



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**ENCAPSULACIÓN Y CINÉTICA DE LIBERACIÓN
DE METRONIDAZOL EN GELES DE ARABINOXILANOS
DE PERICARPIO DE TRIGO**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

OLYMPIA JUDITH DOMINGUEZ MURUA

Hermosillo, Sonora

Mayo del 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por abrirme sus puertas para llevar a cabo mis estudios.

Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia así como también a todos los maestros que me apoyaron a lo largo de la carrera

A mi directora de tesis Dra. Elizabeth Carvajal Millán y todo su equipo por brindarme la oportunidad de ingresar al CIAD y realizar un proyecto de tesis a su cargo. Gracias Dra. Por todas sus enseñanzas y apoyo.

Al comité de tesis: Dr. Martin Antonio Encinas Romero, Dr. Paul Zavala Rivera, Dr. Agustin Gomez Alvarez y Dr. Agustin Rascon Chu por su importante asesoría en la culminación de este trabajo.

Le doy gracias a Dios por permitirme estar aquí y bendecirme con su amor y el apoyo de mi familia y seres queridos

A mis padres, por todo su apoyo y amor incondicional que voy a agradecerles toda la vida.

A mi esposo Edgar y mi hija Maya Roció, por ser la fuerza que me inspira a seguir adelante.

A las personas que conocí a lo largo de este proyecto y me brindaron su apoyo, Alma Campa y Ana Luisa Martínez.

LISTA DE TABLAS

Tablas	Página
I. Parámetros estructurales de geles de AX inducidos por la enzima lacasa.....	17
II. Solubilidad del metronidazol	18
III. Parámetros de liberación de metronidazol a partir del gel de arabinosilanos al 5% (p/v)	31

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Estructura química de una fracción de arabinosilanos ferulados (Adaptado de Niño-Medina et al., 2010).....	11
2. Representación esquemática de la gelificación de los arabinosilanos ferulados (Adaptado de Morales-Ortega et al., 2013).....	17
3. Curva de calibración para la cuantificación de metronidazol	22
4. Cambios en la elasticidad (G') y la viscosidad (G'') de una solución de AX durante la gelificación inducida por lacasa a 25°C, 0.25 Hz y 5% de deformación	25
5. Cambios en la elasticidad (G') y la viscosidad (G'') de una solución de AX/MTZ durante la gelificación inducida por lacasa a 25°C, 0.25 Hz y 5% de deformación	26
6. Espectro de frecuencia (G' , G'') de gel AX después de 1.5 horas de gelificación por lacasa a 25°C. Medición a 25°C y 5% de deformación	26
7. Espectro de frecuencia (G' , G'') de gel AX/MTZ después de 1.5 horas de gelificación por lacasa a 25°C. Medición a 25°C y 5% de deformación.....	27
8. Microestructura superficial de (a) gel de AX y (b) gel AX/MTZ obtenida por microscopía electrónica de barrido. Magnificación 50X.....	29
Figura 9. Cinética de liberación de metronidazol a partir de geles de AX al 5% (p/v)	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AX	Arabinoxilanos
MTZ	Metronidazol
g	Gramos
pH	Potencial de hidrógeno
nm	Nanómetros
mm	Milímetros
%	Porcentaje
kDa	Kilo Dalton
mL	Mililitros
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minutos
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
mg	Miligramos
L	Litros
kg	Kilogramos
A/X	Arabinosa/Xilosa
p	Peso
M	Molar
p/v	Peso sobre volumen
cm	Centímetros
Mo	Peso de MTZ
Mt	Peso acumulativo

INDICE DE CONTENIDO

Pagina

AGRADECIMIENTOS.....	1
LISTA DE TABLAS	2
LISTA DE ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo general	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS 10	
3.1 Arabinosilanos (AX).....	10
3.1.1 Estructura química general de los AX ferulados	10
3.2 Extracción	12
3.3 Características fisicoquímicas de los AX ferulados	13
3.3.1 Peso molecular	13
3.3.2 Viscosidad intrínseca.....	13
3.3.3 Solubilidad	14
3.4 Capacidad Gelificante	14
3.4.1 Mecanismo de gelificación	14
3.5 Geles de Arabinosilanos.....	15
3.6 Metronidazol	18
3.7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.7.1 Materia Prima	20
3.7.2 Preparación de los Geles de AX con MTZ	20
3.7.3 Contenido de ácido ferúlico, sus dímeros y trímeros	20
3.7.4 Reología dinámica de baja deformación	21
3.7.5 Microscopía de barrido electrónico	21
3.7.6 Cinética de liberación de MTZ a partir del gel de AX	21
3.7.8 Cuantificación de MTZ.....	22
3.7.9 Coeficiente de difusión aparente de MTZ	23
3.7.10 Análisis estadístico	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES 24	
4.1 Formación de geles de AX y AX/MTZ	24

4.2 Contenido de uniones covalentes en el gel de AX y gel de AX/MTZ.....	27
4.3 Microscopía Electrónica de Barrido	27
4.4 Cinética de liberación de MTZ	30
5. CONCLUSIONES	32
6. RECOMENDACIONES	32
7. BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

Los arabinoxilanos (AX) son polisacáridos que constituyen una parte estructural de la pared celular de los cereales. Estos polisacáridos están formados por una cadena lineal de xilosas con ramificaciones de arabinosa a las cuales puede estar esterificado el ácido ferúlico. La presencia de ácido ferúlico confiere a los AX la capacidad de formar geles covalentes mediante la oxidación por enzimas como la lacasa. Esta oxidación resulta en la formación de dímeros de ácido ferúlico (dl-AF) que permiten unir las cadenas de polisacárido entre sí formando un gel. Los geles de AX son neutros, sin color, ni olor y debido a su naturaleza covalente, no son afectados por cambios de temperatura, fuerza iónica o pH; lo cual les confiere un gran potencial de aplicación como agentes de encapsulación y liberación controlada. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de los geles de AX de pericarpio de trigo para encapsular y liberar de manera controlada el metronidazol (MTZ) como molécula modelo. Los AX formaron geles covalentes al 5% (p/v) con una elasticidad de 175 Pa, la cual disminuyó a 164 Pa en presencia de MTZ. El contenido de di-AF en los geles de AX con y sin MTZ fue de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$. El gel de AX presenta una microestructura con porosidades pequeñas y continuas mientras que el gel AX/MTZ muestra un material menos estructurado y con porosidades de mayor tamaño. El coeficiente de difusión aparente (D_m) del MTZ liberado del gel de AX fue de $3.95 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$. En un tiempo de 5 horas se liberó solamente el 18% del MTZ encapsulado lo cual permitiría la entrega de la mayor parte del fármaco cargado en el gel una vez que la red polimérica sea fermentada por la microbiota del colon. Los resultados indican que los geles de AX son capaces de atrapar MTZ formando matrices que podrían ser utilizados para la liberación controlada de esta molécula.

1. INTRODUCCIÓN

Los arabinoxilanos (AX) son polisacáridos neutros no amiláceos de los granos de cereales. Están constituidos por un esqueleto lineal de unidades β -(1-4)-D-xilanopiranosas a las cuales se están unidos sustituyentes de α -L-arabinofuranosas en O-2 y/o O-3 (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Algunos de los residuos de arabinosas tienen esterificados residuos de ácido ferúlico en (O)-5 (ácido 3-metoxi, 4 hidroxicinámico) (Smith y Hartley, 1983). Dependiendo de su peso molecular, los AX pueden ser solubles (PM<1000 kDa) o insolubles (PM>1000 kDa) en agua (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Los AX solubles en agua están presentes en el endospermo de los cereales mientras que los AX insolubles en agua se encuentran principalmente en el pericarpio del grano. Debido a su alto peso molecular, la extracción acuosa de los AX insolubles en agua implica una hidrólisis parcial de la molécula. La cantidad de AX insolubles en agua presentes en el pericarpio de los cereales es alta (30-40% p/p), comparada con la cantidad de AX solubles en agua contenida en el endospermo (1-3% p/p). La industria productora de harina de trigo, tales como Molino La Fama y Molino El Globo, obtiene pericarpio de trigo (15,750 ton por empresa) como subproducto. (Morales-Ortega, A., Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Gardea-Béjar, A., Torres-Chávez P., López-Franco, Y., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J. (2013)). Esta fuente de AX nos permite considerarlos como un material alternativo y de bajo costo para ser utilizado como material gelificante. (Carvajal-Millan E, Guigliarelli B, Belle V, Rouau X, Micard V. (2005a); (Carvajal-Millan E, Rascón-Chu A, Márquez Escalante J, Micard V, Ponce de León N, Gardea A. (2007)). Los AX pueden formar geles bajo la acción oxidante de tipo enzimático (lacasa, peroxidasa/H₂O₂) sobre el ácido ferúlico, lo cual conduce a la formación de radicales libres. Estos radicales libres son posteriormente acoplados resultando en la formación de dímeros de ácido ferúlico (di-AF), los cuales unen las cadenas de polisacárido formando un gel tridimensional acuoso (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Figueroa-Espinoza y Rouau, 1998). Hasta el momento han sido identificados cinco formas isoméricas de di-AF en geles de AX (5-5', 8-5' benzo, 8-O-4', 8-5' y 8-8'). Las formas 8-5' y 8-O-4' son generalmente más

abundantes en geles de AX de trigo (Figueroa-Espinoza y Rouau, 1998; Vansteenkiste et al., 2004, Carvajal-Millan et al., 2005a-b, 2006). Sin embargo, en geles de arabinosilanos de maíz el di-AF 5-5' ha sido reportado ser el mayoritario (Carvajal-Millan et al., 2007; Niño-Medina et al., 2009; Berlanga-Reyes et al., 2009). Hasta el momento ha sido reportada la formación de un sólo trímero de ácido ferúlico (tri-AF) (ácido 4-O-8', 5'-5''-dehidrotriferulico) en geles de arabinosilanos de trigo y de maíz (Carvajal-Millán et al., 2005a, 2007) inducidos por una lacasa. Además de la participación de las estructuras di-AF y el tri-AF anteriormente mencionados, algunos autores señalan la contribución de interacciones físicas entre las regiones lineales de las cadenas de AX en el establecimiento de la estructura tridimensional del gel (Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005b). Los geles de AX presentan características interesantes: son neutros, sin color ni olor y, debido a la presencia de enlaces covalentes, son poco afectados por cambios de temperatura, fuerza iónica o pH (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Niño-Medina et al., 2010; Morales-Burgos et al., 2017). Estas características y la estructura meso y macro porosa de los geles de AX con un tamaño de poro entre 40 y 400 nm confiere a los AX un alto potencial de aplicación como sistemas de liberación controlada de fármacos dirigidos al colon (Carvajal-Millan et al., 2005b, Berlanga-Reyes et al., 2014; Martinez-Lopez et al., 2016). El metronidazol (MTZ) es un agente sintético antibacteriano y antiparasitario que se encuentra clasificado dentro de la clase de nitroimidazoles (Bendesky y Menéndez, 2012). El MTZ puede ser administrado por vía oral, intravenosa, tópica, vaginal y rectal, aunque la más empleada clínicamente es la oral. Este fármaco es ampliamente utilizado para el tratamiento vía oral de la amibiasis intestinal, el tratamiento para este tipo de padecimiento por vía oral es en dosis de 750 mg tres veces al día durante diez días en adultos y 35 a 50 mg/kg de peso al día tres veces al día durante cinco a diez días en niños (Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM, eds. Nelson 1992). El MTZ presenta alta permeabilidad en el sistema gastrointestinal superior lo cual compromete la entrega de dosis adecuadas al sitio de la infección que es el colon. Por lo anterior, es de gran interés desarrollar alternativas para el suministro de MTZ por vía oral siendo los encapsulados poliméricos una opción con gran potencial para la entrega de este fármaco en el intestino grueso, especialmente en la región del colon.

En el presente trabajo de investigación se evaluó la capacidad de los geles de AX de pericarpio de trigo para encapsular y liberar de manera controlada el MTZ como antiparasitario modelo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de los geles de arabinosilanos de pericarpio de trigo para encapsular y liberar de manera controlada el metronidazol como molécula modelo.

2.2 Objetivos específicos

1. Encapsular metronidazol en un gel de arabinosilanos de pericarpio de trigo y determinar las características reológicas y microestructurales del gel formado.
2. Determinar la cinética de liberación del metronidazol a partir de los geles de arabinosilanos bajo condiciones que simulan el sistema gastrointestinal humano superior.

3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

3.1 Arabinosilanos (AX)

3.1.1 Estructura química general de los AX ferulados

Los AX son polisacáridos formados por una cadena lineal de xilosas unidas por enlaces glicosídicos β -(1 \rightarrow 4), a la cual se unen residuos de arabinosas mediante enlaces glicosídicos α -(1 \rightarrow 3) o α -(1 \rightarrow 2), o ambos. La xilosa puede presentar dos grados de sustitución, de acuerdo con el número de residuos de arabinosa (monosustituido o disustituido). Además de las unidades de arabinosa es común encontrar otros

sustituyentes minoritarios como son el ácido glucurónico y la galactosa (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Los AX ferulados tienen la particularidad de presentar ácido ferúlico en su estructura, unido en la posición O-5 de arabinosa por medio de un enlace éster (Ishii, 1997) (Figura 1). El término “grado de sustitución” utilizado en la descripción de los AX, se refiere al número de unidades de arabinosa unido a la cadena principal de xilosas y también se describe como la relación arabinosa-xilosa (A/X). Tanto el grado de sustitución como la distribución de las cadenas laterales son factores importantes en las características fisicoquímicas de los AX (Grootaert et al., 2007). En función de su solubilidad, los AX se clasifican en extraíbles en agua (WEAX, water extractable arabinoxylan) y no extraíbles en agua (WUAX, water unextractable arabinoxylan). Los WEAX son extraíbles a temperatura ambiente mientras que los WUAX requieren de un tratamiento alcalino para su extracción. Además de su solubilidad, las principales diferencias entre los WEAX y los WUAX son que estos últimos son de un peso molecular más alto y poseen mayor diversidad en las cadenas laterales, ya que además de arabinosa contienen ácido glucurónico, galactosa y grupos acetilo (Saulnier et al., 2007).

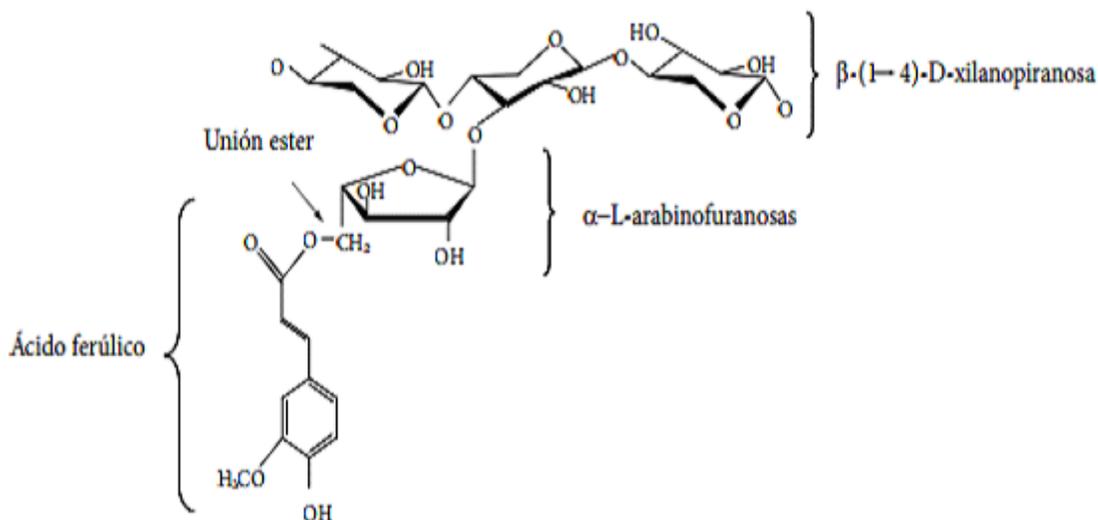


Figura 1. Estructura química de una fracción de arabinoxilanos ferulados (Adaptado de Niño-Medina et al., 2010).

3.2 Extracción

En los cereales, los WEAX se encuentran principalmente en el endospermo y los WUAX se ubican tanto en la capa aleurona como en el pericarpio. La cantidad de AX en un tejido vegetal puede variar dependiendo del género, así como por los factores ambientales y los estados de desarrollo (estado de madurez). En general, el contenido de WEAX es menor (0.5 a 3.0 %, p/p) en el endospermo de los cereales (trigo, centeno, cebada) que el de WUAX (20 a 30 %, p/p) en el pericarpio de los mismos (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). La mayoría de los estudios sobre los AX de cereales han sido desarrollados por grupos de investigación europeos que han utilizado como fuente principal a variedades de trigo, cebada y centeno (Figuroa-Espinoza y Rouau, 1998; Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005a,b). Otras investigaciones se han enfocado a los

subproductos que se generan por el procesamiento de cereales (Carvajal-Millan et al., 2007; Niño-Medina et al., 2009, 2010).

La obtención de AX se lleva a cabo por extracción acuosa o extracción alcalina, ya sea usando el grano del cereal completo o tejidos específicos del mismo. La extracción acuosa es utilizada para obtener los WEAX principalmente a partir de harina de trigo, con un rendimiento de extracción entre 0.5 y 6 % (p WEAX/ p harina de trigo). En la pared celular de pericarpio este polisacárido forma entrecruzamientos covalentes y físicos con otros constituyentes de la pared celular, lo que da como resultado una estructura insoluble en agua. En este caso se utiliza la extracción alcalina (NaOH 0.5 M, Ca(OH)₂ 1.0 M), con la cual los WUAX son separados de otros componentes de la pared celular para luego ser hidrolizados y transformados en cadenas más cortas y lograr su solubilidad en agua. Después de la extracción, los procedimientos de purificación normalmente incluyen el uso de proteasas y amilasas para la eliminación de proteína y almidón, respectivamente (Autio, 2006; Izydorczyk y Biliaderis, 2007).

3.3 Características fisicoquímicas de los AX ferulados

3.3.1 Peso molecular

Una de las variables más importantes para caracterizar una macromolécula es su peso molecular. El peso molecular de los AX depende de su origen y del método utilizado para su determinación. Por ejemplo, en el caso de WEAX de trigo los primeros estudios mediante técnicas de sedimentación por centrifugación reportaron valores de peso molecular muy bajos (65 kDa), mientras que con cromatografía de filtración en gel se encontraron pesos moleculares muy elevados (≥ 800 kDa) (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). Dervilly et al. (2000) reportaron que el peso molecular promedio de los WEAX de trigo se encuentra entre 200 y 300 kDa. Para WUAX de pericarpio de maíz, Lapierre et al. (2001) encontraron una variación de pesos moleculares de 124 hasta 270 kDa con distintos métodos de extracción cereal.

3.3.2 Viscosidad intrínseca

La viscosidad intrínseca ($[\eta]$) es un indicador del volumen hidrodinámico ocupado por un polímero que depende del peso molecular y de la conformación del polímero en el solvente. Para los WEAX de trigo la viscosidad intrínseca se encuentra entre 200 y 600 mL/g, con un promedio de 400 mL/g (Izydorczyk et al., 1991; Rattan et al., 1994). Carvajal Millan et al. (2007) reportaron una viscosidad intrínseca de 208 mL/g para WUAX obtenidos de pericarpio de maíz. La menor viscosidad intrínseca de los WUAX se debe a que para poder ser extraídos en agua, deben ser previamente hidrolizados para reducir el tamaño de la molécula. El valor de $[\eta]$ define el potencial de aplicación de los WEAX o los WUAX. Un valor alto de $[\eta]$ favorece la capacidad gelificante del polisacárido, mientras que un valor bajo mejora sus propiedades probióticas.

3.3.3 Solubilidad

La solubilidad de los AX depende en gran medida del grado de sustitución que presenta la xilosa con unidades de arabinosa. El contenido de sustituyentes de arabinosa, así como su distribución a lo largo de la cadena de xilosa, afecta el potencial de las cadenas de AX para interactuar entre sí o con otros polisacáridos. Para determinar el efecto de la sustitución de arabinosas sobre la solubilidad de los AX, Andrewartha et al. (1979) prepararon una serie de AX solubles en agua purificados de harina de trigo, en los que removieron parcialmente uniones laterales de arabinosa mediante el uso de α -L-arabinofuranosidasa; estos autores encontraron que conforme disminuye la proporción de A/X ocurre una disminución significativa de la solubilidad de los AX, y como valor crítico reportaron una proporción A/X de 0.43 a partir de la cual la solubilidad disminuye en forma abrupta. Este comportamiento se debe a que los residuos de arabinosa favorecen la interacción del polisacárido con el agua. Una vez removidas las sustituciones de arabinosa, las cadenas de xilosas pueden formar interacciones estables entre las cadenas, que confieren una conformación muy rígida a los AX y producen agregados insolubles. Para los cereales (principalmente trigo, centeno, cebada, arroz, maíz) el valor A/X es generalmente más alto en los WUAX (0.6 a 0.8) que en los WEAX (0.5 a 0.7) (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). Algunas investigaciones señalan un mayor valor de A/X en cereales cultivados bajo condiciones de estrés hídrico.

3.4 Capacidad Gelificante

3.4.1 Mecanismo de gelificación

Las soluciones acuosas de AX ferulados tienen la característica de formar geles covalentes en presencia de agentes generadores de radicales libres. Estos agentes pueden ser enzimáticos vía lacasa/O₂ o peroxidasa/H₂O₂ (Figuroa-Espinoza y Rouau, 1998) o químicos (persulfato de amonio y cloruro férrico (Niño-Medina et al., 2010a)). Los enlaces covalentes que unen las cadenas de AX a través del ácido ferúlico

son los responsables de esta característica especial en el polisacárido. Las enzimas comúnmente utilizadas para la formación de geles de AX son lacasa/ O₂ y peroxidasa/H₂O₂, y aunque difieren los mecanismos de acción de estas dos enzimas sus productos finales son los mismos (Autio, 2006). La catálisis enzimática de la lacasa está basada en un mecanismo oxidativo en donde el oxígeno es el aceptor final de electrones. La lacasa cataliza la oxidación del ácido ferúlico, esta reacción se encuentra acoplada a la reducción de oxígeno molecular con cuatro electrones para formar agua. Se necesita un total de cuatro moléculas de ácido ferúlico para llevar a cabo esta reacción a término (Selinheimo et al., 2007). La peroxidasa cataliza la oxidación del ácido ferúlico, reacción que usa al peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Esta es una reacción cíclica de tres pasos en la cual la enzima peroxidasa (Fe³⁺) primero es oxidada por el peróxido de hidrógeno. Los electrones son reemplazados en dos pasos secuenciales de transferencia de un electrón, en donde el ácido ferúlico reducido se convierte en ácido ferúlico oxidado. La reacción completa utiliza dos moléculas de ácido ferúlico (Halliwell, 1978; Selinheimo et al., 2007). Es importante remarcar que tanto la lacasa como la peroxidasa-H₂O₂ sólo inducen la oxidación del ácido ferúlico, mientras que la formación de dímeros, trímeros y oligómeros de ácido ferúlico ocurre completamente al azar mediante un mecanismo de radicales. Debido a que los enlaces que unen las cadenas de AX por medio del ácido ferúlico son de tipo covalente, estos geles se encuentran clasificados como geles químicos, lo que les confiere la particularidad de ser irreversibles (Papon et al., 2006).

3.5 Geles de Arabinosilanos

Estos geles presentan características muy particulares: son neutros, incoloros e inodoros, y poco afectados por cambios de temperatura, fuerza iónica o de pH, debido a la presencia de enlaces covalentes (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Carvajal-Millan et al. (2006) evaluaron las propiedades estructurales y reológicas de geles de AX preparados mediante la acción de la enzima lacasa, y concluyeron que estas características pueden ser controladas mediante la modificación química del contenido de ácido ferúlico del arabinosilano. La deferulación parcial de los AX reduce el contenido de enlaces covalentes en el gel, lo cual se refleja en la disminución del

módulo elástico y el incremento en el tamaño de poro del gel. Una disminución de 40 % del contenido inicial de ácido ferúlico reduce hasta 89 % la elasticidad del gel formado (Carvajal-Millan et al., 2005a). A concentraciones de AX mayores de 1 % (p/v) no hay incremento en el contenido de dímeros y trímeros de ácido ferúlico, aun cuando el módulo elástico continúa incrementando y el tamaño de poro de la red disminuye, lo cual denota la acción de otras estructuras ferúlicas que crean los enlaces covalentes o interacciones físicas en la estructura del gel. Hasta el momento se han identificado cinco formas isoméricas de di-AF en geles de AX (5-5', 8-5' benzo, 8-O-4', 8-5' y 8-8'). Las formas 8-5' y 8-O-4' son generalmente más abundantes en geles de AX de trigo (Figuroa-Espinoza y Rouau, 1998; Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005a,b, 2006). En cambio, en geles de AX de maíz, el di-AF 5-5' se ha reportado como mayoritario (Carvajal-Millan et al., 2007; Niño-Medina et al., 2009). Hasta el momento se ha reportado la formación de un solo trímero de ácido ferúlico (tri-AF) (ácido 4-O-8', 5'-5''-dehidrotriferúlico) en geles de AX de trigo y de maíz (Carvajal-Millan et al., 2005a, 2007) inducidos por una lacasa. La forma isomérica del di-AF puede tener un efecto en la elasticidad del gel de AX, ya que no todos son efectivos en generar entrecruzamientos entre cadenas distintas del polisacárido. Según Hatfield et al. (1999), el isómero 5-5' es el único que puede formarse tanto entre cadenas distintas (intercadena) como en una misma cadena de polisacárido (intracadena). Este último tipo de unión no contribuye a la elasticidad del gel. En la formación del tri-AF en los geles de AX, la proporción que determina la elasticidad del gel aún no está bien definida. En general, más de 90 % del contenido inicial de ácido ferúlico presente en los AX es oxidado al formarse el gel y sólo 30 % se recupera en formas de di y tri-AF conocidas hasta el momento. Algunos autores señalan la formación de estructuras de di y tri-AF distintas a las que han sido identificadas, o bien de oligómeros superiores de ácido ferúlico (tetrameros, pentámeros) (Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005a, 2006, 2007). Además de la participación de las estructuras di-AF y tri-AF anteriormente mencionados, algunos autores han señalado la contribución de interacciones físicas entre las regiones lineales de las cadenas de AX en el establecimiento de la estructura tridimensional del gel (Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005b). La presencia de cadenas laterales de xilosa se han

detectado en AX de trigos europeos (Adams et al., 2003), las cuales pueden afectar el acercamiento de las cadenas de AX y el establecimiento de la estructura del gel. La estructura del gel de AX estaría entonces determinada tanto por los enlaces covalentes de ácido ferúlico (di, tri-AF) como por las interacciones físicas entre las regiones lineales de xilosa, lo cual a su vez puede afectar los parámetros estructurales y las propiedades funcionales del gel formado. La estructura macroporosa de los geles de AX con un tamaño de poro entre 48 y 305 nm (Tabla 1) confiere a los AX un alto potencial de aplicación en la encapsulación y transporte de biomoléculas como proteínas o péptidos terapéuticos, los cuales al suministrarse por vía oral son susceptibles a degradación enzimática durante su paso por el tracto gastrointestinal (Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005b). Una de estas aplicaciones potenciales podría ser la liberación controlada de MTZ dirigida al colon.

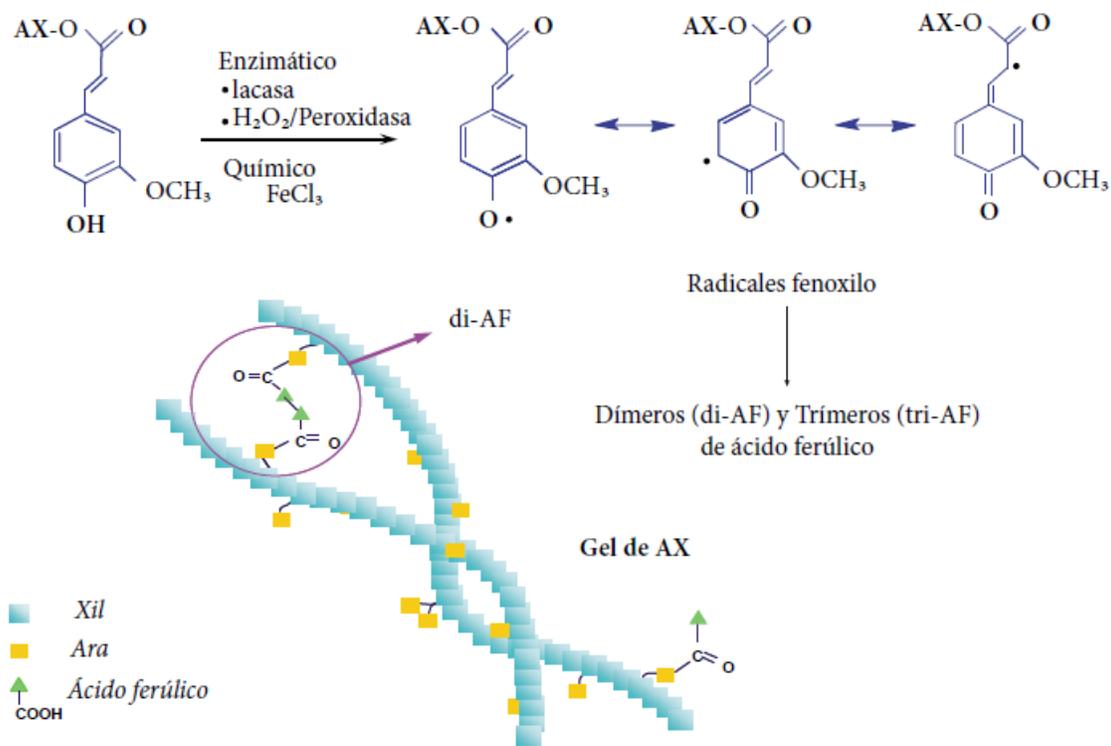


Figura 2. Representación esquemática de la gelificación de los arabinoxilanos ferulados (Adaptado de Morales-Ortega et al., 2013).

Tabla I. Parámetros estructurales de geles de AX inducidos por la enzima lacasa

Enzima comercial (0.04U/mg AX)	Fuente	AX [†] (% p/v)	di-AF ^{**} (μg/mg)	tri-AF [†] (μg/mg)	ξ ^{**} (nm)	Mc [‡] x 10 ³ (g/mol)	ρ _c [‡] x 10 ⁶ (mol/cm ³)
<i>T. versicolor</i>	Maíz	2.5	0.029	0.014	80	31	49
<i>T. versicolor</i>	Maíz	3.5	0.030	0.020	48	20	75
<i>P. cinnabarinus</i>	Trigo	2.0	0.029	0.013	305	145	12

[†]AX = arabinosilanos; ^{**}di-AF = dímeros de ácido férulico; [†]tri-AF = trímeros de ácido férulico; ^{**}ξ = tamaño de poro; [‡]Mc = peso molecular entre dos puntos de unión; [‡]ρ_c = densidad de entrecruzamiento; [†]Adaptado de Berlanga-Reyes *et al.* (2009a) y Carvajal-Millán *et al.* (2005a).

3.6 Metronidazol

El metronidazol (MTZ) es un antibiótico y antiparasitario del grupo de los nitroimidazoles. Inhibe la síntesis del ácido nucleico y es utilizado para el tratamiento de las infecciones provocadas por protozoarios y bacterias anaeróbicas (Ralph, 1983). El MTZ es también indicado como preparación gel para el tratamiento de enfermedades dermatológicas como el acné (Bendesky y Menéndez, 2012). El metronidazol (2-Metil-5-nitroimidazol-1-etanol) tiene como fórmula molecular C₆H₉N₃O₃, funde entre 159° a 163° C y es soluble en varios solventes a 25° C. En la Tabla 2 se observan ejemplos de la solubilidad del MTZ en distintos solventes.

Tabla II. Solubilidad del metronidazol

SOLVENTES	SOLUBILIDAD
<i>Agua</i>	<i>10.5 mg/ml</i>
<i>Metanol</i>	<i>32.5 mg/ml</i>
<i>Etanol</i>	<i>15.4 mg/ml</i>
<i>Cloroformo</i>	<i>3.8 mg/ml</i>
<i>Heptano</i>	<i><0.01 mg/ml</i>

Adaptada de Borro Muentes (2001).

El MTZ posee acción bactericida, amebicida y tricomonicida; el grupo nitro del MTZ se reduce en el interior del organismo infectado y este producto de reducción desorganiza al ADN e inhibe la síntesis de ácido nucleico (Ralph, 1983). El MTZ actúa en sitios intestinales y extra intestinales y es activo contra la mayoría de bacterias anaerobias y protozoarios, incluyendo *Bacteroides fragilis*, *B. melaninogenicus*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia* y *Balantidium coli*. De una dosis oral se absorbe casi el 80 % y las concentraciones máximas en el suero aparecen en una hora. Dichas concentraciones son retardadas a dos horas cuando se ingiere con las comidas (Schwartz, 1976). El MTZ se distribuye en la mayor parte en los tejidos y líquidos del cuerpo, incluyendo líquido cefalorraquídeo, huesos, bilis, saliva, líquidos pleural y peritoneal, secreciones vaginales, líquido seminal, líquido del oído medio y abscesos hepáticos y cerebrales. Estudios anteriores reportan que al momento de ser ingerido por vía oral, dentro de las primeras 5 horas, gran parte del MTZ es absorbido en plasma, lo cual a altas concentraciones podría causar complicaciones en linfocitos humanos (Idkaidek NM, et al. Eur J Pharm Biopharm. 2000). El MTZ cruza con facilidad la placenta y se oxida a nivel del grupo metilo a un metabolito mayor que es el 2-hidroximetronidazol; parte de este se oxida dando el derivado 2-carboxílico, mientras que el MTZ sufre parcialmente otra oxidación en su cadena lateral hidroxietilo dando un segundo derivado carboxílico (Lau, 1992). Del 60 al 80 % de la dosis se excretan como

el compuesto de origen o sus metabolitos. Por la orina, se excreta un 20 % del MTZ sin cambios. Por las heces se excreta de un 6 a 15 %. La vida media del MTZ es de 6 a 8 h en adultos con función renal normal. En pacientes con deterioro de la función hepática, la vida media de este fármaco puede prolongarse. Además, puede ser secretado hacia la leche materna (Borro-Muentes, 2001).

Por lo anterior, se busca desarrollar alternativas para encapsular MTZ y administrarlo de forma que se pueda controlar su liberación durante su paso por el estómago y así obtener una mayor concentración de MTZ que logre llegar al intestino grueso, especialmente la región del colon.

3.7 MATERIALES Y MÉTODOS

3.7.1 Materia Prima

Se utilizaron AX de pericarpio de trigo previamente extraídos y caracterizados utilizando métodos desarrollados por el Grupo de Investigación en Biopolímeros del CIAD. Los AX presentaron una relación A/X de 0.80, un peso molecular de 74 kDa, una $[\eta]$ de 206 mL/g y un contenido en ácido ferúlico de 0.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ AX (Berlanga-Reyes et al. 2011). Se utilizó una lacasa comercial (*Trametes versicolor*) como agente de gelificación. Se utilizó MTZ comercial.

3.7.2 Preparación de los Geles de AX con MTZ

Se prepararon soluciones de AX al 5 % (p/v) y 20% de MTZ utilizando una solución reguladora citrato fosfato 0.5 M con un pH de 5.5. Los geles se formaron utilizando 2 ml de solución AX/MTZ y 50 μl de lacasa (1.675 nkat /mg de AX). La gelificación se llevó a cabo durante 1.5 h a 25°C.

3.7.3 Contenido de ácido ferúlico, sus dímeros y trímeros

Se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (HPLC). Los compuestos fenólicos fueron extraídos mediante saponificación controlada y

recuperación en éter de acuerdo a Vansteenkiste et al. (2004). A 0.5 ml de gel de AX se agregó 1 mL de NaOH 1 N en una atmósfera enriquecida con argón y se incubaron por 2 h en la oscuridad a 35°C. Posteriormente, se añadieron 10µg de ácido 3,4,5-trimetoxi-trans-cinámico (TMCA) como estándar interno y se ajustó el pH a 2.0 ± 0.2 con HCl 4N. Los fenoles se extrajeron dos veces con éter dietílico y se evaporaron a 30°C en presencia de argón. El extracto seco se recuperó en 0.50 ml de una mezcla metanol/agua/ácido acético (40/59/01), se filtró (0.45 µm) e inyectó (20 µl) en una columna Supelcosil (LC-18-DB 250 × 4.6 mm, Supelco, Inc., Bellefont, PA). La temperatura de la columna fue de 35°C y se utilizó una elución isocrática con una fase móvil metanol/agua/ácido acético (40/59/01) a 0.6 ml/min. El equipo utilizado fue un Waters 996 (Millipore Co., Milford, MA) equipado con un detector de arreglos de diodos. La detección se realizó a 280 nm.

3.7.4 Reología dinámica de baja deformación

Las mediciones reológicas se llevaron a cabo utilizando un reómetro dinámico de baja deformación (Discovery HR-2 rheometer; TA Instruments, New Castle, DE, EUA) de acuerdo a Vansteenkiste *et al.*, (2004). La cinética de gelificación de los AX se registró durante 6 h a 25°C. Las mediciones se realizaron a 0.25 Hz y 5% de deformación. Se realizó un barrido de deformación del gel observándose que la región de comportamiento lineal está entre el 1.5 y el 10% de deformación. El espectro de frecuencia del gel se obtuvo entre 0.1 y 10 Hz a 5% de deformación a 25°C.

3.7.5 Microscopía de barrido electrónico

Se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (MEB) en los geles de AX formados. Las muestras fueron liofilizadas previamente a su análisis a -40 °C/0.133 mbar (Freezone 6 freeze dryer, Labconco, KC, EUA). Los análisis fueron hechos en el Laboratorio de Microscopía del Departamento de Polímeros de la Universidad de Sonora, en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7401F (Peabody, MA, EUA) utilizando 1.8 kV en modo de electrones secundarios.

3.7.6 Cinética de liberación de MTZ a partir del gel de AX

Las dimensiones del gel formado fueron de 3 cm de diámetro y 0.3 cm de altura (gel

tipo lámina). Se utilizó una relación en volumen de 1:3, (1 ml de gel por 3 ml de solución fisiológica como líquido de recuperación) a distintos pH (1.2, 4.5 y 6.8), 37°C y 90 rpm. Se tomaron 6 ml de muestra cada hora durante un periodo de cinco horas. En cada tiempo de muestreo se reemplazó la solución fisiológica. Las muestras recolectadas se congelaron para posteriormente realizar el análisis de contenido de MTZ (Krishnaiah YS, Bhaskar Reddy PR, Satyanarayana V, Karthikeyan RS. (2002)).

3.7.8 Cuantificación de MTZ

El MTZ liberado del gel de AX fue cuantificado por espectrofotometría UV-Vis de acuerdo a lo reportado por Satyam et al. (2012). Se generó una curva de calibración utilizando soluciones de MTZ en el rango de concentración de 0.1 a 0.3 mg/mL. La relación entre la concentración de MTZ y la absorbancia registrada a 320 nm sigue una relación lineal (99.77%), lo cual permitió utilizar esta curva para cuantificar el MTZ liberado de los geles de AX.

En la figura 3 podemos observar el comportamiento lineal que presenta la absorbancia a 320 nm de una solución de MTZ a distintas concentraciones

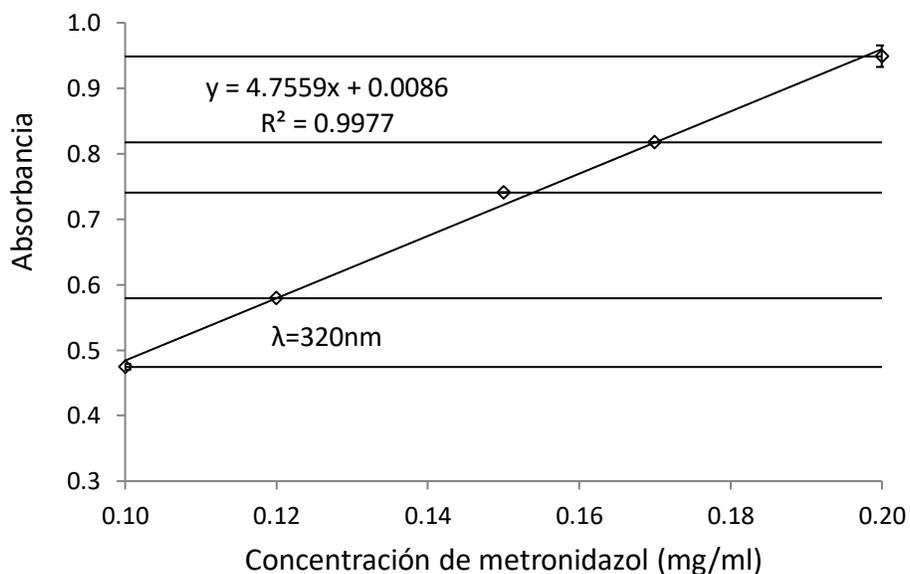


Figura 3. Curva de calibración para la cuantificación de metronidazol.

3.7.9 Coeficiente de difusión aparente de MTZ

El coeficiente de difusión aparente (D_m) del MTZ durante su liberación a partir del gel de AX se calculó a partir de la cinética de liberación de la molécula. Se aplicó una solución analítica de la segunda ley de la difusión de Fick, relacionando la concentración de MTZ liberada en función del tiempo y la distancia (Crank 1975).

$$\frac{M_t}{M_0} = \frac{4}{H} \left(\frac{D_m t}{\pi} \right)^{0.5} \dots\dots\dots (1)$$

Donde M_t es la masa acumulada de MTZ liberada en el tiempo t , M_0 es la cantidad de MTZ en el gel al tiempo cero, t es el tiempo, L es la altura del gel (0.4 cm) y D_m es el coeficiente de difusión aparente de la molécula en estudio. La masa acumulada de MTZ liberada (M_t/M_0) vs la raíz cuadrada del tiempo es una relación lineal cuya pendiente permite calcular D_m (Carvajal-Millan et al., 2005b). También se calculó el porcentaje de MTZ liberado al final del experimento.

3.7.10 Análisis estadístico

Las mediciones fueron realizadas por triplicado. Todos los resultados son expresados con valores de medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Formación de geles de AX y AX/MTZ

La formación de los geles al 5 % de AX (p/v) fue estudiada mediante reología dinámica de baja deformación. Las soluciones de AX y AX/MTZ mostraron un aumento en el módulo elástico (G') en función del tiempo hasta alcanzar un *pseudo plateau*. El valor de G' fue igual al del módulo viscoso (G'') con $\tan \delta = (G''/G')$ igual a uno a los 3.5 y 8.5 min para AX y AX/MTZ, respectivamente. Estos valores de tiempo de gelificación (t_g) son menores a los reportados en otros AX de trigo en los cuales el t_g varía entre 10 y 25 minutos (Carvajal-Millan *et al.*, 2005a; Berlanga-Reyes *et al.*, 2014). Lo anterior podría ser explicado en base al menor peso molecular de los AX de pericarpio trigo utilizados el presente estudio (74 kDa) respecto a los AX de endospermo de trigo (300-400 kDa). Este mayor peso molecular en los AX de trigo forma soluciones de AX mas viscosas retardando la acción de la lacasa, lo que se ve reflejado en una fase inicial de poco incremento en G' , lo cual no se observa en los AX de pericarpio de trigo utilizados en el presente estudio. Por otra parte, los AX de pericarpio trigo presentan un menor contenido en ácido ferúlico (0.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ AX) respecto a los AX de endospermo de trigo (1-2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ AX), esto podría indicar que la etapa inicial de gelificación de los AX de pericarpio trigo esta mayormente determinada por la menor longitud de las cadenas que por el contenido de ácido ferúlico. Sin embargo se requieren estudios más específicos encaminados a elucidar el mecanismo de gelificación de la molécula para poder explicar este comportamiento con mayores fundamentos. Los valores de G' al final del experimento fueron de 175 y 164 Pa para los geles AX y AX/MTZ, respectivamente y los valores para G'' fueron de 19 y 21 Pa para los geles de AX y AX/MTZ (Figuras 4 y 5 respectivamente). Los espectros mecánicos de los geles después de 1.5 horas a 25°C se muestran en las Figuras 6 y 7, respectivamente. Estos espectros son típicos de geles con los valores de G' lineales e independientes de la frecuencia de deformación y los valores de G'' mucho más pequeños y dependientes de la frecuencia (Carvajal-Millan *et al.*, 2005a). Este comportamiento es similar al

reportado anteriormente para AX de trigo gelificados con lacasa o el sistema peroxidasa/H₂O₂ (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Dervilly *et al.*, 2000; Vansteenkiste *et al.*, 2004; Carvajal-Millan *et al.*, 2005a). Los valores de $\tan \delta = (G''/G')$ calculados a 0.25 Hz fueron 0.10 y 0.11 para los geles de AX y AX/MTZ, respectivamente, indicando la presencia de un sistema elástico. La pequeña disminución en el valor de $\tan \delta$ en el gel de AX respecto al gel AX/MTZ indica una menor contribución viscosa a la estructura del gel.

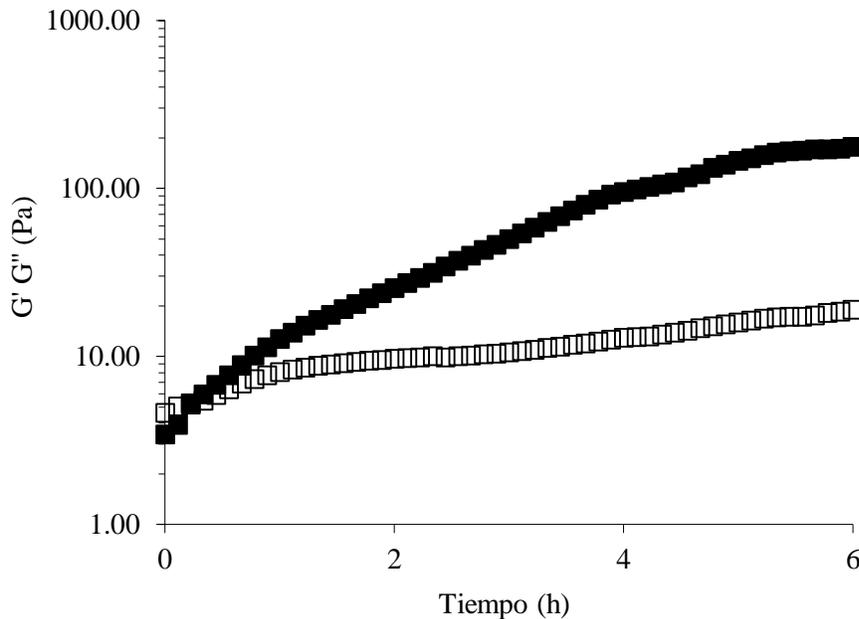


Figura 4. Cambios en la elasticidad (G' ■) y la viscosidad (G'' □) de una solución de AX durante la gelificación inducida por lacasa a 25°C, 0.25 Hz y 5% de deformación.

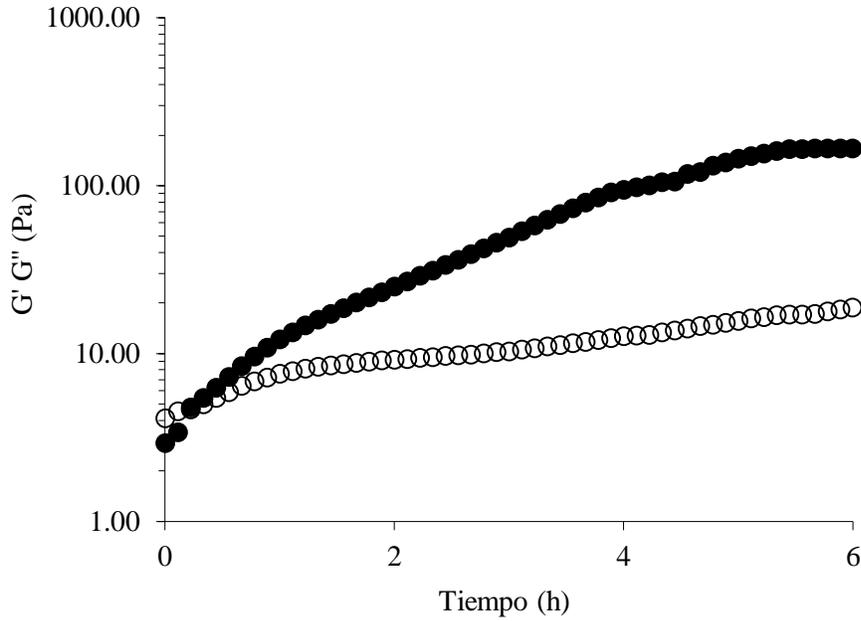


Figura 5. Cambios en la elasticidad (G' ■) y la viscosidad (G'' □) de una solución de AX/MTZ durante la gelificación inducida por lacasa a 25°C, 0.25 Hz y 5% de deformación.

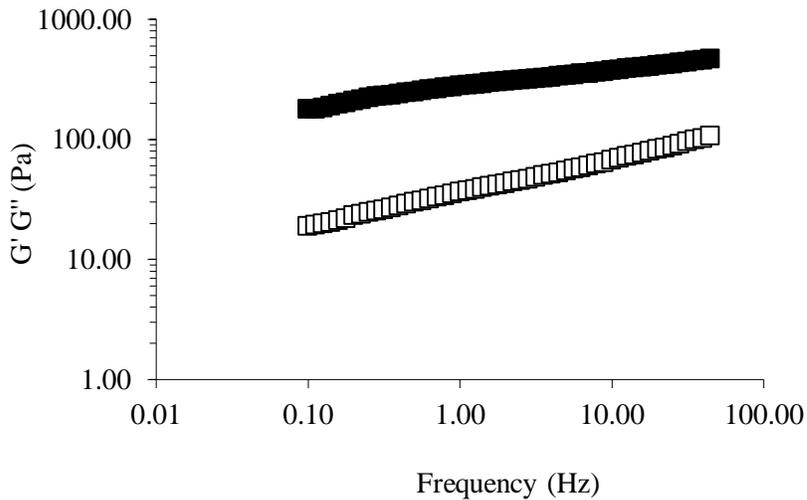


Figura 6. Espectro de frecuencia (G' ■, G'' □) de gel AX después de 1.5 horas de gelificación por lacasa a 25°C. Medición a 25°C y 5% de deformación.

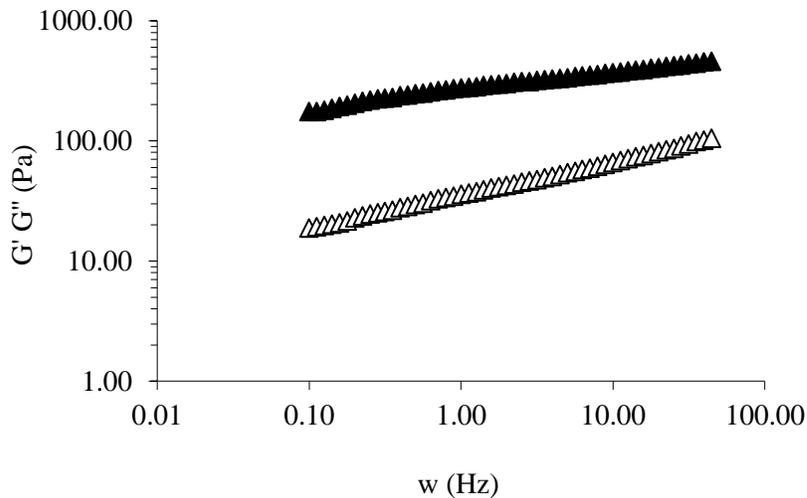


Figura 7. Espectro de frecuencia (G' ■, G'' □) de gel AX/MTZ después de 1.5 horas de gelificación por lacasa a 25°C. Medición a 25°C y 5% de deformación.

4.2 Contenido de uniones covalentes en el gel de AX y gel de AX/MTZ

Al final de la gelificación los geles de AX y AX/MTZ presentaron un contenido de di-AF de 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ AX, lo cual indica que el MTZ no afecta la formación de los entrecruzamientos covalentes en el gel de AX. Este contenido de di-AF está en el rango reportado para otros geles de AX de trigo (Carvajal-Millan *et al.*, 2005); (Berlanga-Reyes, C.M., Carvajal-Millan, E., Hicks, K.B., Yadav, M.P, Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Toledo-Guillén, A.R., Islas-Rubio, A.R. (2014)). Las estructuras isoméricas de di-AF detectadas en los geles de AX y AX/MTZ fueron el 5-5' y el 8-O-5' a porcentajes de 50%. Lo anterior sugiere que la gelificación de AX en presencia de MTZ no conduce a la formación de diferentes isómeros de di-AF. Sin embargo, se requieren mayores estudios para explicar este comportamiento.

4.3 Microscopía Electrónica de Barrido

La microestructura del gel de AX y del gel AX/MTZ obtenidos en el presente estudio fue

analizada mediante microscopia electrónica de barrido (MEB), cuyas imágenes se muestran en las Figuras 8 y 9. Para el análisis MEB los geles de AX fueron liofilizados. En las imágenes MEB de los geles de AX se puede observar una estructura porosa heterogénea de tipo panal de abeja imperfecto, lo cual concuerda con previos reportes en geles de AX (Morales-Ortega, A.; Niño-Medina, G.; Carvajal-Millán, E.; Gardea-Béjar, A.; Torres-Chávez P.; López-Franco, Y.; Rascón-Chu, A.; Lizardi-Mendoza, J. (2013)); (Martinez-Lopez, A.L., Carvajal-Millan, E., Micard, V., Rascon-Chu, A., Brown-Bojorquez, F., Sotelo-Cruz, N., Lopez-Franco, Y.L., Lizardi-Mendoza, J. (2016)); (Morales-Burgos, A.M.; Carvajal-Millan, E.; Lopez-Franco, Y.L.; Rascon-Chu, A.; Lizardi-Mendoza, J.; Sotelo-Cruz, N.; Brown-Bojorquez, F.; Burgara-Estrella, A.; Pedroza-Montero, M. (2017)). Los procesos de formación de hielo y de sublimación que implica la liofilización son determinantes en la morfología del material y, en consecuencia, es diversamente afectada por las condiciones de congelación y otros fenómenos térmicos que ocurren durante el procedimiento de secado. Es posible ver que el gel de AX presenta una estructura con porosidades más pequeñas y continuas, y que en el gel AX/MTZ se observa un material menos estructurado y con porosidades de mayor tamaño. Estas diferencias son concordantes con los resultados encontrados en el análisis reológico de los geles de AX donde la G' disminuyó de 175 a 164 Pa al incorporar el MTZ.

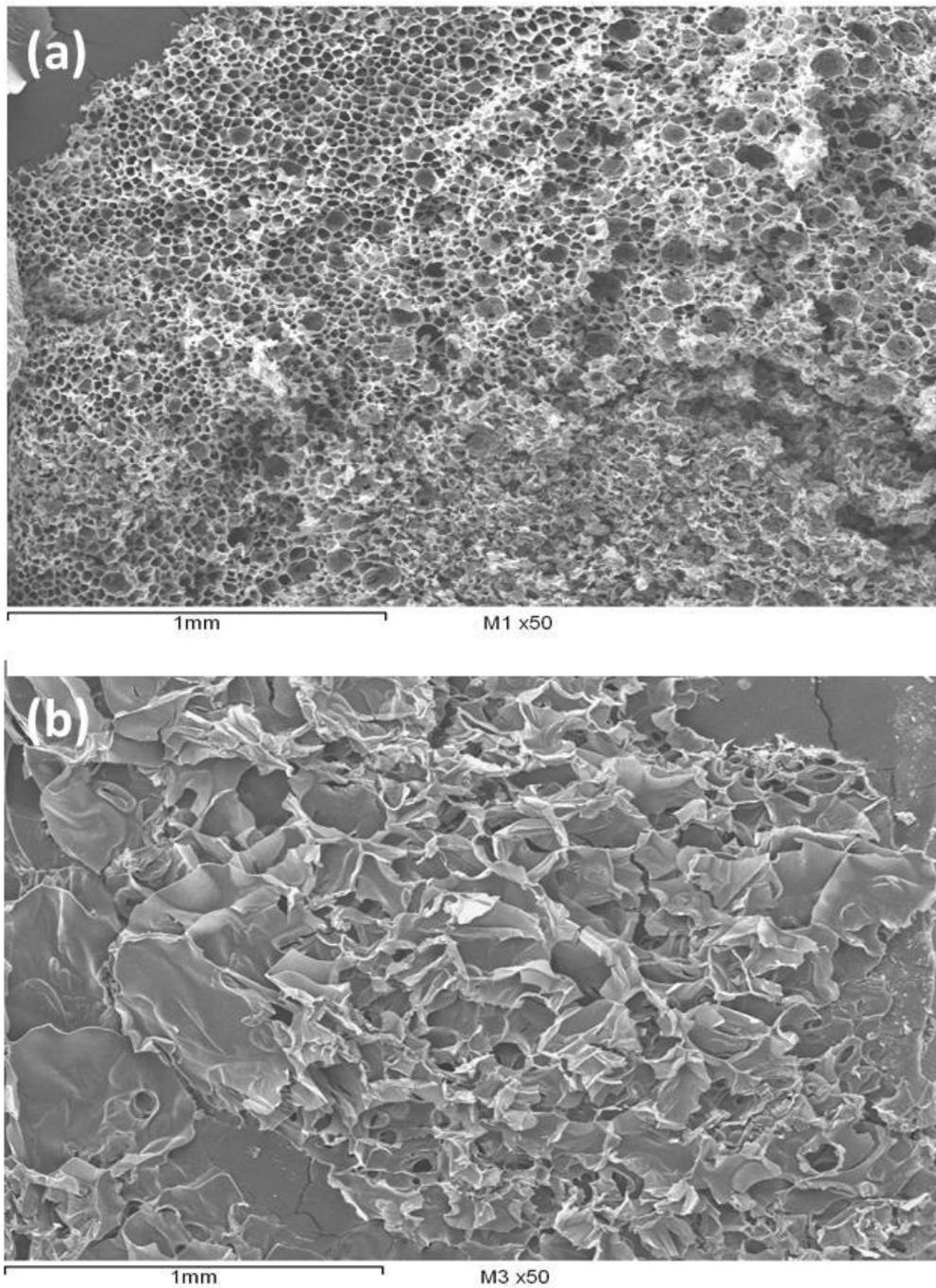


Figura 8

Figura 8. Microestructura superficial de (a) gel de AX y (b) gel AX/MTZ obtenida por microscopía electrónica de barrido. Magnificación 50X.

4.4 Cinética de liberación de MTZ

En la mayoría de los estudios de liberación controlada de fármacos, la molécula es cargada en el gel por difusión. Sin embargo, este método es lento y hace que se pierda cierta cantidad de las moléculas cargadas ya que solamente una parte es introducida en el gel. En el presente estudio se utilizó un método alternativo, el cual consistió en formar el gel alrededor del MTZ. Los geles de AX obtenidos contenían 200 mg de MTZ. Anteriormente se reportó una cantidad similar de MTZ contenida en goma guar al 20 % (Krishnaiah YS, Bhaskar Reddy PR, Satyanarayana V, Karthikeyan RS. (2002)). Sin embargo, en dicho estudio no se reporta el efecto del MTZ en las propiedades viscoelásticas del material formado. En la Figura 9, se presenta la cinética de liberación del MTZ a partir del gel de AX al 5% (p/v). La masa acumulada (M_t/M_0) de MTZ liberada en función del tiempo aumentó de 0 a 0.18. Asimismo se muestra la relación entre la cantidad de MTZ total liberada (M_t/M_0) y la raíz cuadrada del tiempo, lo cual permite el cálculo del coeficiente de difusión aparente (D_m) de la insulina en los geles de AX en el periodo de tiempo que presenta una relación lineal. En la Cuadro 3 se reportan el valor de D_m del MTZ encontrado en el gel de AX, así como el valor del coeficiente de difusión del MTZ en agua (D_0) obtenido de la literatura Meulemans et al., (1989). Después de 5 h de incubación de los geles de AX, del total del MTZ incorporado inicialmente solo se liberó el 18%. El tiempo promedio que transcurre entre la ingestión de un alimento y su llegada al colon es de 6-9 horas. Estos resultados indican que la mayor parte del MTZ incorporado en el gel de AX no sería liberada durante su paso por el sistema gastrointestinal superior (primeras 5 horas). Los AX en el colon podrían ser degradados por la microflora intestinal (Martinez-Lopez et al., 2016), permitiendo la liberación del MTZ el cual podría ejercer ahí su acción como antiparasitario en el tratamiento de amibiasis en colon.

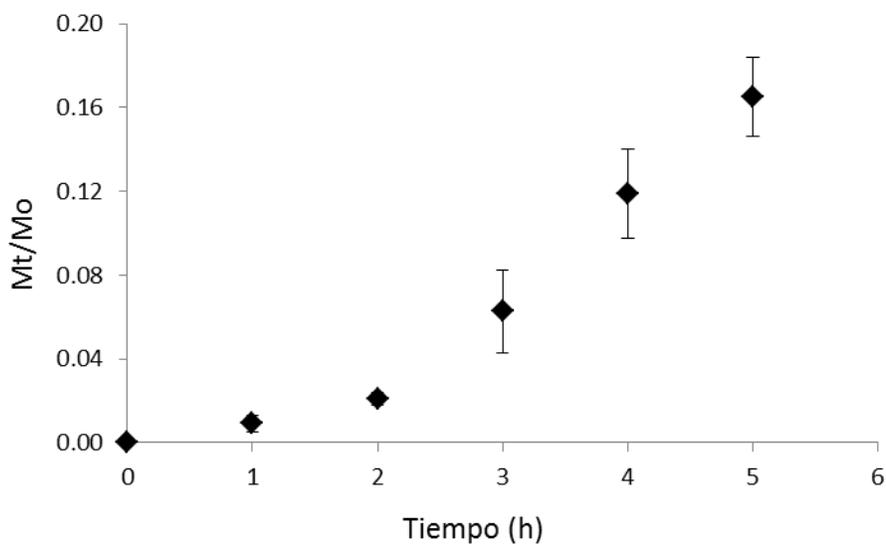


Figura 9. Cinética de liberación de metronidazol a partir de geles de AX al 5% (p/v).

Tabla III. Parametros de liberación de metronidazol a partir del gel de arabinosilanos al 5% (p/v)

D_0^* ($\times 10^{-6}$) cm^2/seg	D_m ($\times 10^{-7}$) cm^2/s	MTZ liberado (%)
6.4	3.95 ± 0.80	18 ± 2

*Do es el coeficiente de difusión del metronidazol en agua a 37 °C reportado en la literatura (Meulemans et al., 1989).

5. CONCLUSIONES

Los AX de pericarpio de trigo forman geles covalentes en presencia de MTZ utilizando la enzima lacasa como agente entrecruzante. El MTZ atrapado en los geles de AX puede ser liberado de manera controlada durante las primeras 5 horas, lo cual permite calcular su coeficiente de difusión aparente. La baja velocidad de salida del MTZ del gel permite que en las primeras 5 horas solamente se pierda el 18 % de la molécula por este mecanismo, lo cual permitiría la entrega de la mayor parte del fármaco cargado en el gel una vez que la red polimérica sea fermentada por la microbiota del colon. La capacidad de los AX de pericarpio de trigo para encapsular MTZ permite ofrecer un uso alternativo al pericarpio de trigo como fuente de este polisacárido de alto valor agregado.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda llevar a cabo futuras investigaciones en un simulador del ecosistema microbiano intestinal humano (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem, SHIME®) y en un modelo murino con el objetivo de confirmar la liberación en colon del MTZ encapsulado en geles de AX.

Tomar en cuenta las características fisicoquímicas y capacidad gelificante de los AX ferulados para la encapsulación no solo de metronidazol sino de distintos medicamentos.

Realizar estudio alternativo para el uso de AX ferulados como vía de administración de alimentos para tratamientos relacionados con problemas gastrointestinales

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams L E, P A Kroon, G Williamson, V J Morris (2003) Characterization of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy. *Carbohydrate Res.* 338:771-780.
- Andrewartha K A, D R Phillips, BA Stone (1979) Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymatically modified arabinaxylans. *Carbohydrate Res.* 77:191-204 (Niño-Medina et al., 2010a).
- Autio K (2006) Functional aspects of cereal cell-wall polysaccharides. In: *Carbohydrates in Food.* A-C Eliasson (ed). CRC-Taylor & Francis. Boca Raton, FLA. pp:167-207.
- Bendesky, A., Menéndez, D. (2001) Metronidazol: una visión integral. *Rev Fac Med UNAM* 44(6): 255–259.
- Berlanga-Reyes C M, E Carvajal-Millán, G C Juvera, A Rascón-Chu, J A Márquez-Escalante, A L Martínez-López (2009) Laccase induced maize bran arabinoxylan gels: Structural and rheological properties. *Food Sci. Biotech.* 18:1027-1029.
- Berlanga-Reyes CM, Carvajal-Millan E, Lizardi-Mendoza J, Islas-Rubio AR, Rascón-Chu A. (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., Carvajal-Millan, E., Hicks, K.B., Yadav, M.P, Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Toledo-Guillén, A.R., Islas-Rubio, A.R. (2014). Protein/Arabinoxylans Gels: Effect of Mass Ratio on the Rheological, Microstructural and Diffusional Characteristics. *International Journal of Molecular Sciences* 15 (10), 19106-19118.
- Borro Muentes, F. (2001). Estudio de la eficacia de los aglutinantes en la disolución del metronidazol tabletas 250 mg. Tesis de Doctorado. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
- Carvajal-Millan E, Guigliarelli B, Belle V, Rouau X, Micard V. (2005a) Storage stability of arabinoxylan gels. *Carbohydrate Polymers* 59, 181-188.

- Carvajal-Millan E, Rascón-Chu A, Márquez Escalante J, Micard V, Ponce de León N, Gardea A. (2007) Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers*, 69, 280-285.
- Carvajal-Millan, E.; Guilbert, S.; Doublier, J.L.; Micard, V. (2006). Arabinoxylan/protein gels: structural, rheological and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*, 20: 53–61.
- Carvajal-Millan, E.; Landillon, V.; Morel, M.-H.; Rouau, X.; Doublier, J.-L.; Micard, V. (2005b) Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*, 6, 309–317.
- Dervilly G, L Saulnier, P Roger, J F Thibault (2000) Isolation of homogeneous fractions of wheat water-soluble arabinoxylan. Influence of structure on their macromolecular characteristics. *J. Agric.Food Chem.* 48:270-278
- Figueroa-Espinoza M C, X Rouau (1998). Oxidative crosslinking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: mechanism of linkage between feruloylates arabinoxylans. *Cereal Chem.* 75:259-265.
- Grootaert C, J A Delcour, C M Courtin, W F Broekaert, W Verstraete, T Van de Wiele (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends Food Sci. Technol.* 18:64-71.
- Halliwel B (1978) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* 140:81-88.
- Hatfield R D, J Ralph, J H Grabber (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.* 79:403–407.
- Ishii T (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127:111-127.
- Izydorczyk M S, C G Biliaderis (1995). Cereal arabinoxylan: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 28:33-48.
- Izydorczyk M S, C G Biliaderis (2007). Arabinoxylans: Technologically and nutritionally functional plant polysaccharides. In: *Functional Food Carbohydrates*. C G Biliaderis, M S Izydorczyk (eds). CRC Press, Boca Raton. FL, USA. pp: 249-290.

- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C.G., Bushuk, W. (1991), Comparison of structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat varieties, *Cereal Chem.*, 68:139.
- Krishnaiah YS, Bhaskar Reddy PR, Satyanarayana V, Karthikeyan RS. (2002) Studies on the development of oral colon targeted drug delivery systems for metronidazole in the treatment of amoebiasis. *International Journal of Pharmaceutics* 236, 43–55.
- Lapierre C, B Pollet, M C Ralet, L Saulnier (2001) The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association. *Phytochemistry* 57:765-772.
- Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC (1992) Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. *Clin Pharmacokinet* 23: 328-64.
- Martinez-Lopez, A.L., Carvajal-Millan, E., Micard, V., Rascón-Chu, A., Brown-Bojorquez, F., Sotelo-Cruz, N., López-Franco, Y.L., Lizardi-Mendoza, J. (2016). *In vitro* degradation of covalently cross-linked arabinoxylan hydrogels by bifidobacteria. *Carbohydrate Polymers* 144: 76 – 82.
- Meulemans A, F Paycha, P Hannoun, M Vulpillat (1989) Measurement and Clinical and Pharmacokinetic Implications of Diffusion Coefficients of Antibiotics in Tissues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33:1286-1290
- Morales-Burgos, A.M.; Carvajal-Millan, E.; Lopez-Franco, Y.L.; Rascon-Chu, A.; Lizardi-Mendoza, J.; Sotelo-Cruz, N.; Brown-Bojorquez, F.; Burgara-Estrella, A.; Pedroza-Montero, M. (2017) Syneresis in Gels of Highly Ferulated Arabinoxylans: Characterization of Covalent Cross-Linking, Rheology, and Microstructure. *Polymers* 9: 164.
- Morales-Ortega, A.; Niño-Medina, G.; Carvajal-Millán, E.; Gardea-Béjar, A.; Torres-Chávez P.; López-Franco, Y.; Rascón-Chu, A.; Lizardi-Mendoza, J. (2013). Los arabinoxilanos ferulados de cereales. Una revisión de sus características fisicoquímicas y capacidad gelificante. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36: 439–446.
- Niño-Medina G, E Carvajal-Millán, J Lizardi, A Rascon-Chu, J A Marquez-Escalante, A Gardea, A L Martinez-Lopez, V Guerrero (2009) Maize processing waste water arabinoxylans: gelling capability and cross-linking content. *Food Chemistry* 115:1286-1290.

- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Rascon-Chu, A, Márquez-Escalante, J.A., Guerrero V., Salas-Muñoz, E. (2010). Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochemistry Reviews*, 9 (1): 111-120.
- Papon P, J Leblond, P Meijer (2006) Gelation and transitions in biopolymers. In: *The Physics in Phase Transition. Concepts and Applications*. 2nd ed. Springer-Verlag. New York. pp: 189-213.
- Ralph ED. (1983) Clinical pharmacokinetics of metronidazole. *Clinical Pharmacokinetics* 8, 43–62.
- Rattan O, Izydorczyk MS, Biliaderis CG. (1994) Structure and rheological behavior of arabinoxylans from Canadian bread wheat flours. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie* 27, 550-555.
- Roubroeks J.P., R. Andersson, D. I. Mastromauro, B. E. Christensen, P. Åman (2001) Molecular weight, structure and shape of oat (1→3),(1→4)-b-D-glucan fractions obtained by enzymatic degradation with (1→4)-b-D-glucan 4-glucanohydrolase from *Trichoderma reesei*, *Carbohydr. Polym.* 46: 275-285.
- Satyam Z, Dongare Umesh S, Jadhav Shweta A, Jadhav Manisha B. (2012) Validated spectrophotometric methods for simultaneous estimation of metronidazole and furazolidone in pure and tablet dosage form. Validated spectrophotometric methods for simultaneous estimation of metronidazole and furazolidone in pure and tablet dosage form. *International Research Journal of Pharmacy* 3, 461–464.
- Saulnier L, P E Sado, G Branlard, G Charmet, F Guilon (2007). Wheat arabinoxylan: exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J. Cereal Chem.* 46:261-281
- Schwartz DE, Jeunet F (1976). Comparative pharmacokinetics studies of ornidazol and metronidazole in man. *Chemotherapy* 22: 19-29.
- Selinheimo E, K Autio, K Kruus, J Buchert (2007) Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J. Agric. Food Chem.*55:6357-6365.
- Smith M M, R D Hartley; Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr. Res.* 1893, 118:65-80.

Vansteenkiste E, Babot C, Rouau X, Micard V. (2004) Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. Food Hydrocolloids, 18 557-564.

Crank, 1975 JCrankThe Mathematics of Diffusion. (2nd ed.), Oxford Press (1975), p. 414.