. Ferreira y R. Neufeld. (2007). Oral bioavailability of insulin contained in polysaccharide nanoparticles. *Biomacromolecules*. 8(10): 3054-3060.
- Şaşmaz, S., S. Gedikli, P. Aytar, G. Güngörmedi, A. Çabuk, E. Hür, A. Ünal y N. Kolankaya. (2011). Decolorization Potential of Some Reactive Dyes with Crude Laccase and Laccase-Mediated System. *Appl Biochem Biotechnol*. 163(3): 346-361.
- Segarra, E. 2006. *Fisiología de los aparatos y sistemas*. Universidad de Cuenca. 458 pp.
- Shukla, R. K. y A. Tiwari. (2012). Carbohydrate polymers: Applications and recent advances in delivering drugs to the colon. *Carbohydrate Polymers*. 88(2): 399-416.
- Skendi, A., C. G. Biliaderis, M. S. Izydorczyk, M. Zervou y P. Zoumpoulakis. (2011). Structural variation and rheological properties of water-extractable arabinoxylans from six Greek wheat cultivars. *Food Chemistry*. 126(2): 526-536.
- Songsurang, K., N. Praphairaksit, K. Siraleartmukul y N. Muangsin. (2011). Electro spray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin. *Arch. Pharm. Res*. 34(4): 583-592.
- Srivastava, P. y R. Malviya. (2011). Sources of pectin, extraction and its applications in pharmaceutical industry – An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 2(1): 10-18.
- Sternemalm, E., A. Höjje y P. Gatenholm. (2008). Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films. *Carbohydrate research*. 343(4): 753-757.
- Sushmitha, S., K. Joydip y C. K. Subhas. (2010). Biopolymeric nanoparticles. *Science and Technology of Advanced Materials*. 11(1): 014104.
- Tan, L., S. Eberhard, S. Pattathil, C. Warder, J. Glushka, C. Yuan, Z. Hao, X. Zhu, U. Avci, J. S. Miller, D. Baldwin, C. Pham, R. Orlando, A. Darvill, M. G. Hahn, M. J. Kieliszewski y D. Mohnen. (2013). An Arabidopsis cell wall



proteoglycan consists of pectin and arabinoxylan covalently linked to an arabinogalactan protein. *The Plant cell*. 25(1): 270-287.

- Thirawong, N., J. Thongborisute, H. Takeuchi y P. Sriamornsak. (2008). Improved intestinal absorption of calcitonin by mucoadhesive delivery of novel pectin-liposome nanocomplexes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 125(3): 236-245.
- Urias-Orona, V., A. Rascon-Chu, J. Lizardi-Mendoza, E. Carvajal-Millan, A. A. Gardea y B. Ramirez-Wong. (2010). A novel pectin material: extraction, characterization and gelling properties. *International journal of molecular sciences*. 11(10): 3686-3695.
- Vaclavik, V. A. y E. W. Christian. 2007. *Essentials of Food Science*. Springer. pp.
- Voragen, A. J., G.-J. Coenen, R. Verhoef y H. Schols. (2009). Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct Chem*. 20(2): 263-275.
- W.H.O. (2012, 2013/11). "Diabetes." World Health Organization. Retrieved 05/01, 2013, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/en/>.
- Wang, M.-J., Y.-L. Xie, Q.-D. Zheng y S.-J. Yao. (2009). A Novel, Potential Microflora-Activated Carrier for a Colon-Specific Drug Delivery System and Its Characteristics. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 48(11): 5276-5284.
- Wicker, L., Y. Kim, M.-J. Kim, B. Thirkield, Z. Lin y J. Jung. Pectin as a bioactive polysaccharide – Extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids*. 0):
- Wicker, L., Y. Kim, M.-J. Kim, B. Thirkield, Z. Lin y J. Jung. (2014). Pectin as a bioactive polysaccharide – Extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids*. In Press, Accepted Manuscript, Available online 24 August 2014(
- Wu, Y., J. A. MacKay, J. R. McDaniel, A. Chilkoti y R. L. Clark. (2009). Fabrication of elastin-like polypeptide nanoparticles for drug delivery by electrospraying. *Biomacromolecules*. 10(1): 19-24.
- Xia, C. y W.-C. Shen. (2001). Tyrphostin-8 Enhances Transferrin Receptor-Mediated Transcytosis in Caco-2 Cells and Increases Hypoglycemic Effect of Orally Administered Insulin-Transferrin Conjugate in Diabetic Rats. *Pharmaceutical research*. 18(2): 191-195.

- Yoo, S.-H., M. L. Fishman, A. T. Hotchkiss Jr y H. G. Lee. (2006). Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids*. 20(1): 62-67.
- Yu, C. Y., H. Cao, X. C. Zhang, F. Z. Zhou, S. X. Cheng, X. Z. Zhang y R. X. Zhuo. (2009). Hybrid nanospheres and vesicles based on pectin as drug carriers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 25(19): 11720-11726.
- Zhang, J. y Z.-W. Wang. (2011a). Arabinoxylan from *Canna edulis* Ker by-product and its enzymatic activities. *Carbohydrate Polymers*. 84(1): 656-661.
- Zhang, P., W. Jennifer L., B. Arun K., B. Kristin M., P. John A. y W. Roy L. (2004). Effects of Arabinoxylans on Activation of Murine Macrophages and Growth Performance of Broiler Chicks. *CCHEM*. 81(4): 511-514.
- Zhang, Y., W. Wei, P. Lv, L. Wang y G. Ma. (2011b). Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 77(1): 11-19.