



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

**DISEÑO DE APÓSITOS A BASE DE
QUITOSANO/GELATINA PARA EL
TRATAMIENTO DE QUEMADURAS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:
MONTES RAMÍREZ ASHANTI

DIRECTOR DE TESIS
DRA. ALMA GABRIELA PALESTINO ESCOBEDO



SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

ENERO 2023

El programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 000896, en el Nivel Consolidado.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: No. CVU. 1102115



Diseño de apósitos a base de quitosano/gelatina para el tratamiento de quemaduras por Montes Ramírez Ashanti está licenciado bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional.

<input type="checkbox"/>	Título	Informe	Autor	Procesados	Acciones
<input type="checkbox"/>	DISEÑO DE APÓSITOS A BASE DE QUITOSANO/GELATINA PARA EL TRATAMIENTO DE QUEMADURAS 1 part - 0 words	23%	Montes Ramírez Ashanti	18 ene 2023 8:29:50	 



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PROGRAMA DE POSGRADO EN
CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

DISEÑO DE APÓSITOS A BASE DE
QUITOSANO/GELATINA PARA EL
TRATAMIENTO DE QUEMADURAS

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTA:
MONTES RAMÍREZ ASHANTI

DIRECTORA:

DRA. ALMA GABRIELA PALESTINO ESCOBEDO

SINODALES:

DRA. ERIKA PADILLA ORTEGA

DRA. CÁNDIDA ANAHY CISNEROS COVARRUBIAS

DR. CESAR FERNANDO AZAEL GÓMEZ DURÁN



Enero,2023

Comité Académico del posgrado en Ciencias en Ingeniería Química

Facultad de Ciencias Químicas

Presente:

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de maestría I. Q. Ashanti Montes Ramírez, titulada “DISEÑO DE APÓSITOS A BASE DE QUITOSANO/GELATINA PARA EL TRATAMIENTO DE QUEMADURAS”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para iniciar los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 20 de enero del 2023 a las 9:00 horas en el auditorio chico de la facultad.

Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo

Directora

Firma

Dra. Erika Padilla Ortega

Asesora

Firma

Dra. Cándida Anahy Cisneros Covarrubias

Asesora

Firma

Dr. Cesar Fernando Azael Gómez Durán

Asesor

Firma

DEDICATORIA

A mis padres por todo su apoyo y por recordarme que soy más valiente de lo que creo, más fuerte de lo que pienso y más amada de lo que puedo imaginar.

Agradecimientos personales

En estas primeras líneas me gustaría agradecer principalmente a mi familia, especialmente a mis padres Aucencio Montes y Otilia Ramírez, por ser unos excelentes padres y siempre estar al pie del cañón en cada decisión, gracias por apoyarme en alcanzar mis sueños y por motivarme a nunca rendirme, aunque todo parezca perdido, sinceramente sin todo su apoyo y amor no sería la persona en la que me estoy convirtiendo, cada uno de mis logros se los debo a ustedes.

A mis hermanos, María Selene y José Edgar, por ser mis compañeros y amigos de toda la vida, gracias por hacerme los días difíciles más amenos con cada una de sus ocurrencias y principalmente por todo su cariño, apoyo y paciencia.

A mis pequeños sobrinos Iker, Alexis, Regina y Fernando, gracias por alegrarme los días más difíciles llenos de estrés y lágrimas, donde cada uno de ustedes con sus caritas tiernas y dulces siempre me dibujaban una feliz sonrisa.

A mis amigos Valeria, Moisés, Camilo, Fide, Yadira y Laura por su amistad y apoyo moral en todo momento, gracias especialmente a Laura por apoyarme y estar presente en cada paso de este proyecto, que sin su apoyo hubiera resultado más difícil. Gracias a todos, sin ustedes no hubiera sido lo mismo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras, César, Anahy, Azael, Ileana, Uriel y Elizabeth por su constante apoyo y disposición cuando lo necesité.

Agradecimientos Institucionales

A CONACYT por el financiamiento otorgado para la beca de licenciatura a través del proyecto de ciencia básica (CB) CB 2017-2018 “**SINTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE PROPIEDADES DE COMPOSITOS FUNCIONALES DE NUEVA GENERACIÓN**”, con número **A1-S-31287**. Agradezco también por la beca otorgada con número de registro **No. CVU: 1102115**.

A la Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo por haberme brindado la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo, por orientarme en cada paso del desarrollo de este trabajo de investigación, gracias por toda su confianza, apoyo, paciencia y consejos.

A la Dra. Erika Padilla Ortega por su asesoría y apoyo a lo largo de este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología, en especial a la Dra. Diana María Escobar García del por la orientación y apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto.

Al Laboratorio de Procesamiento de Polímeros de la Facultad de Ciencias Químicas, especialmente la I.Q. Ana Lourdes Rodríguez Villanueva por su apoyo y capacitación en equipos de pruebas mecánicas.

Al Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Facultad de Ciencias Químicas, especialmente a la M.E. Perla Cristina Mayorga Colunga y L.Q. Sury Sarahí Salazar Martínez por su apoyo y colaboración de su experiencia en los análisis de actividad antibacteriana para el desarrollo del proyecto.

Al Laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras de la Facultad de Ciencias Químicas, por recibirme y permitirme realizar el presente proyecto de investigación.

Finalmente, agradecer a la Facultad de Ciencias Químicas y al Posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por proporcionarme los conocimientos adquiridos en estos años.

RESUMEN

En el presente estudio se desarrollaron con éxito esponjas a base de quitosano y gelatina como apósitos y vehículos para la administración sostenida de tres sustancias bioactivas: tramadol, un analgésico de sedación leve, metformina un fármaco antiinflamatorio e hipoglucemiante y el exopolisacárido *Porphyridium purpureum* con propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. Las esponjas se sintetizaron mediante la reacción de amidación formando enlaces amida entre los ácidos carboxílicos del ácido cítrico y los grupos amino del quitosano; la gelatina y el exopolisacárido mostraron interacciones mediante enlaces hidrógeno y fuerzas electrostáticas. Se realizó un diseño de experimentos central compuesto con superficie de respuesta con dos factores: (A) cantidad de exopolisacárido (mg/mL) y (B) relación volumétrica de gelatina respecto a quitosano (%). Se determinaron los parámetros óptimos de síntesis para las respuestas analizadas: capacidad de absorción y retención de agua, resistencia a la compresión y grado de entrecruzamiento. Se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y morfológicas de los materiales cargados con exopolisacárido, metformina y tramadol (SCG80-20F) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR) con lo que se confirmó el mecanismo de formación de las esponjas. Para determinar si el apósito cumple con las propiedades para una adecuada cicatrización se determinó la capacidad de retención y humedad de agua, la tasa de transferencia de vapor de agua (WVTR), la porosidad y la degradación *in vitro* por métodos gravimétricos. Las pruebas biológicas confirmaron que los materiales no son citotóxicos y tienen una buena actividad antibacteriana contra *E. coli* y *S. aureus*. A partir de los perfiles de liberación se observó una liberación sostenida de metformina y tramadol, durante 12 y 120 h respectivamente. Las cinéticas de liberación *in vitro* de metformina y tramadol siguieron una cinética de primer orden y Korsmeyer - Peppas respectivamente. Basado en estos resultados la esponja diseñada se ofrece como un apósito prometedor para el tratamiento de quemaduras.

Palabras clave: esponja, quitosano, gelatina, metformina, tramadol, apósito para quemaduras.

ABSTRACT

In the present study, chitosan-gelatin-based sponges were developed as dressings and vehicles for the sustained administration of tramadol, a mild sedation analgesic, and metformin, a drug with anti-inflammatory and hypoglycemic properties. Besides *Porphyridium purpureum* exopolysaccharide, microalgae bioactives with anti-inflammatory and antibacterial properties were added to composites. These materials were synthesized through the amidation reaction, forming amide bonds between the carboxylic acids of citric acid and the amino groups of chitosan; gelatin and exopolysaccharide showed interactions through hydrogen bonding and electrostatic forces. Moreover, a design of central compound experiments with response surface was carried out with two factors: the (A) amount of exopolysaccharide (mg/mL) and (B) the volumetric ratio of gelatin to chitosan (%). The optimal synthesis parameters for the analyzed responses were determined: swelling capacity and moisture retention, compressive strength, and degree of crosslinking. The physicochemical and morphological properties of the materials loaded with metformin and tramadol (SCG80-20F) were evaluated by scanning electron microscopy (SEM) and Fourier transform infrared spectrometry (FTIR-ATR), thus confirming the formation mechanism of the sponges. The sponges' swelling capacity and moisture retention were evaluated, as well as the water vapor transmission rate (WVTR), the porosity, and the *in vitro* degradation, to determine whether the dressing complies with the adequate properties for healing. Biological tests confirmed that the materials are not cytotoxic and have good antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*. The release profiles showed a sustained release of metformin and tramadol for 12 and 120 h, respectively. Finally, metformin and tramadol's *in vitro* release kinetics followed first-order and Korsmeyer-Peppas kinetics, respectively. The engineered sponge may be a promising dressing for treating burns based on these results.

Keywords: sponge, chitosan, gelatin, metformin, tramadol, burn dressing.

ÍNDICE GENERAL

	Pág
RESUMEN	VII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
CAPÍTULO 1. Introducción	1
CAPÍTULO 2. Marco Teórico.....	3
2.1 La piel.....	3
2.2 Quemaduras	3
2.2.1 Proceso de curación de las quemaduras	5
2.2.2 Infección en la cicatrización de heridas por quemaduras	6
2.2.3 Dolor asociado a las quemaduras	8
2.3 Apósitos como tratamiento para las quemaduras	9
2.3.1 Apósito ideal para el tratamiento de quemaduras	10
2.3.2 Esponjas como apósitos en el tratamiento de quemaduras	11
2.3.3 Polímeros naturales para la elaboración de apósitos	12
2.3.4 Agentes reticulantes.....	15
2.3.5 Funcionalización de apósitos	16
CAPITULO 3. Justificación, hipótesis y objetivos.....	21
3.1 Justificación	21
3.2 Hipótesis	22
3.3 Objetivos.....	22
3.3.1 Objetivo general.....	22
3.3.2 Objetivos específicos	22
CAPITULO 4. Metodología experimental.....	23
4.1 Materiales	23
4.2 Preparación de esponjas de quitosano/gelatina	23
4.2.1 Preparación de las soluciones	23
4.2.2 Elaboración de esponjas de quitosano/gelatina con exopolisacárido <i>Porphyridium purpureum</i> , metformina y tramadol.	24
4.3 Diseño de experimentos.....	24

4.4 Cuantificación de grupos amino y grado de entrecruzamiento.....	26
4.5 Caracterización de los apósitos	26
4.5.1 Caracterización morfológica mediante microscopia electrónica de barrido (SEM)	26
4.5.2 Caracterización química mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR).....	27
4.5.3 Prueba mecánica	27
4.5.4 Capacidad de absorción de agua (hinchamiento)	27
4.5.5 Capacidad de retención de humedad	28
4.5.7 Tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR).....	29
4.5.8 Degradación <i>in vitro</i>	29
4.5.9 Actividad antibacteriana	30
4.5.10 Citotoxicidad <i>in vitro</i>	30
4.5.11 Pruebas de liberación <i>in vitro</i>	31
CAPITULO 5. Resultados.....	32
5.1 Mecanismo de Reacción	32
5.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR)	34
5.3 Diseño de experimentos.....	38
5.3.1 Cuantificación de grupos amina mediante el ensayo de ninhidrina y grado de entrecruzamiento.....	38
5.3.2 Prueba mecánica	41
5.3.3 Capacidad de absorción de agua	44
5.3.4 Capacidad de retención de agua	47
5.4 Apósito ideal.....	50
5.4.1 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier de Reflectancia Total Atenuada (FTIR-ATR).....	51
5.4.2 Caracterización morfológica.....	56
5.4.3 Porosidad	61
5.4.4 Determinación de aminas primarias y grado de entrecruzamiento...	62
5.4.5 Capacidad de absorción de agua	64
5.2.6 Capacidad de retención de agua.....	66
5.2.7 Tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR).....	67
5.4.8 Prueba mecánica	69

5.2.9 Degradación <i>in vitro</i>	70
5.2.10 Actividad Antibacteriana	72
5.2.11 Citotoxicidad <i>in vitro</i>	74
5.2.12 Perfiles de liberación <i>in vitro</i> de metformina y tramadol	75
CAPITULO 6. Conclusiones.....	79
CAPITULO 7. Perspectivas	81
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	91
ANEXO I	91
ANEXO II	92

ÍNDICE DE TABLAS	Pág
Tabla 1. Valores experimentales y niveles codificados de las variables independientes.....	25
Tabla 2. Condiciones de los experimentos totales arrojados por el diseño de experimentos central compuesto.....	25
Tabla 3. Vibraciones características de los componentes puros.....	37
Tabla 4. Grupos amina presentes en los componentes puros.....	39
Tabla 5. Coeficientes de regresión estimados y valores de P del modelo polinomial de segundo orden para el <i>grado de entrecruzamiento</i>	39
Tabla 6. Coeficientes de regresión estimados y valores de P del modelo polinomial de segundo orden para la resistencia a la compresión (MPa).....	42
Tabla 7. Coeficientes de regresión estimados y valores de P del modelo polinomial de segundo orden para la capacidad de absorción de agua (%)......	45
Tabla 8. Coeficientes de regresión estimados y valores de P del modelo polinomial de segundo orden para la capacidad de retención de humedad (%)..	49
Tabla 9. Vibraciones características de los fármacos: metformina y tramadol.	51
Tabla 10. Estructura molecular y propiedades fisicoquímicas de los fármacos cargados a la esponja.....	54
Tabla 11. Magnitud de los poros externos e internos de las esponjas.....	58
Tabla 12. Grupos amino libres en las esponjas.....	62
Tabla 13. Parámetros de ajuste para la liberación de metformina y tramadol en la esponja.....	78
Tabla 14. Curva de calibración de APTES para la determinación de grupos amina.....	91
Tabla 15. Curva de calibración y absortividades de metformina.....	92
Tabla 16. Curva de calibración y absortividades de tramadol.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág
Figura 1. Capas principales de la piel: epidermis, dermis e hipodermis.....	3
Figura 2. Clasificación de las quemaduras de acuerdo con la profundidad de la lesión.....	4
Figura 3. Proceso de cicatrización de heridas.....	5
Figura 4. Disfunción inmune inducida por quemaduras.....	7
Figura 5. Terapia basada en biomateriales en el cuidado de heridas por quemaduras.....	10
Figura 6. Representación esquemática de un apósito ideal.....	11
Figura 7. Estructura química de la quitina y el quitosano.....	13
Figura 8. Estructura química del exopolisacárido de <i>P. purpureum</i> (R=H, galactosa terminal o sulfatos).....	34
Figura 9. Espectros infrarrojos de la esponja sintetizada y sus respectivos sustratos puros.....	36
Figura 10. a) Valores experimentales frente a los valores predichos del modelo de regresión en valores no codificados del grado de entrecruzamiento (%). b) gráfica de superficie de respuesta del grado de entrecruzamiento en valores no codificados.....	40
Figura 11. a) Valores experimentales frente a los valores predichos del modelo de regresión en valores no codificados y b) gráfica de superficie de respuesta en valores no codificados de la resistencia a la compresión (MPa).....	43
Figura 12. a) Valores experimentales frente a los valores predichos del modelo de regresión en valores no codificados del % de absorción de agua. b) gráfica de superficie de respuesta de la capacidad de absorción de agua en valores no codificados.....	46
Figura 13. Capacidad de retención de humedad de las esponjas SCG1-SCG20.....	47
Figura 14. a) Valores experimentales frente a los valores predichos del modelo de regresión en valores no codificados del % de retención de humedad. b) gráfica de superficie de respuesta de la capacidad de retención de humedad en valores no codificados.....	49

	Pág
Figura 15. Espectros infrarrojos de la esponja cargada y sin carga de fármacos y sus respectivos fármacos puros.....	53
Figura 16. Diagrama de especiación de metformina.....	54
Figura 17. Diagrama de especiación de tramadol.....	55
Figura 18. a) Estructura de la esponja SCG80-20 sin carga de fármacos y b) estructura final de la esponja con la carga de fármacos.....	55
Figura 19. Morfología transversal de los diferentes materiales de esponja sintetizados. (x50 de aumento).....	59
Figura 20. Morfología superficial de los diferentes materiales de esponja sintetizados. (x100 de aumento).....	60
Figura 21. Porosidad de las esponjas.....	62
Figura 22. Grado de entrecruzamiento (%) de las esponjas sintetizadas.....	63
Figura 23. Relación de hinchamiento de las esponjas a 2 h.....	65
Figura 24. Capacidad de retención de agua durante 72 h.....	67
Figura 25. Tasa de transmisión de vapor de agua de las esponjas compuestas.....	68
Figura 26. Resistencia a la compresión (MPa).....	70
Figura 27. Degradación <i>in vitro</i> de muestras de esponjas de quitosano/gelatina en medio SBF.....	71
Figura 28. Actividad antibacteriana de las diferentes esponjas.....	73
Figura 29. Pruebas de citotoxicidad MTS <i>in vitro</i> para los diferentes materiales.....	74
Figura 30. Perfiles de liberación.....	77
Figura 31. Curva de calibración de APTES en agua desionizada.....	91

CAPÍTULO 1. Introducción

Durante los últimos años la medicina se ha enfrentado a un número creciente de pacientes que padecen de heridas y quemaduras difíciles de tratar y curar¹. Las quemaduras afectan a una gran parte significativa de la población, que, a nivel mundial, son la cuarta forma más devastadora de trauma². Estas lesiones involucran diferentes grados de gravedad, además, están asociadas con un periodo largo de curación implicando así altos costos de tratamiento para la recuperación del paciente, dolor crónico, problemas mentales y emocionales debido a las cicatrices excesivas perjudicando la calidad de vida de los pacientes³.

Las dificultades en los tratamientos para quemaduras en la piel siempre han sido un problema difícil y se han utilizado muchos métodos diferentes para tratar tales lesiones a nivel local³. Los tratamientos convencionales con vendajes secos, como gasa o algodón absorbente, tiene efectos terapéuticos limitados y requieren cambios repetidos de vendajes, lo que agrava aún más el dolor de los pacientes.

Aunque numerosos apósitos ya están disponibles comercialmente, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevas opciones de tratamiento para el cuidado de heridas para abordar el creciente número de lesiones por quemaduras², por lo que, se requiere de una investigación más profunda teniendo en cuenta la incidencia y los efectos secundarios de las quemaduras. Los principales problemas que acompañan a las lesiones por quemaduras es la exposición a infecciones y el dolor generado por tal lesión, donde se le ha prestado más atención a la prevención de infecciones generadas por microorganismos dejando a un lado el manejo del dolor dado que es complejo y desafiante, que su patrón es muy cambiante debido a el daño de algunos nervios por el calor⁴.

Así mismo, los estudios en la elaboración de tratamientos para quemaduras últimamente se han centrado en algunos principales objetivos, como: una rápida regeneración de la piel para favorecer la cicatrización, la prevención de infecciones, la reducción del dolor inicial y la formación de cicatrices mínimas caminando a un proceso de curación adecuado⁵ en este enfoque se encuentra la medicina regenerativa que se

refiere a la investigación biomédica que se centra en el desarrollo de terapias innovadoras que permiten al cuerpo reemplazar, restaurar y regenerar células, tejidos y órganos dañados o enfermos. Además, combina varios enfoques tecnológicos, incluido el uso de películas solubles, la terapia genética, la ingeniería de tejidos, sustitutos de la piel y biomateriales⁶.

Los biomateriales pueden desempeñar un papel importante porque es posible personalizar con precisión sus propiedades generales. Se han investigado numerosos biomateriales para el desarrollo de tratamientos y aún no se ha descrito ninguno que cumpla con todas las características ideales para tal propósito. Los biopolímeros de origen humano y animal exhiben características bioquímicas que pueden facilitar el proceso de regeneración del tejido. De hecho, se ha demostrado que los biomateriales basados en composiciones de proteínas o polisacáridos pueden promover interacciones con componentes bioquímicos y celulares conduciendo a funciones hemostáticas y al control de la actividad celular⁷.

El uso de estructuras 3D como andamios de soporte es una de las estrategias más aplicada en el tratamiento de lesiones por quemaduras y/o heridas ya que se consideran materiales ideales para la síntesis de apósitos, porque exhiben una estructura tridimensional, que imita la matriz extracelular natural (MEC) y el microambiente celular. Estas lesiones requieren una MEC artificial que permita la infiltración de las células circundantes, ya que la piel humana está compuesta por una capa delgada de MEC que actúa como andamio para los fibroblastos y otras células, vasos sanguíneos, etc⁸. Para la elaboración de una MEC artificial, se utilizan materiales naturales como sintéticos; entre los materiales naturales se incluyen los polipéptidos, colágeno, quitosano y alginatos los cuales muestran baja toxicidad y respuesta inflamatoria crónica⁷.

Finalmente, se ha reportado que el diseño de un apósito ideal para el tratamiento de quemaduras debe de ser capaz de mantener la superficie de la herida en un ambiente húmedo, proporcionar suavidad, flexibilidad, actividad antibacteriana, no citotoxicidad y permeabilidad al agua y al vapor. Además, debe de ser fácil de remover y promover una cicatrización más rápida y completa de la herida⁹.

CAPÍTULO 2. Marco Teórico

2.1 La piel

La piel es el órgano más grande del ser humano que provee la primera barrera protectora contra factores ambientales externos¹⁰; está constituida por tres capas distintas: epidermis, dermis e hipodermis como se ilustra en la figura 1. La epidermis es la parte más superficial y se encuentra constituida por dos grupos de células: queratinocitos o células no dendríticas y células dendríticas, que evita la entrada de microorganismos virulentos y mantiene la hidratación corporal. La capa dermis está formada en gran medida de proteína de colágeno, vasos sanguíneos, glándulas sudorosas, entre otras, que proporcionan una resistencia estructural a la piel; también consiste en una capa delgada de MEC la cual actúa como andamio para los factores de crecimiento y los fibroblastos⁸. La hipodermis está situada inmediatamente por debajo de la dermis y a menudo inseparable de la dermis¹¹; su principal función es soportar y anclar las capas dérmicas y epidérmicas¹².

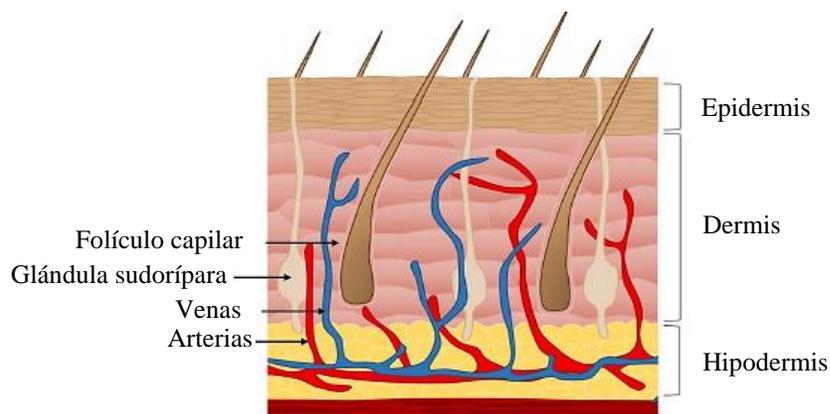


Figura 1. Capas principales de la piel: epidermis, dermis e hipodermis⁸.

2.2 Quemaduras

Las quemaduras son las formas más desarrolladas de lesiones de tejidos blandos que ocasionalmente resultan de heridas cutáneas extensas y profundas que pueden ser ocasionadas por calor, frío, electricidad, agentes químicos, radiación o fricción; según el tejido afectado, la gravedad y las complicaciones resultantes, las lesiones por

quemaduras son muy variables. El 88% de las quemaduras a nivel mundial es ocasionado por llamas o contacto con líquidos calientes o hirviendo¹². Las quemaduras se clasifican comúnmente como de primer grado cuando solo la epidermis está dañada, de segundo grado cuando la epidermis y parte de la dermis están dañadas, de tercer grado cuando la epidermis, toda la dermis y las capas de hipodermis se destruyen por completo y de cuarto grado cuando la lesión se extiende a los tejidos profundos, como músculos, tendones y huesos, y suelen ser letales (ver Figura 2).

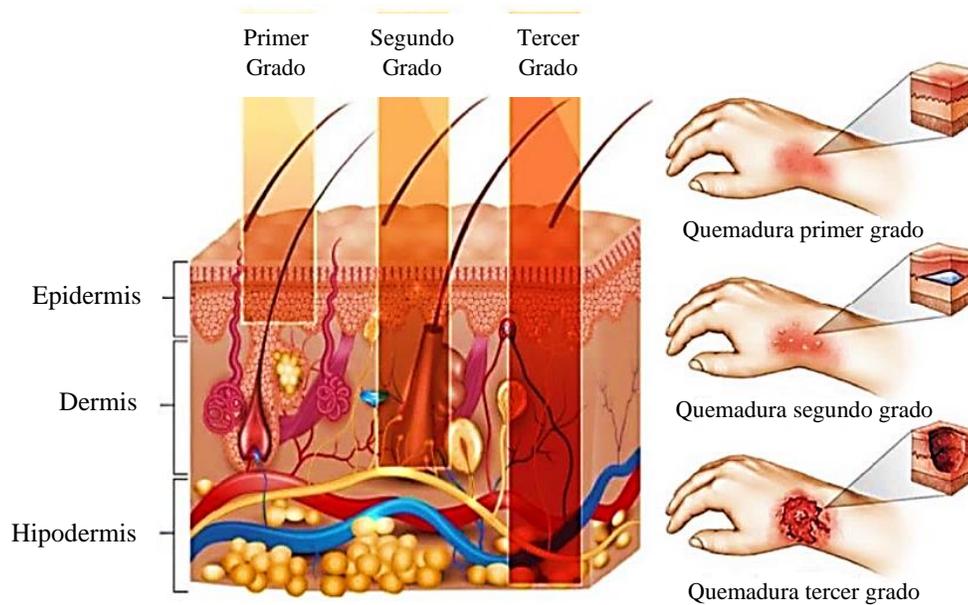


Figura 2. Clasificación de las quemaduras de acuerdo con la profundidad de la lesión².

Las quemaduras de segundo grado pueden dividirse en superficiales y profundas de la dermis, en las quemaduras superficiales de segundo grado, la superficie está húmeda, porque el plasma se escapa del área quemada y se forman menos cicatrices que en las quemaduras dérmicas profundas. En las quemaduras dérmicas profundas, el dolor es más severo y, si se produce una infección, la herida puede convertirse en una quemadura de tercer grado³. Después de la ocurrencia de una quemadura profunda o de tercer grado, el cuerpo puede mostrar una variedad de respuestas, que incluyen cambios de nutrientes y líquidos, desequilibrio electrolítico, insuficiencia respiratoria, insuficiencia orgánica múltiple, insuficiencia cardíaca y supresión del sistema inmunológico¹³.

2.2.1 Proceso de curación de las quemaduras

La curación de este tipo de lesión es un proceso biológico, que consta de cuatro eventos secuenciales, superpuestos e integrados: homeostasis, inflamación, proliferación y remodelación¹³ como se muestra en la figura 3; que promueven y minimizan la cicatrización, además de reducir el riesgo de que se desarrolle una herida crónica que no cicatriza¹⁴.

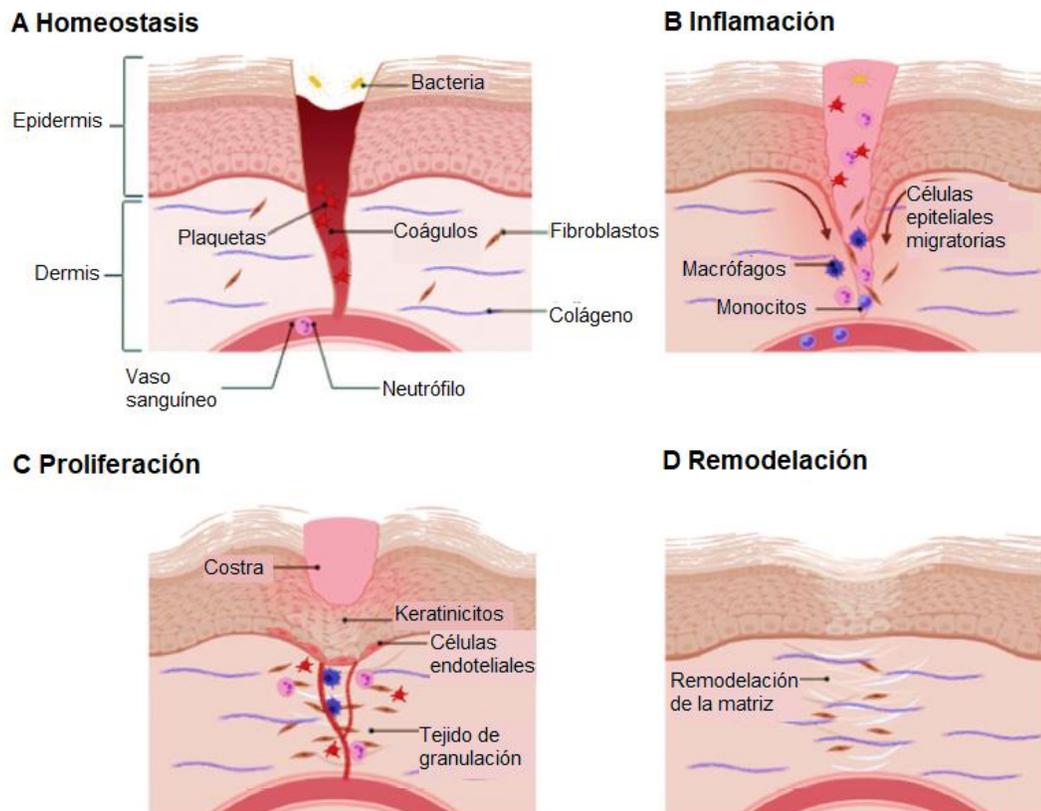


Figura 3. Proceso de cicatrización de heridas: (A) homeostasis, (B) inflamación, (C) proliferación y (D) maduración o remodelación¹³.

La fase de homeostasis ocurre inmediatamente al generarse la herida, las plaquetas coagulan la sangre para detener el sangrado y ocurre la activación inmune, para reducir el daño de los tejidos expuestos al medio ambiente; la fase inflamatoria se presenta 1-3 días después de la imposición de la herida de la quemadura, en ella las células inmunitarias destruyen las bacterias y liberan factores de crecimiento y proteínas provocando la inflamación, dolor y enrojecimiento, que a su vez ayudan en

la eliminación de bacterias, tejido dañado y desechos inflamatorios. La fase proliferativa ocurre de 3 a 10 días después del inicio de la lesión, el tejido de granulación prolifera rápidamente, cubriendo la superficie de la herida mediante tres pasos: angiogénesis (nuevos vasos sanguíneos), formación de tejido de granulación y reepitalización (activación de los factores de crecimiento); creando una matriz de herida provisional (cicatriz). Finalmente, la fase de remodelación tisular, en la que se forma el tejido cicatricial 2-3 semanas después del daño tisular y continua durante un año o más; se restaura la arquitectura normal de la dermis mediante una matriz compuesta de colágeno tipo I^{12,14}.

Estos procesos fisiológicos se pueden ver afectados por varios factores, como el grado de quemadura, la calidad y causa (química o térmica), el estado general en el que se encuentre el paciente (acidosis, abrumador, inmunosupresor), los trastornos o enfermedades asociadas³, las condiciones de humedad alrededor de la herida, la inflamación y las infecciones¹³.

2.2.2 Infección en la cicatrización de heridas por quemaduras

La cicatrización normal de heridas por quemaduras y la regeneración interior de la piel no son siempre adecuadas, especialmente si se producen quemaduras agudas o crónicas. Los problemas que acompañan a las heridas por quemaduras son: pérdida de líquidos y electrolitos, bordes de heridas necrosados y una mayor probabilidad de invasión y multiplicación de patógenos, la presencia de estos microorganismos causa daño tisular local e impide la cicatrización de las heridas y quemaduras¹⁵. La profundización de la herida por infección puede conducir a la pérdida de restos vitales de piel y puede cambiar una herida que cicatriza en una que no sana¹⁶, siendo la principal causa de muerte en estos pacientes.

La lesión provocada por quemaduras provoca la pérdida de la integridad de la piel, las mucosas y el endotelio, así como la regulación positiva y la eventual disfunción del sistema inmunitario dejando a los pacientes altamente susceptibles a la infección, propagando el compromiso inmunológico como se muestra en la Figura 4.

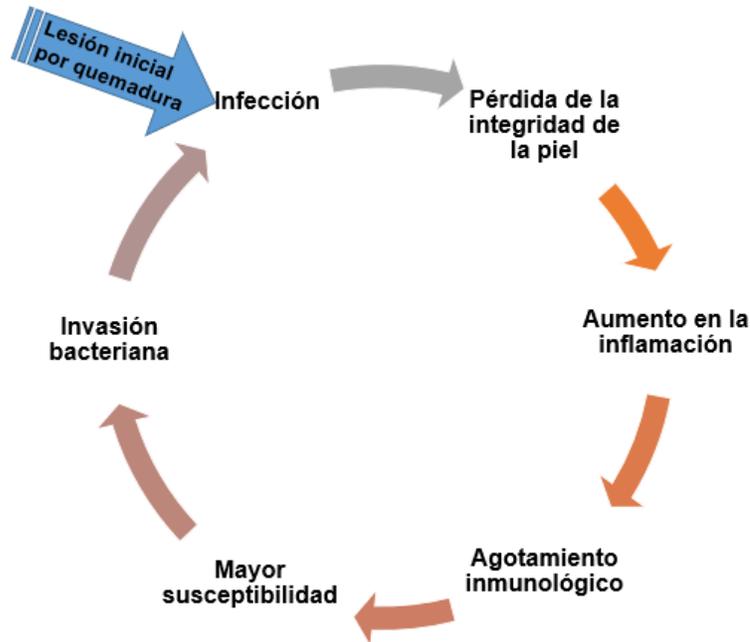


Figura 4. Disfunción inmune inducida por quemaduras¹⁷.

Staphylococcus aureus y *Streptococcus pyogenes* (bacterias gram-positivas) son patógenos colonizadores identificados con mayor frecuencia que influyen en las fases iniciales (durante las primeras 48 h) de cicatrización de heridas y quemaduras, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (bacterias gram-negativas) se encuentran típicamente en las últimas etapas del proceso infeccioso, cuando se desarrollan las heridas crónicas afectando las capas más profundas de la piel¹⁸. Las bacterias gram-negativas tienen una membrana externa que contiene lipopolisacáridos proporcionando propiedades hidrofílicas en la superficie, que sirve como una barrera contra macromoléculas y toxinas hidrofóbicas. Para las bacterias gram-positivas, su superficie consta de peptidoglicanos y ácido teicoico, que hacen que muchas enzimas unidas en la membrana funcionen¹⁹.

La producción de una biopelícula en la matriz extracelular generada por la adhesión y proliferación de estas bacterias protege a los microorganismos contra los antibióticos convencionales, provocando mecanismos de resistencia a los antibióticos sistemáticos en el proceso del tratamiento para tratar la infección²⁰. Una atención insuficiente para las infecciones generadas puede llevar a pérdida de tejidos blandos, amputación de una extremidad e incluso la muerte como ya se mencionó⁹. Por esta razón, se han

realizado numerosos esfuerzos para aumentar la actividad antimicrobiana de una amplia gama de agentes terapéuticos aplicados tópicamente en la quemadura, lo que facilita la desinfección en los sitios de la herida, además de mejorar los procesos de curación y los mecanismos de regeneración de tejidos¹².

2.2.3 Dolor asociado a las quemaduras

Los pacientes con quemaduras sufren dolor, y el enfoque principal de los médicos incluye el manejo del dolor e infecciones. Existen diversos estudios para tratar las heridas por quemaduras previniendo infecciones mediante medicamentos, sin embargo, se ha prestado menos atención a los requisitos del manejo del dolor. El dolor asociado a las quemaduras es complejo y desafiante debido a su patrón cambiante, ya que algunos nervios se dañan debido al calor⁴. Un mal control del dolor aumenta la incidencia del dolor crónico y la depresión que, a su vez, puede provocar miedo, ansiedad, estrés, cumplimiento deficiente de terapias de rehabilitación y una mayor percepción de dolor⁴.

El dolor se percibe en el momento y lugar de la quemadura, debido a la estimulación de los nociceptores locales y la transmisión del impulso nervioso de las fibras, transmitiendo así el mensaje de dolor a la asta dorsal de la médula espinal. La magnitud del impulso está modulada por entradas sensoriales, la percepción del dolor ocurre cuando el impulso resultante es transmitido hacia el cerebro y hacia áreas conocidas colectivamente como la matriz del dolor²¹. La evolución dinámica del dolor por quemadura tanto a nivel central como periférico, y los muchos factores que influyen en la percepción del dolor ilustran la necesidad de un plan terapéutico que sea igualmente dinámico y lo suficientemente flexible para hacer frente a las facetas del dolor. La vía convencional para la administración de fármacos, para controlar el dolor, es mediante inyección o vía oral, que requiere más fármaco para una acción eficaz en comparación con la aplicación en el sitio local debido a una menor disponibilidad en la ubicación requerida de la herida. Por lo tanto, los apósitos cargados de analgésicos podrían disminuir los efectos secundarios asociados con las rutas administrativas de los analgésicos convencionales⁴.

2.3 Apósitos como tratamiento para las quemaduras

Un apósito es un material empleado para cubrir y proteger una lesión, su uso consiste en suministrar alivio al dolor, actuar como barrera frente a la infección, absorber el exudado que ésta produce, permitir una adecuada circulación sanguínea y optimizar el proceso de cicatrización²². El uso de apósitos para el tratamiento de heridas y quemaduras se ha practicado durante mucho tiempo y han pasado por un proceso evolutivo desde materiales que simplemente cubrían la herida hasta materiales que mantenían un ambiente favorable para la hidratación de la herida (ver Figura 5), tales como: gasas, películas, tiritas, vendajes naturales o sintéticos, algodón, hidrogeles, hidrofibras, esponjas, etcétera²³.

Muchas estrategias han sido desarrolladas para la cicatrización de heridas, una de estas es el estudio actual de una amplia variedad de apósitos para las quemaduras basados en biomateriales con la capacidad de reconstruir el órgano¹³, estos materiales deben de poseer tres características básicas de biocompatibilidad, biodegradabilidad y bioactividad¹⁵. Durante el proceso de cicatrización de las quemaduras, los apósitos se utilizan para la regeneración y reparación de tejidos dérmicos y epidérmicos¹.

En consecuencia, producir un apósito para el tratamiento de las quemaduras es muy importante, dicho material debe de ser capaz de regenerar rápidamente la piel para favorecer el proceso de cicatrización, reducir el dolor y prevenir la formación de cicatrices de capa gruesa, además de que sea renovable, amigable con el medio ambiente y rentable, esto puede ayudar significativamente a los pacientes con quemaduras ligeras y severas²⁴.

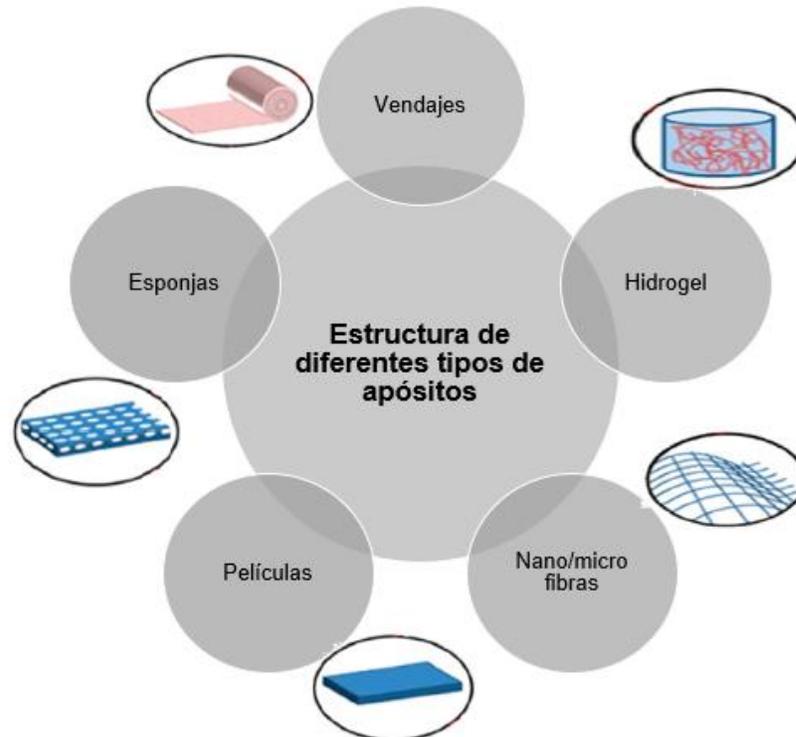


Figura 5. Terapia basada en biomateriales en el cuidado de heridas por quemaduras.

2.3.1 Apósito ideal para el tratamiento de quemaduras

En el 2012, algunos investigadores realizaron una encuesta a nivel mundial entre médicos sobre las propiedades de un vendaje para heridas por quemaduras ideal²⁵. Se encontró que se requiere un andamio poroso con buena resistencia mecánica para funcionar como apósito y guía en la adhesión celular y tisular, extensión y proliferación, estas matrices contienen moduladores celulares y moleculares que estimulan la cicatrización¹. Debe de poseer una alta capacidad de mantener húmeda la interfaz de la herida, mejorar la migración epidérmica, absorber líquidos, una adecuada permeabilidad al agua y oxígeno, biocompatibilidad, propiedades antibacterianas para proteger el defecto de la piel de infecciones, deshidratación y daño tisular, flexible, no adhesivo para que se pueda retirar fácilmente sin traumatismo, cómodo, y rentable⁹.

El uso de estructuras 3D como andamios de soporte es una de las estrategias más aplicada ya que se consideran materiales ideales para la síntesis de apósitos, porque exhiben una estructura tridimensional, que imita la MEC y el microambiente celular.

Estas lesiones requieren una MEC artificial que permita la infiltración de las células circundantes, ya que la piel humana está compuesta por una capa delgada de MEC que actúa como andamio para los fibroblastos y otras células, vasos sanguíneos, etc⁸.

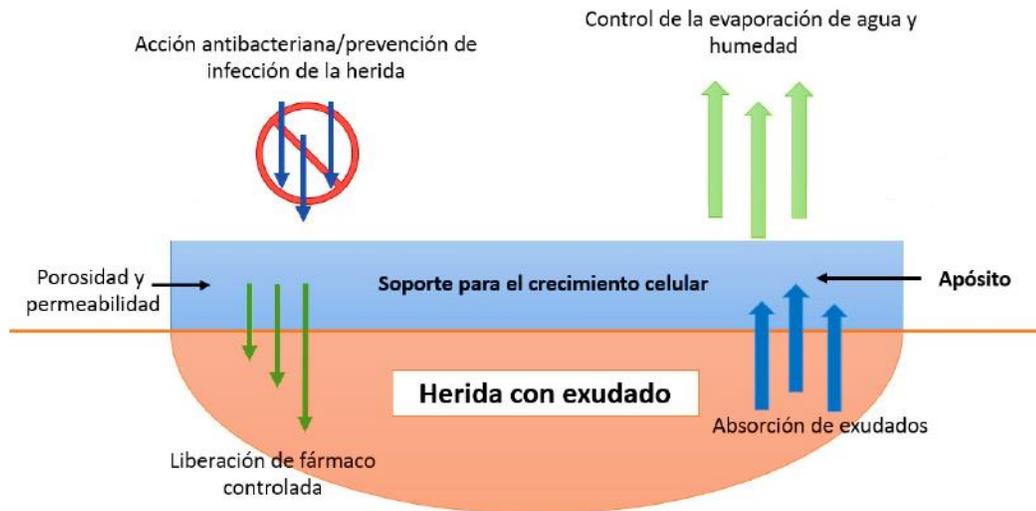


Figura 6. Representación esquemática de un apósito ideal²⁶.

2.3.2 Esponjas como apósitos en el tratamiento de quemaduras

Las esponjas forman una estructura tridimensional de canales interconectados con alta porosidad, capaces de absorber gran cantidad de fluidos, además, presentan una buena interacción celular, siendo suaves y flexibles, proporcionando así excelentes matrices para las zonas de las heridas de quemaduras adsorbiendo con facilidad los exudados y ayudando a la regeneración de los tejidos mediante la estimulación de los factores de crecimiento²⁷. Estos materiales suelen ser funcionalizados con fármacos o polisacáridos para tratar la herida a nivel local, con la finalidad de controlar el dolor y las infecciones²⁸. Estas características propias de las esponjas hacen que sean materiales prometedores como apósitos en el tratamiento de quemaduras, ya que allanan el camino para la migración y proliferación de las células epidérmicas en la superficie de la herida, además de acelerar la cicatrización mediante la formación de tejido de granulación²⁹. Las ventajas de usar esponjas son la retención de la atmósfera húmeda, la alta capacidad de hinchamiento y la cicatrización de la herida con reducción de cicatrices³⁰.

Diversos investigadores han estudiado las esponjas como apósitos para el tratamiento de quemaduras y entre los resultados encontrados destaca el tratamiento de quemaduras profundas III y IV grado con una esponja de colágeno, donde se observó la mejora en el microambiente local, una herida limpia, la formación de tejidos capilares y el aceleramiento del tejido granular²⁹. Otro trabajo demuestra el uso de una esponja a base de queratina y alginato para quemaduras de espesor parcial que mostró la capacidad de inducir la formación de MEC, una reepitalización y un cierre de la herida más rápidos que otros tratamientos evaluados³¹.

2.3.3 Polímeros naturales para la elaboración de apósitos

La fabricación de materiales bioactivos a base de polímeros naturales ha sido utilizada para la curación de heridas y quemaduras, llamando la atención principalmente por ser biocompatibles, biodegradables y su similitud con la MEC¹. Los biopolímeros o polímeros naturales son moléculas orgánicas sintetizadas por los organismos vivos, estructuralmente son una secuencia de unidades/monómeros repetitivos de aminoácidos, monosacáridos, nucleótidos o ésteres³². Algunos biopolímeros poseen propiedades emolientes, epitelizantes, astringentes, antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes que inducen y estimulan el proceso de cicatrización, intervienen en la reparación de los tejidos dañados y, en consecuencia, en la regeneración de la piel.

En este sentido, los materiales más prometedores para el apósito de heridas y quemaduras están basados en polisacáridos (alginatos, quitina, quitosano, etc.) y proteínas (colágeno, fibrina, queratina, membrana de la cáscara de huevo) ya que proporcionan un ambiente óptimo para la proliferación, migración y diferenciación celular, mejorando el tratamiento de quemaduras de espesor parcial¹. Diversos estudios se han centrado en la elaboración de andamios, hidrogeles, esponjas, membranas o películas a base de quitosano y/o gelatina para el cuidado de quemaduras en diferentes situaciones que cumplen con los requisitos mencionados anteriormente, como el de evitar que la herida se infecte y se deshidrate³³.

Quitosano

El quitosano es un biopolímero con propiedades antibacterianas intrínsecas y se obtiene de la quitina de camarones y cangrejos a partir de la desacetilación en medio alcalino de la quitina y el grado de desacetilación determina las propiedades fisicoquímicas y biológicas del quitosano. Algunas de estas propiedades son la biodegradabilidad, biocompatibilidad, antigenicidad, no toxicidad y efectos antimicrobianos el cual se atribuye a su grupo amino cargado positivamente (*figura 7*) a un pH inferior de 6.3, esta carga positiva interactúa con las cargas negativas que tienen las bacterias en su pared celular, provocando su ruptura y, en consecuencia, la pérdida de constituyentes celulares¹⁵.

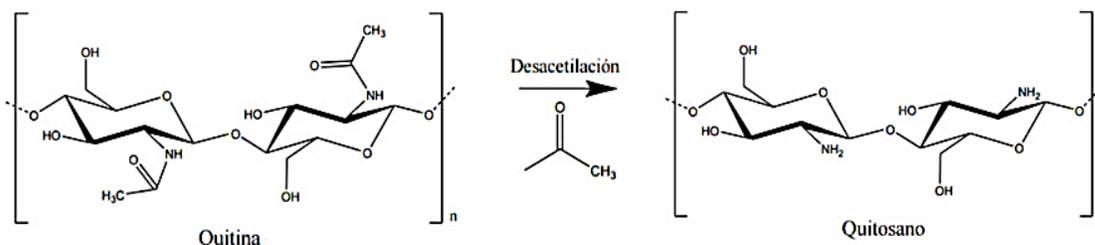


Figura 7. Estructura química de la quitina y el quitosano.

Aparte de las actividades antibacterianas y antifúngicas, el quitosano ha demostrado en diversos apósitos actividades de proliferación celular esenciales en las diferentes etapas de cicatrización de heridas por quemaduras³², dando los mejores resultados con relación a la unión y la proliferación celular tanto de condrocitos y queratinocitos³⁴, con el soporte necesario auxiliar en la rápida y completa cicatrización³⁵ debido a la formación de una matriz que imita de manera eficaz la MEC de varios tejidos.

El uso de apósitos para heridas y quemaduras es una de las aplicaciones médicas más prometedoras del quitosano, debido a su naturaleza adhesiva y a su permeabilidad al oxígeno en conjunto con su carácter bactericida y antifúngico²⁸. Varios apósitos a base de quitosano también están disponibles comercialmente, Dextatic, tiene actividades hemostáticas y antimicrobianas. Opticell, se utiliza para heridas de espesor parcial y total, quemaduras de primer y segundo grado, úlceras de

pie diabético y heridas quirúrgicas³². No obstante, aún y con todas las propiedades que posee, la aplicación en la ingeniería de tejidos es restringida por su inherente sensibilidad al agua, baja estabilidad térmica y propiedades mecánicas relativamente débiles, especialmente en ambientes húmedos²⁸. Por esta razón, se han utilizado materiales compuestos para compensar las limitaciones del quitosano incorporando otros materiales para desarrollar un material de ingeniería de tejidos adecuado³³ con propiedades mecánicas mejoradas y otras características deseadas; la modificación del quitosano con otros biopolímeros tiene un efecto sobre la propiedad bacteriostática y hemostática del apósito, mostrando así resultados prometedores en la cicatrización de quemaduras³².

Gelatina

La Gelatina es un polímero natural muy conocido en la ciencia de los biomateriales derivado de la hidrólisis del colágeno con estructura triple hélice, se utiliza en el área biomédica para la producción de sistemas de administración de fármacos y apósitos para heridas no tóxicos, biocompatibles y biodegradables²⁸. Dentro de sus características que atraen su atención destacan la interactividad celular, no inmunogenicidad, su solubilidad en agua, disponibilidad, bajo costo, su facilidad a manejar y su afinidad con varios polímeros³⁶. Tiene una composición y propiedades biológicas casi idénticas a las del colágeno humano, lo que hace que sea capaz de imitar naturalmente la MEC de los tejidos y órganos humanos³⁷.

En los últimos años, la gelatina ha sido utilizada ampliamente en la ingeniería de tejidos como agente principal en varios biomateriales para la regeneración de tejido de piel, debido a sus propiedades de adherencia, proliferación y propagación de fibroblastos y queratinocitos, ayudando de esta manera a mejorar la cicatrización de heridas²⁸. Una gran variedad de apósitos con gelatina han sido desarrollados observando una buena capacidad de absorción de exudados y de retención de humedad, ha arrojado buenos resultados en pruebas de proliferación de fibroblastos in vitro, regeneración de la piel e imitar a la MEC^{28,37}.

Hasta la fecha solo se encuentran disponibles comercialmente dos apósitos para heridas a base de quemaduras, y estos son Gelfoam y Surgifoam compuestos de gelatina porcina y colágeno; adoptan una forma de esponja comprimida y esponja respectivamente. Estos materiales muestran efectos hemostáticos sobresalientes, sin embargo, sufren deficiencias que quedan por resolver³⁶. El rápido tiempo de degradación, la superficie sumamente hidrofílica y su baja eficacia antibacteriana convierte a la gelatina en un biopolímero inapropiado para tal uso, sin embargo, si se combina con otros polímeros o bien se retícula ofrece excelentes características de apósitos para heridas mejorando su rendimiento mecánico, su estabilidad y su poder antibacteriano³⁶.

2.3.4 Agentes reticulantes

La reticulación de diversos biopolímeros suele realizarse con glutaraldehído, genipina, tripolifosfina, carbodiimidas, etc. El glutaraldehído es un potente reticulante del quitosano, debido a su gran número de grupos amina, sin embargo, ha mostrado un cierto grado de toxicidad³⁸. Recientemente, el ácido cítrico ha sido ampliamente explorado como reticulante iónico debido a sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes, biodegradables y a su excelente biocompatibilidad³⁹.

El ácido cítrico es un intermediario en el metabolismo humano, siendo una materia prima renovable que se produce comercialmente por la fermentación de sacarosa o glucosa, a partir de fuentes como la batata o de la pulpa de madera⁴⁰. Tiene la capacidad de fabricar materiales con alta resistencia y capacidad antimicrobiana, mediante reticulación covalente por medio de la reacción de amidación entre los grupos amino y carboxilo con ayuda de un activador químico que activa los grupos carboxilo del ácido cítrico³⁹.

2.3.5 Funcionalización de apósitos

Los apósitos suelen ser funcionalizados con fármacos o polisacáridos que ayudan a combatir el dolor, las infecciones y a acelerar el proceso de cicatrización mediante la liberación de estos de forma controlada con una concentración óptima, permitiendo la administración transdérmica de moléculas bioactivas. La red formada por las esponjas permite atrapar y transportar moléculas bioactivas, antibióticos, analgésicos y otras moléculas farmacéuticas al lecho de la quemadura. Mediante un proceso de liberación sostenida, las moléculas atrapadas migran desde la red polimérica al lecho de la herida o quemadura, cambiando de lugar con el exudado⁴¹.

La administración tópica es la ruta preferida para la administración local de agentes terapéuticos debido a que evade el primer paso hepático, las variaciones del pH gástrico y las fluctuaciones en los niveles plasmáticos, que se encuentran con frecuencia cuando un fármaco se administra vía oral⁴². La aplicación localizada de fármacos en un área específica de la herida tiene muchas ventajas y menos efectos secundarios en comparación con otras vías de administración de fármacos.

Se han utilizado varios fármacos para tratar el dolor, acelerar la cicatrización y prevenir infecciones en las quemaduras entre los cuales destacan: gabapentina (analgésico nervioso potente), acetaminofén (dolor leve), morfina⁴, lidocaína, metadona, meperidina, lorazepam, tramadol o combinaciones de estas drogas⁴³. Dentro de estos antibióticos que además ayudan a la cicatrización se encuentran la piperacilina, gentamicina, daptomicina, clorhexidina, tetraciclina, ciprofloxacina, sulfadiazina, metformina, entre otros, que inhiben el crecimiento de patógenos¹⁸. Estos fármacos interfieren con una función característica de la estructura de las bacterias o en sus vías metabólicas a través de uno de los siguientes mecanismos: 1) inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana; 2) bloqueo de vías metabólicas clave; 3) interferencia en la síntesis de proteínas; e 4) inhibición de la síntesis de ácidos nucleico²³. El uso de tramadol y metformina para el tratamiento de heridas o quemaduras ha despertado un gran interés debido a sus propiedades, las cuales son discutidas más adelante.

En cuanto a los polisacáridos, son polímeros de carbohidratos de alto peso molecular producidos por microorganismos como, bacterias, hongos, levaduras y microalgas. Las microalgas que contienen sulfatos en su estructura se han considerado como una fuente importante de polisacáridos, poseen una amplia variedad de actividades biológicas, destacando actividades antibacterianas, antioxidantes, antivirales, antiinflamatorias, antitumorales, anticancerígenas, antidiabéticas anticoagulantes e inmunomoduladoras⁴⁴; tal es el caso de la microalga *P. purpureum*.

Tramadol

El tramadol es un potente analgésico de acción central que ofrece muchas ventajas sobre los opioides convencionales y antiinflamatorios no esteroideos, lo que lo hace un valioso tratamiento de dolor neuropático en pacientes con quemaduras, ya que alivia el dolor y proporciona una sedación leve⁴⁵. Dos mecanismos principales contribuyen a los efectos analgésicos del tramadol: la activación de los receptores opioides μ y el bloqueo de la recaptación de serotina y noradrenalina⁴⁶. Aunque no es un opioide nuevo, el tramadol ha sido recientemente redescubierto y ampliamente utilizado; esto puede deberse a su exclusivo mecanismo de acción dual. Es un fármaco fácilmente soluble que tiene una vida media corta y, en consecuencia, requiere una alta frecuencia de administración. El tramadol se absorbe rápidamente después de la administración oral; el efecto analgésico máximo ocurre de 1 a 4 horas después de la administración del fármaco, y la analgesia persiste solo durante 3 a 6 horas⁴⁷. Así, una formulación juiciosa es crucial para optimizar el efecto clínico del tramadol.

La administración transdérmica es una nueva modalidad de administración de tramadol que ofrece una doble oportunidad adicional a todas sus ventajas, superar el inconveniente del sabor de la droga, disminuir cualquier posible abuso y el potencial de adicción al evitar parcialmente la formación de metabolito M1 al evitar los niveles plasmáticos máximos y mínimos, y al reducir la cantidad total de entrada de medicación⁴⁸. Además, una formulación de tramadol de acción prolongada puede mejorar más su eficacia general y el cumplimiento de proporcionar analgesia las 24 horas del día.

Un estudio donde se comparó la administración oral y transdérmica mediante un hidrogel, mostro un sistema de administración flexible y amigable para el paciente, permitiendo obtener rendimientos versátiles. Mejora la aceptación de la droga y se evaden algunos efectos secundarios gastrointestinales⁴⁸.

Metformina

La metformina, una biguanida, es un fármaco hidrófilo debido a su solubilidad en agua, que ha recibido especial atención recientemente. Se ha conocido como un fármaco hipoglucemiante (inhibición de producción de glucosa en el hígado) para la diabetes tipo 2 en humanos durante muchos años⁴⁹. También ha cobrado interés en el tratamiento de quemaduras para el control a largo plazo de glucemia, reduciendo los niveles de glucosa sérica y aumentando la síntesis de proteínas y por ende el aumento de la proliferación de células progenitoras del músculo⁵⁰, además de reducir la inflamación de las heridas. El tiempo de acción de la metformina comienza aproximadamente 3 horas después de tomar el medicamento con una vida media de 20 horas.

La mayoría de los estudios sobre metformina se han correlacionado con el uso oral e inyectable, algunos informes sobre la aplicación tópica de metformina al tejido de la piel tienen como objetivo reducir el nivel de glucosa en la sangre y aumentar la cicatrización de heridas en pacientes diabéticos. Sin embargo, el estudio de la aplicación tópica de metformina se ha analizado pobremente para reducir y prevenir la formación de cicatrices en la piel⁴⁹. Estudios recientes han demostrado que los tratamientos tópicos que involucran metformina tienen un papel importante en la cicatrización de heridas mediante la regulación de alguna vía de señalización que afecta la polarización de los macrófagos⁵¹, acelera la cicatrización de la herida estimulando la angiogénesis, disminuye la tasa de infección y mejora la supervivencia⁵². Estas ventajas lo convierten en una alternativa atractiva para el tratamiento a largo plazo de pacientes con quemaduras.

Porphyridium purpureum

Las microalgas presentes en ambientes marinos y de agua dulce son microorganismos unicelulares, microscópicos y fotosintéticos. La rápida tasa de proliferación, la alta actividad fotosintética, el secuestro de CO₂, la producción de biomasa y la capacidad de crecer en aguas residuales⁵³ hacen de las algas una de las fuentes más prometedoras de nuevos compuestos bioactivos para aplicaciones biomédicas, la industria alimentaria y cosmética⁵⁴. *Porphyridium purpureum* (*P. purpureum*) también conocida como *Porphyridium cruentum* es una especie de algas rojas marinas de la familia *Porphyridiophyceae*⁵⁵ con un alto peso molecular (2.3 x 10⁶ g/mol) y está cargado negativamente (aniónico) debido a la presencia de ácido glucurónico y grupos sulfato de semiéster en diferentes concentraciones⁵⁶(7.6-14.6 %)⁵⁷.

Esta microalga permite la producción de exopolisacáridos sulfatados⁵⁷, los cuales en los últimos años han recibido una gran atención debido a que son una excelente materia prima para fármacos, su carga negativa hace que presente bioactividades antiinflamatorias, antioxidantes y antivirales, siendo este último atribuido a su grupo sulfato⁵⁵. Los compuestos bioactivos de las microalgas actúan alterando las actividades enzimáticas, regulando las actividades celulares y dirigiéndose a las primeras vías de señalización relacionadas con la inflamación ocasionadas por las especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen daño celular⁴⁴. Inhiben las infecciones por diferentes virus al no permitir la penetración de partículas virales en células huésped, pero también pueden estar involucrados otros mecanismos, como la inhibición de la unión/adsorción, o incluso la replicación durante las primeras fases del ciclo del virus, sin ninguna toxicidad para las células huésped⁵⁷.

El uso de exopolisacáridos en la elaboración de apósitos permite proteger la herida de infecciones, además de participar activamente en el proceso de cicatrización y por su alta capacidad de absorción de agua puede mantener un ambiente húmedo en la herida⁵⁸.

La búsqueda y el desarrollo de nuevas terapias o tecnologías rentables para la cicatrización de quemaduras y heridas es muy importante, enfocándose principalmente en el uso de biopolímeros. Por tanto, se propone trabajar en el diseño de un apósito en forma de esponja para el tratamiento de quemaduras, dicho material será elaborado a base de quitosano y gelatina, para posteriormente funcionalizarlas con elementos bioactivos de la microalga *Porphyridium purpureum* y fármacos modelos como lo es tramadol y metformina, que ayuden al control del dolor y la cicatrización de las quemaduras de forma adecuada previniendo infecciones.

CAPITULO 3. Justificación, hipótesis y objetivos

3.1 Justificación

La incidencia y prevalencia de heridas y quemaduras han aumentado considerablemente en la población provocando un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes causando complicaciones físicas y socioeconómicas. Actualmente, las quemaduras son el cuarto tipo de lesión más común en todo el mundo, 300,000 personas mueren cada año en países de ingresos medianos y bajos debido a heridas crónicas y quemaduras⁵⁹. Los apósitos para heridas convencionales, como las gasas de algodón, muestran efectos de recuperación limitados en el tratamiento de las quemaduras, ya que no pueden proporcionar un entorno húmedo adecuado para la cicatrización. Las heridas por quemaduras dan lugar a respuestas inflamatorias graves y, a menudo, provocan lesiones secundarias graves cuando se utilizan apósitos para heridas convencionales.

Los costos de tratamientos para las quemaduras son relativamente altos evitando que se renueven con mayor frecuencia por lo que se requiere de la investigación y desarrollo de nuevos materiales para su tratamiento. Diversos estudios han demostrado que los apósitos elaborados a base de quitosano y gelatina podrían mostrar excelentes propiedades biomédicas; ayudando considerablemente a las diferentes etapas de cicatrización de la herida por quemadura⁶⁰⁻⁶². Por ello se utilizarán estos materiales como base para la elaboración de un apósito en forma de esponja debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, rentabilidad, actividad antimicrobiana y por su capacidad en ayudar significativamente en el proceso de cicatrización de quemaduras, se funcionalizarán con metformina la cual activa los factores de crecimiento, tramadol como un controlador de dolor y sedante, y con el exopolisacárido de la microalga *P. purpureum* que es un excelente agente antimicrobiano debido a los sulfatos en su estructura.

3.2 Hipótesis

La incorporación de gelatina a los apósitos elaborados a base de quitosano permitirá la modificación de sus propiedades fisicoquímicas, morfológicas y biológicas, formando una estructura polimérica tridimensional necesaria para sistemas de acarreo y dosificación de metformina, tramadol y *P. purpureum*. La matriz polimérica final presentará excelentes propiedades biocompatibles, biodegradables, bioactivas, no tóxicas y antimicrobianas; con el fin de obtener el apósito ideal para el tratamiento de quemaduras.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo general

Desarrollar un bioapósito con base en quitosano/gelatina impregnado con tramadol, metformina y exopolisacárido *P. purpureum*, y evaluar sus propiedades fisicoquímicas, morfológicas, mecánicas y biológicas para determinar su potencial como vehículo terapéutico para la regeneración de tejido en quemaduras en la piel.

3.3.2 Objetivos específicos

- Realizar un diseño de experimentos para la síntesis de esponjas quitosano/gelatina (SCG) y determinar los parámetros de síntesis adecuados en base a las propiedades mecánicas, morfológicas y fisicoquímicas deseables para la aplicación.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas, morfológicas y mecánicas de las esponjas quitosano/gelatina.
- Impregnar las esponjas seleccionadas con los fármacos modelo (tramadol, metformina y/o bioactivos de microalgas).
- Evaluar la porosidad, permeabilidad, capacidad de retención y absorción de agua de las esponjas quitosano/gelatina/fármaco.
- Evaluar los perfiles de liberación *in vitro* y cinética de tramadol y metformina.
- Determinar la actividad antimicrobiana y citotoxicidad *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mogoşanu, G. D. & Grumezescu, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int J Pharm* **463**, 127–136 (2014).
2. Stoica, A. E., Chircov, C. & Grumezescu, A. M. Hydrogel dressings for the treatment of burn wounds: An up-to-date overview. *Materials* **13**, 1–24 (2020).
3. Oryan, A., Alemzadeh, E. & Moshiri, A. Burn wound healing: present concepts, treatment strategies and future directions. *J Wound Care* **26**, 5–19 (2017).
4. Abid, S., Hussain, T., Nazir, A., Zahir, A. & Khenoussi, N. A novel double-layered polymeric nanofiber-based dressing with controlled drug delivery for pain management in burn wounds. *Polymer Bulletin* **76**, 6387–6411 (2019).
5. Udeanu, D. I. *et al.* Anti-inflammatory drug-loaded biopolymeric spongy matrices with therapeutic perspectives in burns treatment. *Farmacia* **66**, 783–790 (2018).
6. Dieckmann, C., Renner, R., Milkova, L. & Simon, J. C. Regenerative medicine in dermatology: Biomaterials, tissue engineering, stem cells, gene transfer and beyond. *Experimental Dermatology* **19**, 697–706 (2010).
7. Ambrosio, L. The role of biomaterials in burn treatment. *Burns and Trauma* **2**, 150–152 (2014).
8. Murray, R. Z., West, Z. E., Cowin, A. J. & Farrugia, B. L. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma* **7**, (2019).
9. Patil, P. P., Reagan, M. R. & Bohara, R. A. Silk fibroin and silk-based biomaterial derivatives for ideal wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* **164**, 4613–4627 (2020).
10. Zhang, S. *et al.* Application status and technical analysis of chitosan-based medical dressings: a review. *RSC Advances* **10**, 4308–34322 (2020).
11. Cribier, B. Histología de la piel normal y lesiones histopatológicas elementales. *EMC - Dermatología* **55**, 1–14 (2021).
12. Mofazzal Jahromi, M. A. *et al.* Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews* **123**, 33–64 (2018).
13. Hosseini, M. & Shafiee, A. Engineering Bioactive Scaffolds for Skin Regeneration. *Small* **17**, (2021).
14. Martin, C. *et al.* Current trends in the development of wound dressings, biomaterials and devices. *Pharm Pat Anal* **2**, 341–359 (2013).

15. Alonzo-de la Rosa, C. M. *et al.* Synthesis and characterization of a polymeric network made of polyethylene glycol and chitosan as a treatment with antibacterial properties for skin wounds. *J Biomater Appl* **35**, 274–286 (2020).
16. Middelkoop, E. *et al.* Porcine wound models for skin substitution and burn treatment. *Biomaterials* **25**, 1559–1567 (2004).
17. Salyer, C. E. *et al.* Novel Therapeutics for the Treatment of Burn Infection. *Surg Infect (Larchmt)* **22**, 113–120 (2021).
18. Naskar, A. & Kim, K. S. Recent advances in nanomaterial-based wound-healing therapeutics. *Pharmaceutics* **12**, (2020).
19. Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Ž. & Leitgeb, M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules* vol. **24**, (2019).
20. Souto, E. B. *et al.* New nanotechnologies for the treatment and repair of skin burns infections. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, (2020).
21. Richardson, P. & Mustard, L. The management of pain in the burns unit. *Burns* **35**, 921–936 (2009).
22. Benedí, J. & Romero, C. *Farmacia Espacio de Salud Apósitos Revisión FORMACIÓN CONTINUADA 52 Farmacia Profesional*. (2006).
23. Oliveira, A., Simões, S., Ascenso, A. & Reis, C. P. Therapeutic advances in wound healing. *Journal of Dermatological Treatment* **33**, 2–22 (2022).
24. Naghshineh, N., Tahvildari, K. & Nozari, M. Preparation of Chitosan, Sodium Alginate, Gelatin and Collagen Biodegradable Sponge Composites and their Application in Wound Healing and Curcumin Delivery. *J Polym Environ* **27**, 2819–2830 (2019).
25. Yao, Y., Zhang, A., Yuan, C., Chen, X. & Liu, Y. Recent trends on burn wound care: Hydrogel dressings and scaffolds. *Biomaterials Science* **9**, 4523–4540 (2021).
26. Valencia-Gómez, L. E., Martel-Estrada, S. A., Vargas-Requena, C. L., Rodríguez-González, C. A. & Olivas-Armendariz, I. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica* **37**, (2016).
27. Ahmed, S. & Ikram, S. Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing. *Achievements in the Life Sciences* **10**, 27–37 (2016).
28. Valencia-Gómez, L. E., Martel-Estrada, S. A., Vargas-Requena, C. L., Rodríguez-González, C. A. & Olivas-Armendariz, I. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomedica* **37**, (2016).

29. Cai, J., Jiang, D. & Zang, W. Analysis of the Curative Effect and Influencing Factors of Collagen Sponge Combined with Autologous Skin Graft in the Treatment of Deep Burn Patients. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* **2021**, (2021).
30. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. v. & Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances* **29**, 322–337 (2011).
31. Moay, Z. K. *et al.* Keratin-alginate sponges support healing of partial-thickness burns. *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
32. Sahana, T. G. & Rekha, P. D. Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular Biology Reports* **45**, 2857–2867 (2018).
33. Han, F. *et al.* Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *Int J Pharm* **476**, 124–133 (2014).
34. Ye, H., Cheng, J. & Yu, K. In situ reduction of silver nanoparticles by gelatin to obtain porous silver nanoparticle/chitosan composites with enhanced antimicrobial and wound-healing activity. *Int J Biol Macromol* **121**, 633–642 (2019).
35. Rezaie, F., Momeni-Moghaddam, M. & Naderi-Meshkin, H. Regeneration and Repair of Skin Wounds: Various Strategies for Treatment. *International Journal of Lower Extremity Wounds* **18**, 247–261 (2019).
36. Ndlovu, S. P., Ngece, K., Alven, S. & Aderibigbe, B. A. Gelatin-based hybrid scaffolds: Promising wound dressings. *Polymers* **13**, (2021).
37. Jang, H. J., Kim, Y. M., Yoo, B. Y. & Seo, Y. K. Wound-healing effects of human dermal components with gelatin dressing. *J Biomater Appl* **32**, 716–724 (2018).
38. Alizadeh, M., Abbasi, F., Khoshfetrat, A. B. & Ghaleh, H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Materials Science and Engineering C* **33**, 3958–3967 (2013).
39. Zhuang, L., Zhi, X., Du, B. & Yuan, S. Preparation of Elastic and Antibacterial Chitosan-Citric Membranes with High Oxygen Barrier Ability by in Situ Cross-Linking. *ACS Omega* **5**, 1086–1097 (2020).
40. Cui, Z., Beach, E. S. & Anastas, P. T. Modification of chitosan films with environmentally benign reagents for increased water resistance. *Green Chem Lett Rev* **4**, 35–40 (2011).
41. Pinho, E. & Soares, G. Functionalization of cotton cellulose for improved wound healing. *Journal of Materials Chemistry B* **6**, 1887–1898 (2018).

42. Singh Malik, D., Mital, N. & Kaur, G. Topical drug delivery systems: A patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **26**, 213–228 (2016).
43. Richardson, P. & Mustard, L. The management of pain in the burns unit. *Burns* **35**, 921–936 (2009).
44. Choo, W. T. *et al.* Microalgae as Potential Anti-Inflammatory Natural Product Against Human Inflammatory Skin Diseases. *Frontiers in Pharmacology* **11**, (2020).
45. Ali, W. I., Abdul, E., Hadi, Y. & Al-Johar, Z. A. Pain Management by a Combination of Tramadol, Haloperidol and Carbamazepine in Iraqi Burn Patients. *International Journal of Medical Research & Health Sciences* **7**, 30–37 (2018).
46. Xia, M. *et al.* Tramadol-regulates-proliferation-migration-and-invasion-via-PTENPI3KAKT-signaling-in-lung-adenocarcinoma-cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **20**, 2573–2580 (2016).
47. Ammar, H. O., Ghorab, M., El-Nahas, S. A. & Kamel, R. Polymeric matrix system for prolonged delivery of tramadol hydrochloride, part I: Physicochemical evaluation. *AAPS PharmSciTech* **10**, 7–20 (2009).
48. Ammar, H. O., Ghorab, M., El-Nahas, S. A. & Kamel, R. Polymeric matrix system for prolonged delivery of tramadol hydrochloride, part II: Biological evaluation. *AAPS PharmSciTech* **10**, 1065–1070 (2009).
49. Chogan, F. *et al.* Design, fabrication, and optimization of a dual function three-layer scaffold for controlled release of metformin hydrochloride to alleviate fibrosis and accelerate wound healing. *Acta Biomater* **113**, 144–163 (2020).
50. Yousuf, Y., Datu, A., Barnes, B., Amini-Nik, S. & Jeschke, M. G. Metformin alleviates muscle wasting post-thermal injury by increasing Pax7-positive muscle progenitor cells. *Stem Cell Res Ther* **11**, (2020).
51. Tawfeek, H. M., Abou-Taleb, D. A. E., Badary, D. M., Ibrahim, M. & Abdellatif, A. A. H. Pharmaceutical, clinical, and immunohistochemical studies of metformin hydrochloride topical hydrogel for wound healing application. *Arch Dermatol Res* **312**, 113–121 (2020).
52. Miricescu, D. *et al.* Growth factors, reactive oxygen species, and metformin—promoters of the wound healing process in burns? *International Journal of Molecular Sciences* **22**, (2021).
53. Kiran, B. R. & Venkata Mohan, S. Microalgal cell biofactory—therapeutic, nutraceutical and functional food applications. *Plants* **10**, (2021).

54. Garcia-Parra, J., Fuentes-Grünewald, C. & Gonzalez, D. Therapeutic Potential of Microalgae-Derived Bioactive Metabolites Is Influenced by Different Large-Scale Culture Strategies. *Mar Drugs* **20**, (2022).
55. Li, T. *et al.* Growth and biochemical composition of porphyridium purpureum SCS-02 under different nitrogen concentrations. *Mar Drugs* **17**, (2019).
56. Netanel Liberman, G., Ochbaum, G., Bitton, R. & (Malis) Arad, S. Antimicrobial hydrogels composed of chitosan and sulfated polysaccharides of red microalgae. *Polymer (Guildf)* **215**, (2021).
57. de Jesus Raposo, M. F., de Morais, R. M. S. C. & de Morais, A. M. M. B. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine Drugs* **11**, 233–252 (2013).
58. Tottoli, E. M. *et al.* Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration. *Pharmaceutics* **12**, 1–30 (2020).
59. Lu, J. *et al.* Antibiotics for treating infected burn wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2017**, (2017).
60. Sharma, S. & Batra, S. Recent advances of chitosan composites in artificial skin: the next era for potential biomedical application. in *Materials for Biomedical Engineering: Nanobiomaterials in Tissue Engineering* 97–119 (2019).
61. Taheri, P., Jahanmardi, R., Koosha, M. & Abdi, S. Physical, mechanical and wound healing properties of chitosan/gelatin blend films containing tannic acid and/or bacterial nanocellulose. *Int J Biol Macromol* **154**, 421–432 (2020).
62. Deng, C. M., He, L. Z., Zhao, M., Yang, D. & Liu, Y. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. *Carbohydr Polym* **69**, 583–589 (2007).
63. Vázquez, L., Palestino, G. & Escobar, D. Evaluación de matrices poliméricas estructuradas a base de quitosano/metformina para la regeneración de tejidos. (Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 2022).
64. Cisneros-Covarrubias, C. A., Palestino, G., Gómez-Durán, C. F. A., Rosales-Mendoza, S. & Betancourt-Mendiola, M. D. L. Optimized microwave-assisted functionalization and quantification of superficial amino groups on porous silicon nanostructured microparticles. *Analytical Methods* **13**, 516–525 (2021).
65. Hu, S. *et al.* Preparation of composite hydroxybutyl chitosan sponge and its role in promoting wound healing. *Carbohydr Polym* **184**, 154–163 (2018).
66. Xia, G. *et al.* Preparation of a novel asymmetric wettable chitosan-based sponge and its role in promoting chronic wound healing. *Carbohydr Polym* **227**, (2020).

67. Liang, D., Lu, Z., Yang, H., Gao, J. & Chen, R. Novel Asymmetric Wettable AgNPs/Chitosan Wound Dressing: In Vitro and in Vivo Evaluation. *ACS Appl Mater Interfaces* **8**, 3958–3968 (2016).
68. Anbazhagan, S. & Thangavelu, K. P. Application of tetracycline hydrochloride loaded-fungal chitosan and Aloe vera extract based composite sponges for wound dressing. *J Adv Res* **14**, 63–71 (2018).
69. Hao, Y. *et al.* Bio-multifunctional alginate/chitosan/fucoidan sponges with enhanced angiogenesis and hair follicle regeneration for promoting full-thickness wound healing. *Mater Des* **193**, (2020).
70. Wen, Y., Yu, B., Zhu, Z., Yang, Z. & Shao, W. Synthesis of antibacterial gelatin/sodium alginate sponges and their antibacterial activity. *Polymers (Basel)* **12**, (2020).
71. Leffler, C. C. & Mü, B. W. *Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan-gelatin sponges.* *International Journal of Pharmaceutics* **194**, (2000).
72. Catanzano, O., D'Esposito, V., Formisano, P., Boateng, J. S. & Quaglia, F. Composite Alginate-Hyaluronan Sponges for the Delivery of Tranexamic Acid in Postextractive Alveolar Wounds. *J Pharm Sci* **107**, 654–661 (2018).
73. Al-Duri, B. & McKay, G. *PREDICTION OF BINARY SYSTEM FOR KINETICS OF BATCH ADSORPTION USING BASIC DYES ONTO ACTIVATED CARBON.* *Chicol Engi#%z?ing Science* **46**, (1991).
74. Choy, K. K. H., Porter, J. F. & McKay, G. Langmuir isotherm models applied to the multicomponent sorption of acid dyes from effluent onto activated carbon. *J Chem Eng Data* **45**, 575–584 (2000).
75. Pauletto, P. S., Lütke, S. F., Dotto, G. L. & Salau, N. P. G. Adsorption mechanisms of single and simultaneous removal of pharmaceutical compounds onto activated carbon: Isotherm and thermodynamic modeling. *J Mol Liq* **336**, (2021).
76. Wang, C., Yu, H. Z., Fu, Y. & Guo, Q. X. Mechanism of arylboronic acid-catalyzed amidation reaction between carboxylic acids and amines. *Org Biomol Chem* **11**, 2140–2146 (2013).
77. Usov, A. I. Polysaccharides of the red algae. in *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **65**, 115–217 (2011).
78. Ahmad, M. bin, Lim, J. J., Shamel, K., Ibrahim, N. A. & Tay, M. Y. Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization. *Molecules* **16**, 7237–7248 (2011).

79. Queiroz, M. F., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sasaki, G. L. & Rocha, H. A. O. Does the use of chitosan contribute to oxalate kidney stone formation? *Mar Drugs* **13**, 141–158 (2015).
80. Lawrie, G. *et al.* Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules* **8**, 2533–2541 (2007).
81. Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O. & Arici, M. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chem* **190**, 1109–1115 (2016).
82. Gashti, M. P., Burgener, M., Stir, M. & Hulliger, J. Barium hydrogen phosphate/gelatin composites versus gelatin-free barium hydrogen phosphate: Synthesis and characterization of properties. *J Colloid Interface Sci* **431**, 149–156 (2014).
83. Pimpang, P., Sumang, R. & Choopun, S. *Effect of Concentration of Citric Acid on Size and Optical Properties of Fluorescence Graphene Quantum Dots Prepared by Tuning Carbonization Degree.* *Chiang Mai J. Sci* **45**, (2018).
84. Gao, L. *et al.* Simple method for: O -GlcNAc sensitive detection based on graphene quantum dots. *RSC Adv* **7**, 31204–31211 (2017).
85. Fuentes-Grünwald, C. *et al.* Evaluation of batch and semi-continuous culture of *Porphyridium purpureum* in a photobioreactor in high latitudes using Fourier Transform Infrared spectroscopy for monitoring biomass composition and metabolites production. *Bioresour Technol* **189**, 357–363 (2015).
86. Parra-Riofrío, G. *et al.* Adaptation of autotrophic to heterotrophic culture of *Porphyridium purpureum* (Bory) K.M. Drew & R.Ross: characterization of biomass and production of exopolysaccharides. *J Appl Phycol* **33**, 3603–3615 (2021).
87. Casas-Arrojo, V., Decara, J., Arrojo-Agudo, M. de los Á., Pérez-Manríquez, C. & Abdala-Díaz, R. T. Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from *porphyridium cruentum*. (s.f.gray) *nägeli.* *Biomolecules* **11**, (2021).
88. Mayers, J. J., Flynn, K. J. & Shields, R. J. Rapid determination of bulk microalgal biochemical composition by Fourier-Transform Infrared spectroscopy. *Bioresour Technol* **148**, 215–220 (2013).
89. Leffler, C. C. & Mü, B. W. *Influence of the acid type on the physical and drug liberation properties of chitosan-gelatin sponges.* *International Journal of Pharmaceutics* **194**, (2000).

90. Kadiyam, R. & Muzib, Yi. Colon specific drug delivery of tramadol HCl for chronotherapeutics of arthritis. *Int J Pharm Investig* **5**, 43 (2015).
91. Almansa, C. *et al.* Co-crystal of Tramadol Hydrochloride-Celecoxib (ctc): A Novel API-API Co-crystal for the Treatment of Pain. *Cryst Growth Des* **17**, 1884–1892 (2017).
92. Al-Qadisy, I. *et al.* Novel metformin-based schiff bases: Synthesis, characterization, and antibacterial evaluation. *Materials* **13**, (2020).
93. Rao, V., Divya, K. & Padmalatha, K. COMPARATIVE IN VITRO STUDIES AND BIOEQUIVALENCE ASSESSMENT OF SOME COMMERCIALY AVAILABLE METFORMIN HYDROCHLORIDE TABLETS IN VIJAYAWADA. *International Journal of Development Research* **07**, 16534–16540 (2017).
94. Rocha-García, D. *et al.* Gelatin-based porous silicon hydrogel composites for the controlled release of tramadol. *Eur Polym J* **108**, 485–497 (2018).
95. García-Briones, G. S., Ocampo-Pérez, R., Gómez-Durán, C. F. A., Neri-Gómez, T. & Palestino, G. Porous silicon microcarriers for extended release of metformin: Design, biological evaluation and 3D kinetics modeling. *Chemical Engineering Journal* **365**, 415–428 (2019).
96. Berretta, J., Bumgardner, J. D. & Jennings, J. A. Lyophilized chitosan sponges. in *Chitosan Based Biomaterials* **1**, 239–253 (2017).
97. Alizadeh, M., Abbasi, F., Khoshfetrat, A. B. & Ghaleh, H. Microstructure and characteristic properties of gelatin/chitosan scaffold prepared by a combined freeze-drying/leaching method. *Materials Science and Engineering C* **33**, 3958–3967 (2013).
98. Silva, S. S. *et al.* Fabrication and characterization of Eri silk fibers-based sponges for biomedical application. *Acta Biomater* **32**, 178–189 (2016).
99. Zhang, Y. *et al.* Fabrication of chitosan/gelatin foams with ordered porous structures for use in drug release and metal ion adsorption. *RSC Adv* **4**, 33840–33847 (2014).
100. Li, Q. *et al.* Silver Inlaid with Gold Nanoparticle/Chitosan Wound Dressing Enhances Antibacterial Activity and Porosity, and Promotes Wound Healing. *Biomacromolecules* **18**, 3766–3775 (2017).
101. Nieto-Suárez, M., López-Quintela, M. A. & Lazzari, M. Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. *Carbohydr Polym* **141**, 175–183 (2016).
102. Xu, J. *et al.* A biological functional hybrid scaffold based on decellularized extracellular matrix/gelatin/chitosan with high biocompatibility and antibacterial activity for skin tissue engineering. *Int J Biol Macromol* **187**, 840–849 (2021).

103. Evranos, B., Aycan, D. & Alemdar, N. Production of ciprofloxacin loaded chitosan/gelatin/bone ash wound dressing with improved mechanical properties. *Carbohydr Polym* **222**, (2019).
104. Han, F. *et al.* Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin-chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *Int J Pharm* **476**, 124–133 (2014).
105. Shu Mao, J., Guo Zhao, L., Ji Yin, Y. & de Yao, K. *Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds*. *Biomaterials* **24**, (2003).
106. Kravanja, G., Primožič, M., Knez, Ž. & Leitgeb, M. Chitosan-based (Nano)materials for Novel Biomedical Applications. *Molecules* **24**, (2019).
107. Lu, B. *et al.* Healing of skin wounds with a chitosan-gelatin sponge loaded with tannins and platelet-rich plasma. *Int J Biol Macromol* **82**, 884–891 (2016).
108. Deng, C. M., He, L. Z., Zhao, M., Yang, D. & Liu, Y. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. *Carbohydr Polym* **69**, 583–589 (2007).
109. Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H. & Ostafe, V. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, (2019).
110. Baldrick, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **56**, 290–299 (2010).
111. Jayakumar, R., Prabakaran, M., Nair, S. v. & Tamura, H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances* **28**, 142–150 (2010).
112. Park, H., Temenoff, J. S., Holland, T. A., Tabata, Y. & Mikos, A. G. Delivery of TGF- β 1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications. *Biomaterials* **26**, 7095–7103 (2005).
113. Foda, N. H., El-Laithy, H. M. & Tadros, M. I. Implantable biodegradable sponges: Effect of interpolymer complex formation of chitosan with gelatin on the release behavior of tramadol hydrochloride. *Drug Dev Ind Pharm* **33**, 7–17 (2007).
114. Rathbone, M. J. *Modified-release drug delivery technology* **1**, (2008).
115. Zou, X., Zhao, X. & Ye, L. Synthesis of cationic chitosan hydrogel and its controlled glucose-responsive drug release behavior. *Chemical Engineering Journal* **273**, 92–100 (2015).