



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**“Desarrollo y evaluación de nano-vehículos para
inmunización intranasal basados en polisacáridos
de microalgas hibridados”**

Tesis para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Ruiz Dávila Claudia Elizabeth

Director de Tesis:

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Codirector de Tesis:

Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

Octubre 2024



UASLP-Sistema de Bibliotecas

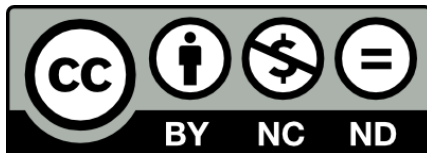
Repositorio Institucional Tesis digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo, mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Desarrollo y evaluación de nano-vehículos para inmunización intranasal basados en polisacáridos de microalgas hibridados © 2024 by Ruiz Dávila Claudia Elizabeth, Rosales Mendoza Sergio, Palestino Escobedo Alma Gabriela is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International.

Este Proyecto se realizó en Laboratorio de Biofarmacéuticos del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Así como en el Laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras de la Facultad de Ciencias Químicas a Bajo la dirección del Dr. Sergio Rosales Mendoza y la Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo. Y fue apoyado por el CONAHCYT (proyectos número CB2017-2018 A1-S-31287 y 848290) de donde se obtuvieron recursos para la realización del trabajo.

El programa de doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del CONAHCyT, registro 000590, en el nivel Consolidado. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT 294026 con numero de CVU 484708

Los datos del trabajo titulado Desarrollo y evaluación de nano-vehículos para inmunización intranasal basados en polisacáridos de microalgas hibridados se encuentra bajo el resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas y pertenece a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

18 de Junio del 2019

Dr. Sergio Rosales Mendoza
Profesor Investigador
Facultad de Ciencias Químicas
PRESENTE

Estimado Dr. Sergio Rosales Mendoza:

En base a su solicitud y en virtud del cambio de Proyecto de Investigación de la MC. Claudia Elizabeth Ruiz Dávila, esta Coordinación a mi cargo en común acuerdo con el Comité Académico del Posgrado en sesión ordinaria llevada a cabo el pasado 12 de Junio del año en cuso llegó a los siguientes acuerdos:

- Se APRUEBA la asesoría y Comité Tutorial el nuevo proyecto de la estudiante de doctorado M.C. Claudia E. Ruiz Dávila,
- Se recomienda reducir el nombre del título de tesis, que no sea mayor a 12 palabras.
- Dedicar al menos tres años de acuerdo al plan curricular del doctorado del PCBP, y con base a recusar las materias de: Seminario de Protocolo de Tesis, Seminario de Avance de Tesis, Trabajo de Tesis del 1 al 6 y Examen Predoctoral.
- Se recomienda lleve a cabo cursos complementarios que le permitan el desarrollo del nuevo proyecto y con base en las recomendaciones del comité tutorial.
- Los cursos optativos serán revalidados así como el seminario de discusión de temas.

Sin otro particular, nos reiteramos a sus órdenes para cualquier duda.

Recibi 20 Jun/19
En la Firma de



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

**“Desarrollo y evaluación de nano-vehículos para
inmunización intranasal basados en polisacáridos de
microalgas hibridados”**

Tesis para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

Ruiz Dávila Claudia Elizabeth

SINODALES:

Presidente:	Dr. Sergio Rosales Mendoza
Secretario:	Dra. Alma G. Palestino Escobedo
Vocal:	Dr. Mario Moscota Santillán
Vocal	Dr. Vladimir A. Escobar Barrios
Vocal:	Dr. Mariano García Soto

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

Octubre 2024

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO

Dr. Sergio Rosales Mendoza: Director de tesis. Adscrito al posgrado en Ciencias de los Bioprocesos de Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí.

Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo: Co-directora de tesis. Adscrita al posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí

Dr. Mariano García Soto: Sinodal de tesis. Adscrito al posgrado en Ciencias de los Bioprocesos de Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí.

Dr. Mario Moscosa Santillán. Sinodal de tesis. Adscrito al posgrado en Ciencias en Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
Facultad de Ciencias Químicas
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado
Posgrado en Ciencias en Bioprocesos
Programa de Doctorado

Formato M5

Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí SLP a 23 de septiembre de
2024

En la ciudad de San Luis Potosí el día 23 del mes de septiembre del año 2024. El que suscribe Claudia Elizabeth Ruiz Dávila Alumna del programa de posgrado en Ciencias en Bioprocesos adscrito a la Facultad de Ciencias Químicas manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dr. Sergio Rosales Mendoza y cede los derechos del trabajo titulado Desarrollo y evaluación de nano-vehículos para inmunización intranasal basados en polisacáridos de microalgas hibridados a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo si el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección rosales.s@uaslp.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Claudia Elizabeth Ruiz Dávila



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

Facultad de Ciencias Químicas

Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

Programa de Maestría

Formato M28

Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a septiembre/20/2024

L.B. María Zita Acosta Nava
Biblioteca de Posgrado FCQ

Asunto: Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada Desarrollo y evaluación de nano-vehículos para inmunización intranasal basados en polisacáridos de microalgas hibridados presentada por Claudia Elizabeth Ruiz Dávila. La tesis es requisito para obtener el grado de Doctorado en el Posgrado en Ciencias en Bioprocesos. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 14% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Dr. Jaime David Pérez Martínez
Coordinador del Posgrado en Ciencias en Bioprocesos

Agradecimientos académicos

Le agradezco a mis directores de tesis, la doctora Alma Gabriela Palestino Escobedo y al doctor Sergio Rosales Mendoza por todo el apoyo, por sus consejos y permitirme trabajar en su proyecto.

Agradezco a mis sinodales los doctores, Mariano García Soto, Vladimir Alonso Escobar Barrios y Mario Moscosa Santillán, por sus consejos, su apoyo y sus valiosos comentarios.

Agradecimientos personales

A mis padres y mis hermanas por apoyarme, por su paciencia y por siempre estar al pendiente de mí.

Alberto gracias por apoyarme, escucharme, ayudarme y siempre darme ánimos para concluir este proceso.

A mi amiga Ivón, mil gracias por toda tu ayuda.

A todos mis compañeros de laboratorio, Azahel, Anahí, Lulú, Miguel, César, Fide, Ileana, Andrea, Susan, por su valioso apoyo, por resolver mis dudas, apoyarme y enseñarme cuando así lo requerí. Mil gracias.

Resumen

La formulación de nuevas plataformas para la administración de fármacos constituye un eje central en el tratamiento de enfermedades emergentes, como la pandemia ocasionada por SARS-CoV-2. Dentro de estas plataformas se encuentran los sistemas de liberación de fármacos y vacunas. Estos sistemas mejoran la biodisponibilidad del agente terapéutico y la especificidad del sitio de acción. Además, protegen al agente terapéutico de la degradación y controlan la cinética de liberación del fármaco, lo que permite reducir las dosificaciones y, por ende, los efectos secundarios. Y en el caso de vacunas, potencian la respuesta inmune al actuar como adyuvantes.

El objetivo de este trabajo fue sintetizar vehículos de entrega de antígeno o acarreadores, basados en dos polisacáridos marinos: el quitosano obtenido del exoesqueleto de crustáceos y el exopolisacárido (EPS) que libera la microalga *Porphyridium purpureum*.

La síntesis de los vehículos de entrega se llevó a cabo mediante gelación iónica, generándose entrecruzamiento entre el quitosano y el EPS mediante interacciones electrostáticas, aprovechando el carácter positivo del quitosano y las cargas negativas del EPS. Los resultados analizados por microscopia electrónica de transmisión (TEM) mostraron morfología esférica. Sin embargo, estos geles fueron inestables, por lo que se adicionó un agente entrecruzante (tripolifosfato de sodio, TPP) para mejorar la estructura. Los geles obtenidos de esta nueva síntesis (quitosano, exopolisacárido y tripolifosfato de sodio, Ch-EPS-TPP) tuvieron un tamaño aproximado de 100 nm y presentaron una morfología esférica tipo núcleo-carcasa, que fue corroborada por imágenes TEM y el mapeo de elementos químicos. Los geles Ch-EPS-TPP mostraron altos porcentajes de mucoadhesividad (> 90 %), una característica crucial en el desarrollo de vacunas mucosales. Los estudios de citotoxicidad indicaron que los microgeles estimulan la proliferación de esplenocitos y células HEK.

Palabras clave: Vehículos de entrega de antígeno, EPS, núcleo-carcasa, Ch-EPS.

Abstract

The generation of new drug delivery systems is a central axis in the treatment of emerging diseases such as the pandemic caused by the SARS-CoV-2. Among these, drug and vaccine delivery systems allow to enhance the bioavailability of the therapeutic agent and its specificity on the action site. Furthermore, they protect the therapeutic agent from degradation and control the drug release kinetics, which allows for the reduction of dosages and, consequently, side effects. In the case of vaccines, they enhance the immune response by acting as adjuvants.

The aim of this study was to synthesize antigen delivery vehicles based on two marine polysaccharides: chitosan obtained from crustacean exoskeletons and the exopolysaccharide released by the microalga *Porphyridium purpureum* (EPS).

The synthesis of the delivery vehicles was carried out through ionic gelation, creating cross-linking between chitosan and EPS through electrostatic interactions. Taking advantage of the positive nature of chitosan and the negative charges of EPS. The results analyzed by transmission electron microscopy (TEM) showed spherical morphology. However, these gels proved to be unstable, and thus the addition of a cross-linking agent (sodium tripolyphosphate, TPP) to enhance the structure was assessed. The gels obtained from this new synthesis (chitosan, exopolysaccharide and sodium tripolyphosphate, Ch-EPS-TPP) exhibited a core-shell spherical morphology, as confirmed by TEM imaging and chemical element mapping, with an approximate size of 100 nm. These Ch-EPS-TPP gels showed high levels of mucoadhesivity (> 90%), an important characteristic for mucosal vaccines. Furthermore, cytotoxicity studies indicated that the microgels stimulate the proliferation of splenocytes and HEK cells.

Keywords: Antigen delivery vehicles, EPS, core-shell, Ch-EPS.

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	3
2.1. Hidrogeles.....	4
2.2. Síntesis de hidrogeles.....	5
2.2.1. Hidrogeles químicos.....	5
2.2.2. Hidrogeles físicos	5
2.3. Hidrogeles en medicina	6
2.4. Hidrogeles como plataformas de liberación de fármacos	8
2.5. Hidrogeles como acarreadores de vacunas.....	10
2.6. Plataformas de liberación de fármacos o vacunas a base de polisacáridos.....	12
2.6.1. Carragenina.....	13
2.6.2. Dextrano.....	14
2.6.3. Inulina	14
2.6.4. Letinano	14
2.6.5. Glucanos.....	15
2.6.6. Pululano	15
2.6.7. Gelatina.....	15
2.6.8. Ácido hialurónico	15
2.6.9. Celulosa	16
2.6.10. Alginato	16
2.6.11. Quitosano.....	17
2.6.12. Polisacáridos algales	17
2.6.13. <i>Porphyridium purpureum</i>	18
3. Justificación	20
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivo general.....	21
5.1. Objetivos específicos	21
6. Metodología experimental.....	22

6.1.	Cultivo de la microalga <i>Porphyridium purpureum</i>	22
6.2.	Extracción del EPS.....	22
6.3.	Síntesis de hidrogeles Ch-EPS.....	22
6.4.	Síntesis de hidrogeles núcleo-carcasa Ch-EPS-TPP.....	23
6.5.	Análisis estadístico	24
6.6.	Metodología de la caracterización de los geles Ch-EPS	24
7.	Resultados y discusión	28
7.1.	Caracterización química del EPS por espectroscopia infrarrojo.....	28
7.2.	Efecto los parámetros de síntesis en el tamaño de los geles Ch-EPS.....	29
7.3.	Síntesis de geles núcleo-carcasa Ch-EPS-TPP.....	31
7.4.	Análisis estadístico para los geles Ch-EPS-TPP	32
7.5.	Caracterización química de los geles Ch-EPS-TPP	33
7.6.	Mecanismo de formación de los geles Ch-EPS-TPP	35
7.7.	Tamaño y morfología	38
7.8.	Maapeo de elementos químicos.....	40
7.9.	Análisis térmico	42
7.10.	Ensayo de mucoadhesividad.....	43
7.11.	Capacidad de carga en una proteína modelo	46
7.12.	Ensayo de estabilidad al frío	48
7.13.	Evaluación del efecto del pH en la estabilidad en los microgeles	50
7.14.	Ensayo biológico de los microgeles.....	52
8.	Conclusiones.....	56
9.	Bibliografía.....	57
10.	Anexo.....	80

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de la síntesis de los hidrogeles Ch-EPS	23
Figura 2. Espectro infrarrojo de la biomasa de a) <i>P. purpureum</i> y b) EPS	28
Figura 3. a) Análisis de varianza (ANOVA) de los factores (temperatura, concentración de EPS y tiempo de sonicado) sobre el tamaño de partícula b) gráfica de superficie de respuesta c) imagen TEM de Ch-EPS. Variables en el modelo A: temperatura de reacción, B: cantidad de exopolisacárido y C: tiempo de sonicado	31
Figura 4. a) Análisis de varianza (ANOVA) de la síntesis de los geles Ch-EPS-TPP b) gráfica de superficie de respuesta. Variables en el modelo A: pH y B: Concentración de TPP	33
Figura 5. Espectro FTIR de quitosano, EPS, TPP, D4 y D8.....	35
Figura 6. Mecanismo de formación de los geles núcleo carcasa. La gelación iónica se logró mediante el entrecruzamiento de las especies encontradas (NH_3^+ , O-SO_3^- y CO_2^-) través de fuerzas intermoleculares	38
Figura 7. Imágenes TEM de las muestras D4 (Condiciones de síntesis pH 3.25 y 7.5 mg/ml de TPP) y D8 (condiciones de síntesis pH 4.13 and 4.32 mg/ml de TPP). Derecha partículas núcleo carcasa, izquierda aglomerado de partículas núcleo-carcasa y partículas solidas	40
Figura 8. Mapeo de elementos químicos de la muestra D4 mediante la técnica de EDS correspondientes a carbón (verde), azufre (amarillo), oxígeno (rosa) y fósforo (blanco).....	42
Figura 9. Análisis termogravimétrico (TGA) de las muestras quitosano (CS), EPS, TPP, Ch-EPS y Ch-EPS-TPP.....	43
Figura 10. Gráfica del ensayo de mucoadhesividad en las muestras D4 y D8 para concentraciones de a) 0.5 mg/ml y b) 1 mg/ml.....	46
Figura 11. Capacidad de carga de BSA en D4, modelo de primer orden	48

Figura 12. Imágenes TEM del ensayo de estabilidad al frío en las muestras D4 y D8, llevadas a cabo a -20°C por 5 meses	50
Figura 13. a) Imágenes TEM y b) gráfica del efecto del pH sobre la muestra D4	52
Figura 14. Evaluación de la citotoxicidad de la muestra D4 en la línea celular HEK-293T. Las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células y fueron tratadas en un rango de concentración de gel de 10-900 $\mu\text{g/ml}$, H_2O_2 o PBS e incubadas por 72 h. La viabilidad celular fue evaluada por el método de la resazurina. La viabilidad celular fue calculada como % respecto al control (PBS). El ensayo fue realizado por triplicado. Los asteriscos denotan diferencias estadísticas ($P < 0.05$) respecto al tratamiento con PBS.	53
Figura 15. Evaluación citotóxica de la muestra D4 en esplenocitos de ratón. Las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células y fueron tratadas en un rango de concentración de gel de 10-900 $\mu\text{g/ml}$, H_2O_2 o PBS e incubadas por 72 h. La viabilidad celular fue evaluada por el método de la resazurina. La viabilidad celular fue calculada como % respecto al control (PBS). El ensayo fue realizado por triplicado. Los asteriscos denotan diferencias estadísticas ($P < 0.05$) respecto al tratamiento con PBS.....	54

Índice de tablas

Tabla 1. Matriz experimental de la síntesis de los geles Ch-EPS.....	30
Tabla 2. Matriz experimental de la síntesis de los geles Ch-EPS-TPP a 30° C, 2 mg de EPS, 15 min de sonicación.....	32

1. Introducción

El creciente aumento de enfermedades es una problemática de salud pública. Según la organización mundial de la salud (OMS), al año mueren alrededor de 41 millones de personas relacionadas con alguna enfermedad no transmisible, lo que representa 74% de las muertes en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2023). Sin embargo, reducir el número de muertes por enfermedades no transmisibles no es el único reto a superar, cada año se descubren nuevos patógenos con el potencial de causar epidemias debido a su alta virulencia y fácil propagación de humano en humano y de manera zoonótica (animal a humano). Algunas de estas infecciones son causadas por los virus de Ébola, Zika, Nipah, SARS, influenza H1H1 y H1N5, Lyme, Marburg, Hendra, Hantavirus (Ada, 2005; Rauch et al., 2018). Así como la actual pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2. Por lo tanto, la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos es imperativo para mitigar los padecimientos existentes, así como para ampliar el portafolio de herramientas terapéuticas. La investigación en nuevas formulaciones conlleva el desafío de desarrollar materiales inteligentes que encapsulen al agente activo para protegerlo de la degradación, logrando especificidad en el sitio de acción y control en la liberación para evitar dosificaciones constantes que puedan causar efectos adversos. Estos materiales pueden ser administrados por vías mucosales (oral y nasal), cerebral y pulmonar, entre otras. Algunos estudios reportan el desarrollo de plataformas de administración basadas en nanopartículas, dendrímeros, nano tubos, liposomas, partículas magnéticas, micelas, polímeros e hidrogeles (Gunay et al., 2016). Siendo estos últimos la base de esta investigación.

Los hidrogeles son estructuras hidrofílicas complejas que han sido ampliamente estudiadas en el campo de la medicina, debido a sus características estructurales como elasticidad y alta capacidad de retención de agua. Son sintetizados a partir de diversas moléculas que comprenden lípidos, proteínas, polímeros, amino ácidos y polisacáridos (Revuri et al., 2017). Los polisacáridos son macromoléculas complejas compuestas de monosacáridos unidos mediante enlaces glicosídicos. Estos biopolímeros cumplen funciones biológicas de reserva y estructurales. Sus grupos

funcionales son fácilmente detectados por los receptores superficiales de las células promoviendo interacciones no covalentes, favoreciendo la bioadhesión (Revuri et al., 2017; Sun et al., 2021). Además, se ha reportado que los polisacáridos exhiben características particulares entre las cuales podemos mencionar actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiviral, hipocolesterolémica, anticoagulante, antioxidante, hepatoprotectora, antiinflamatoria e inmunogénica, entre otras (Tomaz et al., 2018; Riccio & Lauritano., 2020; Netanel et al., 2020).

La capacidad inmunogénica es de vital importancia en el diseño de acarreadores como adyuvantes en vacunas. Un adyuvante es una sustancia que se adiciona a una vacuna para potenciar la inmunogenicidad de los antígenos altamente purificados, reduciendo así costos y dosificación (Li et al., 2013). Los adyuvantes tradicionales incluyen emulsiones oleosas, sales de aluminio, complejos inmunoestimulantes, citoquinas, macropartículas, polisacáridos y virus o bacterias enteros o fraccionados (Zhang et al., 2018; Csaba et al., 2009). Sin embargo, algunos adyuvantes presentan desventajas. Las sales de aluminio no proveen inmunidad a las mucosas que son una de las principales barreras contra los patógenos y adicionalmente causan efectos secundarios como daño renal por acumulación. Las emulsiones causan reactogenicidad en el área de aplicación, por tal motivo nuevas formulaciones son estudiadas para mejorar la inmunogenicidad y reducir los efectos secundarios.

La formulación de materiales o biomateriales basados en polisacáridos como los hidrogeles, conlleva a la obtención de materiales funcionales e integrales, haciendo sinergia con las propiedades de los polisacáridos y potenciando el efecto terapéutico.

2. Marco teórico

Los biomateriales son definidos como sustancias que interactúan con sistemas biológicos reemplazando o restaurando alguna función. Además, son farmacológicamente inertes, biocompatibles, no tóxicos y no carcinógenos. Se dividen principalmente en 4 categorías: polímeros, cerámicos, metales y composites. Los composites son materiales híbridos formados por dos compuestos con distintas propiedades fisicoquímicas. Se encuentran en diversos tamaños (macro, micro y nano), formas (varillas, discos, cilindros, esferas, fibras, etc.) y estructuras (hidrogeles, partículas, micelas, dendrímeros y core-shell (núcleo-carcasa)) (Cordeiro et al., 2015; Zhao et al., 2014). Los biomateriales son un componente fundamental en el área médica, desde el diseño de prótesis, implementos médicos (adhesivos quirúrgicos, suturas, vendajes absorbibles), implantes (válvulas cardíacas, implantes dentales y auditivos), biosensores, estructuras para ingeniería de tejidos, vehículos de liberación de fármacos y vacunas (Antosova et al., 2009; Tathe et al., 2010; Y. S. Zhang & Khademhosseini., 2017). Esta última aplicación es el enfoque de este trabajo doctoral.

El desarrollo de nuevas plataformas de liberación de terapéuticos es una estrategia que involucra el desarrollo de materiales o biomateriales novedosos con la finalidad optimizar las vías de administración de fármacos o vacunas. Con lo cual se logran terapias y esquemas de medicación efectivos que mejoren la salud de los pacientes. Los biomateriales en el área de liberación de fármacos, se enfocan en el desarrollo de sistemas novedosos que transporten moléculas. Además de lograr buena encapsulación y especificidad en el sitio de acción. Aunado a un perfil de liberación prolongada, reducción de efectos secundarios, y una mejor biodisponibilidad, selectividad y en caso de vacunas, una mayor inmunogenicidad (Li & Cooper-white., 2018; Group, 2016; Hu et al., 2019; Tsoras & Champion., 2019; Dragan & Dinu., 2019; Alhaique et al., 2016). La modificación y adquisición de ciertas propiedades en los materiales puede ser lograda mediante distintos métodos de síntesis modulando características como porosidad, tamaño, hidrofobicidad, hidrofiliidad y funcionalización superficial que genere materiales inteligentes capaces de responder

a distintos estímulos (fuerza iónica, presión, luz, temperatura, especies reactivas de oxígeno, magnetismo, volumen, pH, etc.).

Las estrategias de síntesis son específicas a la estructura que se desea, tal como la síntesis de dendrímeros (método divergente o convergente), micelas (emulsión agua/aceite, evaporación de solvente, dispersión sólida, diálisis), micro/nano partículas (litografía, electrospinning, ablación laser, deposición química de vapor, método sol-gel, método solvotermal, etc) e hidrogeles (métodos físicos o químicos) (Zhao et al., 2011).

2.1. Hidrogeles

Un gel es una estructura compuesta de redes poliméricas tridimensionales reticuladas, que se encuentran enlazadas mediante interacciones intermoleculares o enlaces covalentes (Ottenbrite & Park, 2010). Estos materiales tienen la capacidad de absorber grandes cantidades de disolvente sin disolverse debido a los enlaces químicos o físicos en su estructura. Su hidrofiliidad se atribuye a los grupos hidroxilo ($-OH$), carboxilo ($-COOH$), amida ($-CONH_2$) y sulfónico ($-SO_3H$) presentes en este tipo de polímeros (Wierzbicka & Wilczek., 2023). Estas estructuras presentan diversos tamaños y según sus dimensiones los rangos oscilan entre: $>10\ \mu m$ (hidrogeles), $1-10\ \mu m$ (microgeles) y $<1\ \mu m$ (nanogeles). Los geles se distinguen en dos categorías con base al estado físico del agente gelante en la dispersión: hidrogeles y organogeles. Los hidrogeles absorben agua, compuestos hidrosolubles o coloides dispersables, mientras que los organogeles contienen sustancias oleosas insolubles en agua. Existe una agrupación adicional dependiendo de la naturaleza del solvente: xerogeles y geles acuosos. Los primeros son geles sólidos con bajo contenido de solvente, se producen por evaporación y puede regenerarse a gel nuevamente, ejemplo de ello es la gelatina en polvo, la celulosa en polvo y el poliestireno (Paul et al., 2017). Los hidrogeles son materiales suaves, insolubles en agua, moldeables y con alta tasa de hinchamiento, lo cual constituye una característica de interés en la industria farmacéutica dado que absorben altas concentraciones de principio activo (Morelle et al., 2018; Genevro et al., 2019).

2.2. Síntesis de hidrogeles

Los hidrogeles se sintetizan mediante reacciones químicas (enlaces covalentes) o fuerzas intermoleculares (London, puentes de hidrógeno, Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, etc.), empleando diversas moléculas como bloques de ensamblaje, en las que se incluyen polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, péptidos o lípidos (Bookstaver et al., 2018; Adeosun et al., 2020; Ye et al., 2014; F. Xu et al., 2022). A continuación, se describen las estrategias de síntesis de hidrogeles físicos e hidrogeles químicos.

2.2.1. Hidrogeles químicos

El entrecruzamiento químico involucra la formación de enlaces covalentes entre las cadenas poliméricas mediante diversos sitios reactivos como lo son ácidos carboxílicos, aminas, amidas, urea, tioéter y ésteres por mencionar algunos (Herrmann et al., 2021; Jayachandran et al., 2022; Revuri et al., 2017). Obteniéndose estructuras más estables. El proceso requiere la interacción de los monómeros con un agente entrecruzante, siendo el glutaraldehído el más utilizado. Sin embargo, este agente es tóxico, por lo cual se buscan alternativas menos tóxicas, como la genipina, iones de calcio, ácido tánico, ferúlico y ácido cítrico, entre otros (Jayachandran et al., 2022; Ehrmann, 2021). La obtención de hidrogeles implica diversas estrategias de síntesis, tales como la polimerización por radicales libres, la reticulación química, la polimerización por irradiación, y la reticulación enzimática (Ho et al., 2022; Lu et al., 2023). Otros métodos avanzados incluyen la litografía y la ablación láser para patrones y estructuras específicas. En el área médica los hidrogeles químicos son utilizados para la liberación controlada de fármacos, ingeniería de tejidos, implantes médicos y prótesis (Ottenbrite & Park, 2010).

2.2.2. Hidrogeles físicos

Los hidrogeles físicos son redes tridimensionales que se forman a partir del entrecruzamiento de biopolímeros mediante interacciones supramoleculares del tipo puentes de hidrógeno, Van der Waals, interacciones iónicas, interacciones π - π e

interacciones hidrofóbicas (Ye et al., 2014). La reticulación se lleva a cabo a través de la formación de enlaces con los grupos hidroxilo, carboxilato, amino, amida, carboxilo, sulfato y copolímeros anfifílicos (Kumarasamy & Giri, 2019; Revuri et al., 2017; Adeosun et al., 2020; Atwal et al., 2023). Estos hidrogeles pueden autoensamblarse mediante interacciones no covalentes. Sin embargo, en algunos casos se emplean agentes entrecruzantes para mejorar su estabilidad y resistencia estructural, como el tripolifosfato de sodio (TPP), que actúa como un agente polielectrolítico.

Las rutas de síntesis de los hidrogeles físicos implican diversas estrategias, tales como la gelación iónica, el congelamiento/descongelamiento, la formación de complejos polielectrolíticos y la cristalización (Ho et al., 2022; Szekalska et al., 2022; Csaba et al., 2009; Kumarasamy & Giri, 2019). En la gelación iónica, se utilizan iones para formar enlaces entre las cadenas poliméricas, mientras que el congelamiento y descongelamiento alternados inducen la formación de cristales de hielo que actúan como puntos de entrecruzamiento físico. La formación de complejos polielectrolíticos se basa en la interacción entre polielectrolitos de cargas opuestas para formar redes, y la cristalización de ciertos segmentos del polímero puede inducir la formación de una red tridimensional (Sun et al., 2021; Xu et al., 2022). Los hidrogeles físicos son fáciles de sintetizar y, por sus características, se consideran reversibles. Debido a la naturaleza de sus interacciones, pueden emplearse en una variedad de aplicaciones biomédicas, como la liberación controlada de agentes terapéuticos, el desarrollo de vendajes y apósitos, la ingeniería celular y como soportes temporales en cirugías (Xu et al., 2022; Islam & Ferro, 2016; Ottenbrit & Kinam Park, 2010).

2.3. Hidrogeles en medicina

Diversas investigaciones se han centrado en el uso de hidrogeles para el desarrollo de aplicaciones médicas debido a sus interesantes características (hidrofilicidad, propiedades mecánicas flexibles, gran capacidad de retención de agua, biocompatibilidad, no toxicidad, permeabilidad, y en capacidad de estímulo respuesta). Los avances en estas investigaciones han propiciado el desarrollo y la implementación de diversas aplicaciones en el área biomédica, tales como:

- a) Ingeniería de tejidos: Las propiedades mecánicas de los hidrogeles los hace candidatos ideales para imitar tejidos blandos como nervios, tendones piel o músculos, usándolos como matrices o estructuras para promover la proliferación celular y por ende la regeneración de tejidos (Xu et al., 2022).
- b) Vendajes quirúrgicos o apósitos: Los apósitos proveen una barrera física contra la entrada de agentes infecciosos posterior a daño en la piel. Se ha reportado que los apósitos a base de hidrogeles promueven mejor y más rápida cicatrización respecto a los vendajes convencionales, estimulan el crecimiento celular para la regeneración del tejido. Además, algunos apósitos de hidrogel pueden cargar algún fármaco como en el caso de los apósitos cargados con metformina para pacientes diabéticos (Lu et al., 2023).
- c) Lentes de contacto: Los hidrogeles de silicón presentan mayor porosidad, una característica fundamental en el diseño de los lentes de contacto, la porosidad permite un mayor flujo de oxígeno, reduciendo inflamación de la córnea y neovascularización (Haworth et al., 2021).
- d) Biosensores: Los avances tecnológicos sitúan a los hidrogeles como un instrumento de gran utilidad. En el ámbito médico son diversas las áreas donde hay avances notables que los involucran, el diagnóstico y cuantificación son algunos de ellos. Los hidrogeles en este campo proveen una matriz en la cual se inmoviliza la molécula prueba, entre las cuales hay anticuerpos, enzimas, ADN, ARN, genes o cualquier otra molécula biológica (Review, 2017). Una de sus implicaciones de mayor importancia es el diagnóstico y tratamiento de cáncer. Esta enfermedad consta de distintos estadios donde se sobreexpresan distintos marcadores como el antígeno específico prostático, antígeno 125, alfa feto proteína, antígeno carcino embrionario, y antígeno 129 solo por mencionar algunos de ellos (Iqbal et al., 2022). Aquí radica la importancia de los avances tecnológicos en este ámbito, ya que la detección oportuna de estos marcadores es crucial para anticipar los tratamientos y salvar vidas.
- e) Diseño de prótesis e implantes: Las propiedades mecánicas de los hidrogeles ofrecen una opción viable en el diseño de materiales o dispositivos con la

capacidad de regenerar o reparar un órgano o tejido. El daño en el tejido óseo representa una aflicción recurrente en los centros médicos. Estas van desde lesiones o traumatismos hasta enfermedades degenerativas como la osteoartritis. La degeneración del cartílago es una de las características de la enfermedad. Se ha investigado diversas terapias para contrarrestar los efectos de la enfermedad. Uno de ellos implica el uso de hidrogeles como una estructura soporte en el cual se estimule el crecimiento celular y se regenere el tejido dañado. El Cartisem® un producto comercial a base de ácido hialurónico y células mesenquimales de cordón umbilical, ha mejorado significativamente la regeneración del cartílago (Li et al., 2023; Atwal et al., 2023).

- f) Sistemas de liberación de fármacos: La alta capacidad de retención de líquidos sitúan a los hidrogeles como interesantes plataformas de administración de fármacos y vacunas. Por ejemplo, los geles a base de gelatina-goma guar cargados con lidocaína para aplicaciones dentales (Favatela et al., 2021). Sistemas de liberación dual basado en metotrexato/ CaCO_3 y aspirina/alginato/carboximetilcelulosa para la evaluación de terapias contra cáncer colorrectal (Sheng et al., 2021). Así como vacunas experimentales contra ántrax soportadas en vehículos de quitosano/ fucoidan (Chuang et al., 2020). El desarrollo de geles de ácido poliacrílico cargados hidrocortisona y goma de almendra, usados contra la inflamación de colon ocasionada por trastornos digestivos como la colitis (Singh et al., 2022). Y la síntesis de hidrogeles de goma tragacanto encapsulando citicolina, un fármaco prescrito para lesiones cerebrales y enfermedades neurodegenerativas (K. Devi et al., 2023). Solo por mencionar algunos.

2.4. Hidrogeles como plataformas de liberación de fármacos

La inflamación del colon es una enfermedad crónica caracterizada por una inflamación en el revestimiento mucosal del colon o el intestino grueso. Es causada por diversos factores como estrés, enfermedad inflamatoria intestinal, trastornos autoinmunes, o fármacos. Además, ocasiona alteraciones en el microbioma intestinal.

Li, et al. 2022 evaluaron la efectividad de microgeles núcleo-carcasa a base de alginato-AEM (aminoetil-metacrilato) encapsulando anticuerpos para reducir la respuesta inflamatoria. Los resultados indicaron que las microcápsulas protegieron al antígeno de la degradación debida a las condiciones adversas del sistema digestivo, y además se observó una reducción significativa de la inflamación en los modelos evaluados (Li et al., 2022).

Un hidrogel termo-responsivo diseñado a partir de bloques de PLGA (poliácido láctico-co-glicólico) y PEG (polietilenglicol) fue desarrollado para encapsular vancomicina. El ensayo consistió en la administración de los geles en ratas a las que se les fue inducida una fractura y posteriormente fueron inoculadas con *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de la vancomicina encapsulada para evitar la formación de placa bacteriana en la lesión ósea. Los resultados indicaron que los geles lograron controlar la infección reduciendo así posteriores daños al hueso (Li et al., 2023).

En otro estudio se desarrolló un hidrogel doblemente entrecruzado a partir de colágeno porcino y celulosa extraída de la especie marina *Ciona intestinalis*. Este hidrogel fue cargado con dexametasona, un corticosteroide utilizado para reducir la inflamación y prevenir el rechazo en trasplantes de órganos o tejidos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial del hidrogel sintetizado como implante corneal con liberación de fármaco, en un modelo postquirúrgico en corneas de conejo. La liberación de dexametasona en los estudios in vitro fue de 2 meses, mientras que el perfil de liberación in vivo se prolongó después de este lapso (Xeroudaki et al., 2023).

Un biomaterial poroso compuesto de colágeno-hidroxiapatita fue preparado a partir de un método hidrotermal, con el propósito de incorporar Paclitaxel, fármaco para el tratamiento de cáncer. Se realizó un ensayo de citotoxicidad en dos líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 (altamente metastásica) y MCF-7 (ligeramente metastásica). Las partículas presentaron mayor citotoxicidad en la línea celular MDA-MB-231 que en MCF-7. Los autores concluyeron que el material podría ser un efectivo sistema de liberación de fármacos anticancerígenos (Watanabe et al., 2013).

La artritis reumatoide es una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por la inflamación y dolor. Afecta principalmente a las articulaciones con daño progresivo al cartílago y al hueso. Uno de los medicamentos estándar para el tratamiento de la artritis reumatoide es metotrexato. Este fármaco actúa inhibiendo la síntesis del dihidrofolato reductasa, afectando la división celular. Esto reduce la actividad del sistema inmune, ayudando a controlar la inflamación de las articulaciones. Sin embargo, este fármaco ocasiona efectos secundarios que incluyen daño hepático, anemia, trastornos gastrointestinales, daños pulmonares, etc. Para reducir estos efectos tóxicos se requieren dosificaciones precisas que cumplan su efecto farmacológico, exponiendo al mínimo otros órganos y tejidos. El propósito de la investigación fue la formulación un sistema de liberación controlada utilizando Pluronic F-127 (polímero), hidroximetil celulosa y policarbonilo, el gel obtenido logró un perfil de liberación de 93% en 96 horas (Venkatesh et al., 2020).

2.5. Hidrogeles como acarreadores de vacunas

En un estudio se sintetizaron geles de quitosano entrecruzados con TPP mediante gelación iónica, como vehículos de entrega. Estos geles fueron funcionalizados con ADN de hepatitis B como antígeno. Se obtuvieron estructuras esféricas altamente estables con tamaño de 100-120 nm. Los ensayos biológicos demostraron que los geles sintetizados mostraron actividad inmunoestimuladora (Namasivayam et al., 2020).

Una vacuna contra *Trueperella pyogenes*, una bacteria patógena que ocasiona mastitis, neumonía y abscesos hepáticos en algunos animales domésticos, fue desarrollada utilizando como acarreador nanopartículas de quitosano que encapsularon un plásmido quimérico de ADN. Los resultados mostraron partículas esféricas estables. Un ensayo con enzimas hidrolíticas de ADN (DNasa) demostró que las partículas de quitosano protegieron al antígeno de la degradación. Los ensayos biológicos concluyeron que la vacuna desarrollada (quitosano-ADN) induce una alta inmunidad humoral y celular, actuando sinérgicamente para proveer protección contra esta infección (Huang et al., 2018).

Biswas et al. sintetizaron geles de quitosano cargados con un anticuerpo monoclonal anti-sarampión, recubriéndolos con alginato. El estudio comprendió la evaluación de geles de quitosano cargados con el antígeno recubiertos y no recubiertos. Los ensayos biológicos indicaron que en general no se encontraron efectos citotóxicos en la línea celular evaluada (HT-29). Los ratones inmunizados con los acarreadores recubiertos presentaron mayor respuesta humoral respecto a los ratones inmunizados con la vacuna no recubierta con alginato, logrando además seroconversión con una sola aplicación (Biswas et al., 2015).

Investigadores evaluaron una nanovacuna a partir de nanopartículas de quitosano contra la septicemia hemorrágica viral en *Paralichthys olivaceus*, una especie de pez de Japón. Emplearon partículas virales inactivadas con formalina, las cuales encapsularon con quitosano por el método de emulsión. La nanovacuna fue capaz de inducir inmunidad local resultando en el incremento de altos títulos de anticuerpos. La inmunidad adaptativa o adquirida generó memoria inmunológica posterior a la exposición del antígeno, en este caso la piel y la mucosa intestinal son los sitios donde el antígeno fue absorbido para generar la inmunidad mucosal (Kole et al., 2019).

La brucelosis es una enfermedad zoonótica que causa fiebre de Malta en humanos y abortos en animales de granja. Es un problema de salud pública en países en vías de desarrollo. Esta se contagia a través del contacto de las mucosas con fluidos o aerosoles infecciosos y por consumo de productos infectados. Un grupo de investigadores iraníes probaron la eficacia de nanopartículas de quitosano como adyuvantes y acarreadores de una proteína de la cepa virulenta *Brucella abortus*. Analizaron la administración oral e intraperitoneal de las nanopartículas en ratones. Los resultados mostraron que la administración oral no obtuvo una apreciable respuesta inmune de IgA, respecto a su comparativo intraperitoneal con una respuesta mayor. En la forma oral se encontró a IgG2a, este indicador es importante debido a que estimula la actividad fagocítica. La protección contra *Brucella* se genera de manera similar que con otros patógenos intracelulares por medio de linfocitos T citotóxicos y células TH1 que producen interferón-gamma (IFN- γ). En este estudio se encontró IL-

17 que genera inmunidad contra este patógeno en ratones inmunizados de manera oral, mientras que IFN- γ y IL-12 estuvieron presentes en ambos modos de inmunización, oral e intraperitoneal (Abkar et al., 2018).

Otro estudio fue llevado a cabo utilizando nanovacunas con quitosano como vehículo en la inmunización contra el virus Coxsackie. Este patógeno forma parte de la familia de los enterovirus que incluye también a la poliomielitis y la hepatitis A. El virus Coxsackie causa la denominada enfermedad de boca, pies y manos que si no es tratada puede ocasionar miocarditis aguda. En este trabajo se sintetizaron nanopartículas de quitosano de 80 a 100 nm con las cuales fueron inmunizados ratones en forma intranasal. Las evidencias encontradas confirmaron que fue inducida inmunidad humoral y celular. El quitosano incrementó la activación y acumulación de macrófagos y células polimorfonucleares promoviendo resistencia a las infecciones por citoquinas. Este polisacárido policationico se enlaza a superficies negativamente cargadas como las mucosas y permite el transporte a través del epitelio. Las partículas menores a 10 μm pueden atravesar con facilidad el tejido linfoide asociado a la nariz (NALT). El sistema inmune de la mucosa común conduce a la inmunidad específica de cualquier mucosa ya sea del tracto intestinal, respiratorio o reproductivo. En este trabajo las células B y TH junto con las IgA específicas a antígeno interactuaron por medio de una red de citoquinas formando una primer barrera protectora en las superficies mucosas (Xu et al., 2004).

2.6. Plataformas de liberación de fármacos o vacunas a base de polisacáridos

Diversos reportes científicos describen la síntesis de hidrogeles empleando diversos grupos de moléculas como polímeros, proteínas lípidos, carbohidratos y polisacáridos.

Los polisacáridos son macromoléculas renovables y abundantes en todo el planeta. Se encuentran en diversas fuentes como: animales (quitina, quitosano y condroitina), plantas (goma guar y pectina), algas (alginato, agar y carragenina), hongos (dextrano, goma xantana y gelana, escleroglucano) solo por mencionar los

más importantes (Group, 2016). Son estructuras hidrocarbonadas compuestas de monómeros repetitivos unidos por enlaces glucosídicos. A diferencia de otras macromoléculas como proteínas y polinucleótidos, los polisacáridos presentan una amplia variedad de estructuras (lineal, helicoidal, amorfa o entrecruzada), además cumplen diversas funciones biológicas como almacenamiento de azúcares y soporte estructural. Son de importancia médica por su carácter renovable, biodegradable, no tóxico y biocompatible. Estas biomoléculas exhiben un amplio espectro de elementos farmacológicos relevantes como actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiviral, hipocolesterolémica, inmunogénica, anticoagulante, antioxidante, hepatoprotectora, y antiinflamatoria, entre otras (Tomaz et al., 2018; Riccio & Lauritano, 2020; Netanel et al., 2020). Los polisacáridos ofrecen una buena matriz para cargar fármacos y ser empleados como acarreadores partiendo de micro y nanoestructuras. Sus grupos hidrofílicos como amino, hidroxilo y carboxilo pueden formar enlaces covalentes con los tejidos como membranas epiteliales y mucosas dando bioadhesión. Esta característica pudiera prolongar el tiempo de retención e incrementar la absorción del fármaco en el organismo (Liu et al., 2008).

En inmunología, estas moléculas desempeñan una función crucial al activar macrófagos, linfocitos T, linfocitos B y células NK. Además, tienen la capacidad de inducir la secreción de citoquinas, moléculas complemento y anticuerpos. Los polisacáridos empleados como adyuvantes estimulan tanto la inmunidad natural como la inmunidad específica. Ejemplo de estos polisacáridos son:

2.6.1. Carragenina

Es un biopolímero lineal sulfatado obtenido de algas rojas. El interés médico en esta molécula radica en su habilidad de generar respuestas inmunes específicas al antígeno y efectos antitumorales. Zhang et al., 2010 evaluaron la eficacia de la carragenina como adyuvante en la vacuna peptídica E7 contra el virus del papiloma humano (VPH). Sus resultados indicaron que se incrementa la respuesta inmune específica para ese antígeno. Además, mejora la actividad antitumoral y terapéutica

generada por la vacunación peptídica contra tumores que responden a E7 (Zhang et al., 2010).

2.6.2. [Dextrano](#)

Es un polisacárido microbiano, su variante sulfatada muestra amplias ventajas en el área médica. Se usa como expansor de volumen plasmático y agente antitrombótico. El sulfato de dextrano posee propiedades proinflamatorias por lo cual se ha planteado como adyuvante en vacunas. Un ensayo realizado con un derivado de este polisacárido denominado como DEAE (dietilaminoetilo de dextrano), aumentó la respuesta inmunitaria a la vacuna en monos Rhesus frente a la encefalomiелitis equina venezolana (Manuscript, 2011).

2.6.3. [Inulina](#)

Es un carbohidrato derivado de plantas. En forma natural no tiene actividad, la adquiere en su forma delta. Ha sido aplicada en la vacuna contra la hepatitis B, influenza, VIH, peste equina africana, virus del oeste del Nilo, encefalitis japonesa, SARS y ántrax. Esto lo logra regulando la presentación de antígeno, activando las células B y T. Estimulando una respuesta balanceada de th1 y th2, así como incrementando la cantidad de células B de memoria, y la secreción de células T CD4 y CD8 (Skwarczynski, 2017; Sun et al., 2018).

2.6.4. [Letinano](#)

Es un beta glucano, polisacárido antitumoral obtenido del hongo shitake. Es un estimulador del sistema inmune. La versión sulfatada del letinano ha sido usada como adyuvante en la vacuna contra el virus de Newcastle, proliferando la aparición de linfocitos y reduciendo así la mortalidad de los pollos infectados. En la vacuna contra SARS promueve la respuesta antiatípica del inflammasoma (B. Sun et al., 2018), (Manuscript, 2011).

2.6.5. Glucanos

Son monómeros de glucosa repetitivos unidos por medio de enlaces glucosídicos. Proviene de plantas, bacterias y hongos. Y se le atribuyen propiedades antitumorales, inmunológicas y antiinfecciosas. Su derivado sulfatado, como en el caso del dextrano eleva los títulos de anticuerpos séricos en la vacuna contra la infección de Newcastle (Li & Wang, 2015).

2.6.6. Pululano

Es un polisacárido lineal obtenido del hongo *Aureobasidium pullulans*. Tiene la habilidad de adherirse y formar fibras y películas. Estas propiedades pueden ser explotadas en la inmunización nasal donde el polisacárido se adhiere al epitelio mucosal. Se ha descrito que el pululano interactúa con los hepatocitos mediante los receptores de asialglicoproteínas de estas células, lo que lleva a la internalización por fagocitosis siendo de interés como acarreador de fármacos y adyuvante de vacunas (Santos & Grenha, 2015).

2.6.7. Gelatina

Es un biopolímero biocompatible obtenido de la degradación hidrolítica de la triple hélice de colágeno animal. Mediante el proceso hidrolítico se obtienen dos tipos de gelatina: gelatina A (con punto isoeléctrico de 6 a 9) con pretratamiento ácido y gelatina B (punto isoeléctrico de 4 a 5) con pretratamiento alcalino. El pretratamiento ácido le confiere a la gelatina tipo A un mayor número de grupos carboxílicos, una característica aprovechable en el desarrollo de estructuras para regeneración de tejidos (Boccafroschi et al., 2019).

2.6.8. Ácido hialurónico

Es un glicosaminoglicano lineal de cadena larga, compuesto de ácido glucurónico y N-acetil-glucosamina. Esta molécula es sintetizada de manera natural y cumple diversas funciones entre las cuales están soporte estructural, hidratación de la piel y amortiguación de las articulaciones. El ácido hialurónico puede enlazarse a diversos

receptores, incluyendo al CD44. Este receptor en particular se sobreexpresa en tumores. Esta característica se ha explorado en tratamientos contra el cáncer, desarrollando sistemas de liberación basados en ácido hialurónico, mejorando así la especificidad y por ende la efectividad del fármaco (Kundu et al., 2020; City et al., 2017).

2.6.9. Celulosa

Es un polisacárido lineal compuesto por anillos de D-glucopiranososa unidos por enlaces glicosídicos. Es el biopolímero renovable más abundante de la tierra. Esta molécula, aunque es hidrofílica por la cantidad de grupos hidroxilo superficiales, no es soluble completamente en agua, debido al hidrógeno inter e intra molecular en la red polimérica. La alta cristalinidad conferida por la cantidad de hidrógeno en la estructura provee a la celulosa resistencia mecánica y una alta disponibilidad de sitios modificables. Estas características han sido exploradas para el desarrollo de materiales aplicables en ingeniería de tejidos, liberación de fármacos y apósitos (Devi et al., 2022; Janmohammadi et al., 2023).

2.6.10. Alginato

Polisacárido aniónico natural obtenido de las algas pardas y bacterias. Tiene una estructura lineal compuesta de ácido manurónico y ácido gulurónico unidos por enlaces 1,4 glucosídicos (Guo et al., 2018). Los residuos en su estructura presentan grupos carboxílicos que promueven la gelación iónica vía interacciones electrostáticas interactuar con grupos cargados positivamente, formando complejos polielectrolíticos (Biswas et al., 2015; Kundu et al., 2020). El alginato ha sido extensivamente estudiado en el área médica debido a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad y nula toxicidad. Su rol en aplicaciones farmacéuticas se centra principalmente en ingeniería de tejidos, plataformas de liberación de fármacos y terapia de genes (Sun et al., 2021; Kumarasamy & Giri, 2019; Wang et al., 2023).

2.6.11. [Quitosano](#)

El quitosano es un biopolímero catiónico derivado del exoesqueleto de los crustáceos, de naturaleza catiónica debido a las cargas amino positivas remanentes del proceso de desacetilación. Presenta buenas propiedades adhesivas, buena compatibilidad, baja toxicidad y es biodegradable. Estimula el sistema inmune celular y humoral, además de inducir la respuesta inmune natural y adaptativa. Esta molécula puede promover la liberación de citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral alfa, proteína monocita, proliferación de grupos de diferenciación de células CD4 y CD8 y proteína alfa macrófago inflamatoria. Una investigación realizada con quitosano y lípido A monofosforilado aumentaron la respuesta inmune frente al norovirus, las nanopartículas de quitosano encapsularon el antígeno y mejoraron la respuesta humoral y celular haciéndolo ideal como acarreador y adyuvante (Sun et al., 2018). Las partículas nanométricas de este material penetran las mucosas del tejido epitelial debido a sus dimensiones <100 nm, además sus propiedades adhesivas y su carga permiten que su liberación sea continua.

Su carácter positivo promueve la interacción electrostática con superficies cargadas negativamente como el epitelio mucosal; característica denominada mucoadhesividad, ideal para el diseño de plataformas de administración oral (Li et al., 2013; Debnath et al., 2011; Jesus et al., 2017).

2.6.12. [Polisacáridos algales](#)

Las algas y microalgas son un diverso y complejo grupo de especies acuáticas fotosintéticas encontradas en diversos hábitats, que van desde ríos, lagos, mares y hasta en aguas residuales. Se catalogan acorde a su tamaño como macroalgas (organismos multicelulares) y microalgas (organismos unicelulares). Se clasifican en tres grupos principalmente: Chlorophyta (algas verdes), Phaeophyta (algas pardas) y Rhodophyta (algas rojas).

Las algas rojas, base de esta investigación, son un diverso grupo de organismos con alrededor de 14,000 especies, de las cuales solo 6,100 están identificadas

(Bhattacharya et al., 2013). Son microorganismos unicelulares de agua salada, siendo principalmente autótrofos. Las algas rojas poseen un patrón único de polisacáridos sulfatados compuestos de galactanos, arabinoglucanos, fucanos y glucanos, siendo los más conocidos carragenano y aragano (Casas-Arrojo et al., 2021; Balti et al., 2018). Su pared celular es suave, conformada por galactanos sulfatados amorfos, celulosa y mucilago, tal es el caso de *Porphyridium purpureum* una microalga marina que habita principalmente en ambientes salinos.

2.6.13. *Porphyridium purpureum*

Porphyridium purpureum o *Porphyridium cruentum* es un alga unicelular esférica de aproximadamente 10 μm de diámetro que se encuentran encapsulada en una pared celular compuesta de polisacáridos sulfatados, los cuales constituyen entre 50-70% del peso seco del alga. Los monosacáridos que componen la pared celular son xilosa (38%), glucosa (24%), galactosa (22%) y ácido glucurónico (10%), aunque también se encuentran trazas de ramosa y manosa en menor proporción (Abdala-et al., 2010). La composición del mucilago ronda aproximadamente entre 6-7% de proteína y 10% de ésteres sulfatados (Percival, 1979). Esta microalga ofrece una importante plataforma para la producción de metabolitos de interés médico y comercial, dentro de los que destacan los pigmentos ficoeritrina y ficocianina (que le dan su color característico), filicobiliproteínas, ácidos grasos poliinsaturados (ácido eicosapentaenoico, EPA; ácido araquidónico AA, por sus siglas en inglés), ácidos orgánicos, carbohidratos, aminoácidos, péptidos, vitaminas, antibióticos y enzimas, entre otros.

Los exopolisacáridos de *Porphyridium* son metabolitos extracelulares sulfatados de compleja estructura que exhiben interesantes propiedades antiinflamatorias, hipocolesterolémicas, inmunomoduladoras, antimicrobianas, antitumorales antiparasitarias y antivirales (Cifuentes & Herrero, 2019; Kathiresan et al., 2007). Se ha reportado la actividad antioxidante de dichos compuestos sulfatados, siendo capaces de proteger a las células de especies reactivas de oxígeno, así como inducir la actividad fagocítica y la producción de citocinas y óxido nítrico.

El mucílago aniónico sulfatado está compuesto de ácido glucurónico (que le otorga cargas negativas) y azúcares como xilosa, manosa y glucosa. Es liberado al medio durante su crecimiento para cumplir varias funciones esenciales, tales como reserva energética cuando hay escasez de sustratos en el medio, protección contra la desecación y la radiación ultravioleta, defensa contra patógenos y depredadores, formación de biopelículas para la adhesión a superficies, así como la interacción con metales y nutrientes para mejorar la captación de recursos esenciales y la homeostasis celular (Netanel et al., 2020; Arad & Levy-ontman, 2010; Jiao et al., 2011).

Dadas las características del exopolisacárido de *Porphyridium* ya mencionadas, otra de sus posibles aplicaciones consiste en su uso en la producción de vehículos de entrega o sistemas de liberación de fármacos y biológicos. En el caso de las vacunas el uso de un sistema de entrega que potencie la respuesta inmune es fundamental para lograr la mayor eficacia de estas vacunas. De tal manera que si un polisacárido es inmunoestimulante podría dar lugar a un sistema de entrega de antígenos altamente eficaz.

3. Justificación

El desarrollo de sistemas de liberación de biofármacos es un área crucial en el desarrollo de nuevos medicamentos. Una alternativa a los sistemas de liberación convencional son los hidrogeles, los cuales son materiales versátiles que permiten diseñar sistemas con especificidad, selectividad y dosificación controlada. La síntesis de hidrogeles puede llevarse a cabo mediante entrecruzamiento físico, aprovechando interacciones intermoleculares y minimizando el uso de agentes entrecruzantes tóxicos como el glutaraldehído o glioxal, que pueden ser reemplazados por opciones menos dañinas como el tripolifosfato de sodio, ácido cítrico o genipina. Los geles físicos, además de ser fáciles de sintetizar, permiten el uso de una amplia variedad de compuestos base para su síntesis, incluyendo polímeros y biomoléculas como las proteínas. Dentro de estos, los polisacáridos destacan por su amplio espectro de características de interés médico, como actividad anticancerígena, antiviral y antibacteriana. En particular, *Porphyridium purpureum* es una microlaga de bajo costo de producción y produce un exopolisacárido cuya estructura contiene grupos sulfatados que le confieren carácter aniónico, permitiendo interacciones electrostáticas con estructuras catiónicas como el quitosano, el cual también es una materia prima económica para la síntesis de materiales funcionales. Este biopolímero ha sido ampliamente utilizado en el ámbito clínico para el diseño de apósitos, sistemas de liberación de fármacos, implantes, prótesis y biomarcadores, debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad y baja toxicidad.

Por lo tanto, el uso de hidrogeles físicos a partir de quitosano y exopolisacáridos de *P. purpureum* representa como una alternativa económica y accesible para el desarrollo de plataformas de liberación de agentes terapéuticos, aprovechando las propiedades de ambos compuestos; teniendo como etapas iniciales de desarrollo el establecimiento de un método de síntesis eficiente y la validación de su estabilidad y seguridad, así como la capacidad de carga de biomoléculas.

4. Hipótesis

Es posible obtener microgeles físicos basados en quitosano y en el exopolisacárido de *P. purpureum* mediante interacciones electrostáticas entre los grupos amino (catiónicos) pertenecientes al quitosano y los grupos sulfatados encontrados en el EPS; los cuales exhiben una estabilidad, seguridad y capacidad de carga adecuadas para servir como acarreadores de biomoléculas.

5. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar fisicoquímica y morfológicamente microgeles basados en quitosano y el exopolisacárido de *P. purpureum* (EPS) y evaluar su capacidad como plataforma de administración de biofármacos.

5.1. Objetivos específicos

- Llevar a cabo la producción y purificación del exopolisacárido de *P. purpureum* a través de cultivos en suspensión.
- Sintetizar microgeles basados en quitosano y el exopolisacárido de *P. purpureum*, mediante gelación iónica y empleando TPP como agente entrecruzante.
- Caracterizar fisicoquímicamente los microgeles obtenidos, en términos de tamaño, estructura química, estabilidad al congelamiento y estabilidad térmica.
- Determinar la capacidad de carga de los geles obtenidos empleando BSA como molécula modelo, a fin de determinar su capacidad como vehículo de entrega de biofármacos.
- Evaluar la seguridad de los geles obtenidos en términos de su actividad citotóxica en esplenocitos de ratón y células HEK.

6. Metodología experimental

6.1. Cultivo de la microalga *Porphyridium purpureum*

P. purpureum se cultivó en un reactor de vidrio de 3 L en medio ASW (medio marino artificial) suplementado con vitaminas B1 y B12, así como pantotenato de calcio. Se adicionó 1% v/v inóculo y el cultivo se enriqueció con CO₂. Se mantuvo en agitación e irradiación constante a 240 rpm y 2000 lux respectivamente. El tiempo de cultivo fue de 15 días y el crecimiento se monitoreó por densidad óptica a 750 nm.

6.2. Extracción del EPS

Las células algales se separaron por decantación y al sobrenadante se adicionaron dos volúmenes de etanol al 96 %. Esta mezcla se mantuvo a 4 °C toda la noche y posteriormente se centrifugó a 7500 rpm por 10 min. El pellet obtenido se lavó con 96 % de etanol y con agua destilada, y se sometió a centrifugación a las condiciones antes descritas. El EPS obtenido se liofilizó en un equipo Labconco a -50 °C y 0.2 mbar por 24 h, para su posterior caracterización.

6.3. Síntesis de hidrogeles Ch-EPS

Se realizaron ensayos preliminares para evaluar la capacidad de formación de hidrogeles a partir de quitosano y EPS mediante interacciones electrostáticas, obteniendo partículas esféricas. Se evaluó el efecto de la temperatura, tiempo de sonificado y cantidad de EPS sobre el tamaño de partícula que es un factor determinante. A una solución de 1 mg/ml de quitosano en ácido acético con un pH de 2, se adicionaron 1, 1.4, 2, 2.6, y 3 mg de EPS, sonicándose para solubilizar por 4, 9, 15, 21 y 25 min. El contenido se transfirió a un matraz de fondo redondo, calentándose a 20, 30 y 40 °C. Se mantuvo en agitación constante a 350 rpm por 1 h de reacción. Cada muestra fue centrifugada a 12,000 rpm por 1 h. Las partículas obtenidas se lavaron dos veces con 1 % de ácido acético y posteriormente con agua doblemente filtrada, y finalmente se liofilizaron.

6.4. Síntesis de hidrogeles núcleo-carcasa Ch-EPS-TPP

Al intentar dispersar mediante sonicación la solución de hidrogeles, estos se rompieron, exhibiendo inestabilidad mecánica. De tal manera que se decidió adicionar un agente entrecruzante que pudiera mejorar las propiedades estructurales. En este ensayo se evaluó la concentración de agente entrecruzante TPP y distintos valores de pH. Se preparó una solución de quitosano en ácido acético (1 mg/ml) y se ajustó a los siguientes valores de pH 2, 2.37, 3.25, 4.13 y 4.5, usando una solución 5 N de NaOH o 3 N de HCl. A cada solución se adicionaron 2 mg de EPS y la mezcla se sometió a sonicación durante 15 min. Posteriormente, se transfirió a un matraz de fondo redondo y se adicionó gota a gota distintas concentraciones de TPP (3, 4.32, 7.5, 10.68, y 12 mg/ml) agitándose constantemente a 350 rpm por 1 h (como se representa en la **Figura 1**). El proceso de lavado de los geles es el mismo que se describió anteriormente.

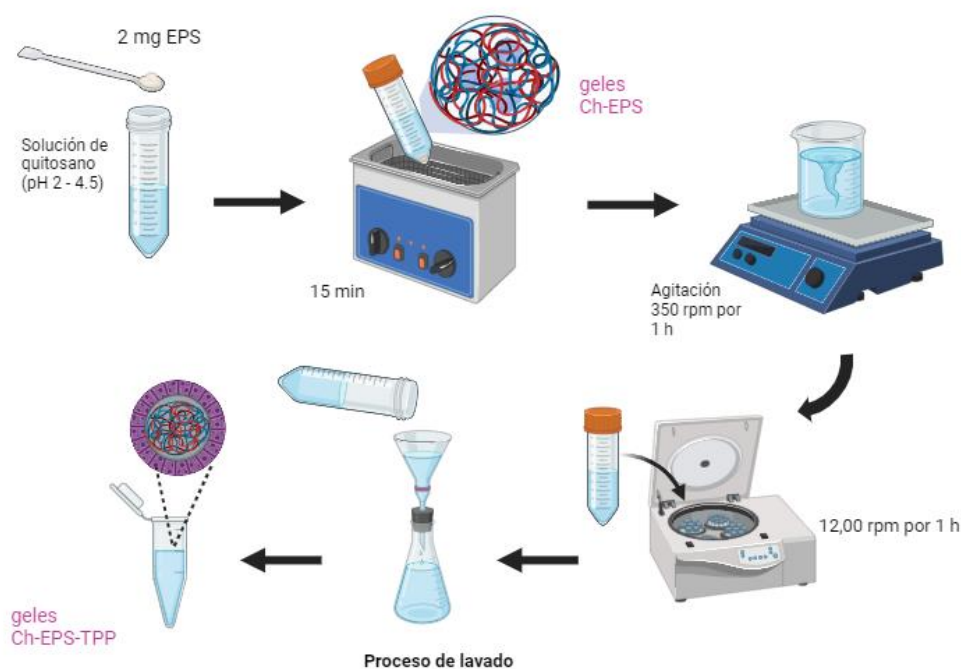


Figura 1. Representación esquemática de la síntesis de los hidrogeles Ch-EPS

6.5. Análisis estadístico

El análisis del impacto de los parámetros analizados (temperatura, concentración de expolisacárido, tiempo de sonicado, concentración de TPP, y pH) sobre el tamaño y morfología de los geles se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA) empleando un diseño central compuesto.

En el primer diseño se estudió el efecto de temperatura (20-40 °C), concentración de expolisacárido (1-3 mg) y tiempo de sonicado (5-25 min). Los valores óptimos para cada parámetro fueron empleados en el segundo diseño, donde se investigaron distintos valores de pH (2-4.5) y concentraciones de TPP (3-10.68). Los resultados sugieren el siguiente modelo.

$$\frac{1}{Y_1} = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_4 AB + \beta_5 AC + \beta_6 BC + \beta_7 A^2 + \beta_8 B^2 + \beta_9 C^2 \quad (1)$$

Siendo β_n es el coeficiente de regresión lineal; A, B y C corresponden a temperatura, concentración de EPS y tiempo de sonicación, respectivamente. El modelo se transformó a inverso para reducir el error y mejorar la respuesta.

$$Y_2 = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 AB + \beta_4 A^2 + \beta_5 B^2 \quad (2)$$

Donde β_n es el coeficiente de regresión lineal, A corresponde al pH y B la concentración de TPP.

El nivel de significancia empleado fue de $\alpha = 0.05$

6.6. Metodología de la caracterización de los geles Ch-EPS

6.6.1. Análisis de estructura química

La interacción entre los geles fue confirmada utilizando espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), en un Cary 600 series FTIR Spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca.). Los espectros se obtuvieron en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} con un promedio de 64 escaneos.

6.6.2. Análisis de tamaño y morfología

Se midió el radio hidrodinámico de los geles por dispersión de luz dinámica (DLS), usando un equipo Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, UK). Las mediciones se realizaron por triplicado empleando un volumen de 900 μl . Sin embargo, el DLS es un equipo muy sensible y los residuos de la síntesis pueden ocasionar interferencias en las mediciones. La determinación de la estabilidad en suspensión de las muestras, medida como potencial Z, se analizó por DLS utilizando el equipo descrito previamente, empleando 800 μl de muestra. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Para confirmar el tamaño y conocer la morfología de los geles, las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) equipado con un sistema EDS (energy dispersive system). Las imágenes se obtuvieron en un equipo Jeol 2010 HR Transmission Electron Microscope (Jeol, Tokyo, Japan) operado a 200 KV.

6.6.3. Análisis termogravimétrico

El análisis térmico se realizó en un 550 TGA Instruments (PerkinElmer, Waltham, Ma). Las muestras se calentaron a 550 $^{\circ}\text{C}$ con una rampa de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ con atmósfera de N_2 y un flujo de 60 ml/min.

6.6.4. Ensayo de mucoadhesividad

La capacidad de adhesión de un material al epitelio mucosal es denominado mucoadhesividad y es un elemento clave en formulaciones farmacéuticas. Para determinar la capacidad de mucoadhesión de los materiales sintetizados, se preparó una solución de mucina a 5 y 10 mg/ml en solución amortiguadora de acetato a pH 6.4. Se mezclaron 0.7 mg de muestra con 0.7 ml de cada solución de mucina y 0.7 ml de solución amortiguadora de acetato, incubándose a 37 $^{\circ}\text{C}$. Se tomó una alícuota cada hora, centrifugándose a 12,000 rpm por 30 s. Las mediciones se llevaron a cabo por espectroscopia UV-VIS a 260 nm en un equipo Cary 60 UV-VIS Spectrophotometer (Agilent Technologies, Santa Clara, Ca).

6.6.5. Capacidad de carga

Se preparó una solución de 1 mg/ml de BSA en PBS 1x con un pH de 7.4. Se mezclaron 4 ml de la solución descrita con 0.9 mg de geles y se incubaron a 4 °C. La mezcla se mantuvo en agitación constante a 150 rpm por 10 días. Se tomaron alícuotas en intervalos de 24 h, y se centrifugaron a 12,000 rpm por 30 min. El sobrenadante se analizó acorde al método cuantificación de proteínas de Lowry. El porcentaje de adsorción se calculó acorde a la siguiente formula:

$$\text{Capacidad de carga} = \frac{BSA \text{ inicial} - BSA \text{ en el sobrenadante}}{BSA \text{ inicial}} * 100$$

6.6.6. Ensayo de estabilidad

Se realizaron dos tipos de ensayos. En el primero se determinó la estabilidad al congelamiento, en el que las muestras de los geles sintetizados se suspendieron en agua destilada y se almacenaron a -20 °C por 5 meses. Posteriormente se descongelaron y se analizaron por TEM para determinar alteraciones morfológicas. El segundo ensayo comprendió la comparación de distintos valores de pH y su efecto en la estructura de los geles. Se prepararon tres soluciones a pH 3.65, 6.25 y 10.16. Se mezclaron 10 ml de cada solución con 0.8 mg de muestra y se mantuvieron a temperatura ambiente. El muestreo se realizó cada hora, analizando el cambio de tamaño por DLS.

6.6.7. Evaluación de citotoxicidad en células HEK

El ensayo de citotoxicidad de los geles se realizó en células HEK-293T (Human Embryonic Kidney), las cuales se cultivaron en medio DMEM a 37 °C y 5 % de CO₂. En una placa de 96 pozos se pusieron en contacto 1×10⁶ células con 500 µl de distintas concentraciones de geles (10, 100, 300, 600 y 900 µg/ml) y se incubaron a 37 °C con atmósfera de 5 % CO₂ por 72 h. Posteriormente, se adicionaron 100 µl de resazurina y se incubaron por 4 h a las condiciones antes descritas. Las mediciones analizadas

por fluorescencia en un dispositivo FlexStation II Molecular (Molecular Devices, San José, Ca), empleando como controles positivos al PBS y negativo al H₂O₂.

6.6.8. Evaluación de citotoxicidad en esplenocitos de ratón

En este ensayo se emplearon esplenocitos obtenidos de ratones BALB/c. Se removió asépticamente el bazo y se maceró en 4 ml de medio RPMI incompleto. Las células fueron ajustadas a un volumen de 8 ml y centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. El pellet resultante se resuspendió en una solución amortiguadora de lisis y se incubó a 37 °C por 5 min. La suspensión celular se centrifugó a las condiciones mencionadas y se sometió a un proceso de lavado con medio RPMI incompleto. El pellet se resuspendió en RPMI incompleto suplementado con FBS, las células se ajustaron a 2×10⁶ células/ml. En una placa de 96 pozos, se adicionaron 1×10⁶ células/ml y se pusieron en contacto con las siguientes concentraciones de geles 10, 100, 300, 600 y 900 µg/ml en PBS. Los controles fueron PBS, Concanavalina A (control positivo) y 10% de DMSO (control negativo). Los cultivos se incubaron por 72 h con 5 % de CO₂. Posteriormente se adicionaron 100 µl de resazurina, incubándose por 4 h a las condiciones descritas anteriormente. Las muestras se analizaron por fluorescencia usando un equipo FlexStation II Molecular (Molecular Devices, San José, Ca).

7. Resultados y discusión

7.1. Caracterización química del EPS por espectroscopia infrarrojo

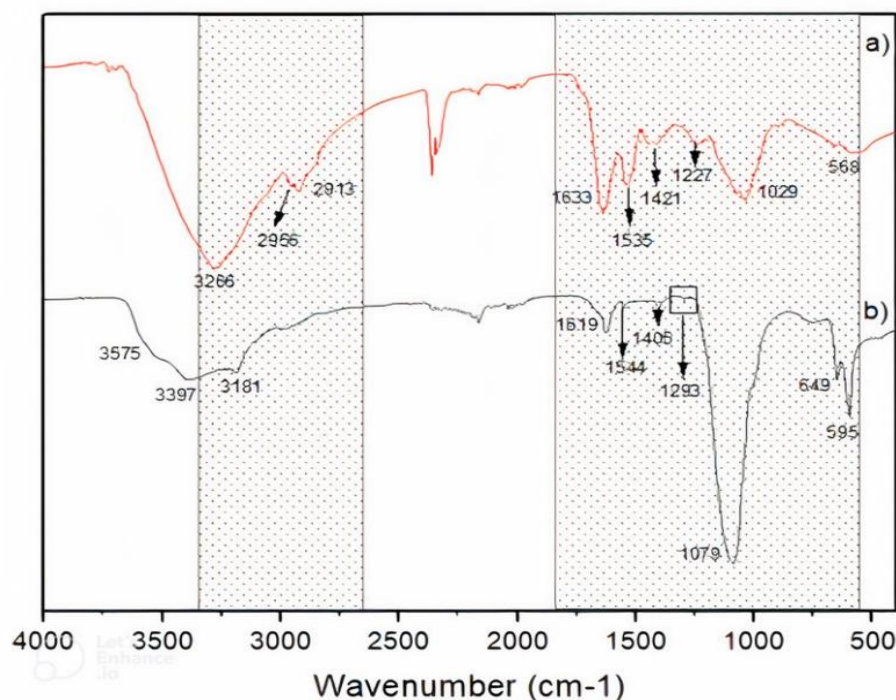


Figura 2. Espectro infrarrojo de la biomasa de a) *P. purpureum* y b) EPS

En la **Figura 2** se muestra el espectro comparativo de biomasa y de exopolisacárido de *P. purpureum*. La biomasa microalgal (**Figura 2a**) presenta una banda intensa a 3266 cm⁻¹ asignada a la vibración O-H. Las bandas características a proteínas fueron encontradas a 2956 y 2913 cm⁻¹ asociadas a vibraciones asimétricas del enlace C-H en CH₃ y CH₂, respectivamente, correspondientes a proteínas saturadas (Fuentes-grünwald et al., 2015). Así mismo, en la región de 1633 y 1535 cm⁻¹ se identificaron vibraciones relacionadas a amida I (C=O) y amida II (NH) (Zaib et al., 2016). Dos señales de menor intensidad encontradas en 1421 y 1227 cm⁻¹ son atribuidas a vibraciones asimétricas de S=O y vibraciones simétricas en S=O, respectivamente, provenientes de grupos SO₃, indicando la presencia de grupos sulfatados residuales del EPS (Parra-Riofrío et al., 2021; Nan et al., 2021).

En la región de la huella digital se observan vibraciones a 1029 cm^{-1} relacionadas a C-O en grupos C-O-C provenientes de enlaces glicosídicos entre los polisacáridos. La banda ubicada a 568 cm^{-1} es atribuida a estrechamientos y deformaciones de los anillos cíclicos (Fuentes-grünewald et al., 2015; Zaib et al., 2016).

El espectro del EPS (**Figura 2b**) mostró una señal pronunciada entre $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$ asignada a vibraciones de O-H debida posiblemente a agua contenida en la estructura (Parra-Riofrío et al., 2021). El carácter aniónico del EPS está determinado por el ácido glucurónico, encontrado en el espectro en la región de $1619\text{ y }1544\text{ cm}^{-1}$ con vibraciones asimétricas del ion carboxilato (COO^-) (Casas-Arrojo et al., 2021). Las bandas encontradas a $1405\text{ y }1293\text{ cm}^{-1}$ corresponden a estiramientos O-H y vibraciones asimétricas en S=O, respectivamente (Parra-Riofrío et al., 2021). A 1079 cm^{-1} se observa el estiramiento de C-O-C para C-O atribuida a los enlaces glicosídicos entre los polisacáridos (Casas-Arrojo et al., 2021). Mientras que en la región de la huella digital encontramos dos bandas asociadas a estiramientos y deformaciones en el anillo pirano ($649\text{ y }595\text{ cm}^{-1}$) (Netanel et al., 2020; Nan et al., 2021; Gargouch et al., 2021).

7.2. Efecto los parámetros de síntesis en el tamaño de los geles Ch-EPS

En la **Tabla 1** encontramos la matriz experimental del primer diseño de experimentos. Los tamaños más pequeños medidos por DLS corresponden a los puntos centrales evaluados en el rango de 30° C , 2 mg de exopolisacárido y un tiempo de sonicación de 15 min (muestras A1 y A9). Con valores de $1188\text{ a }1126\text{ nm}$. La muestra D8 también presenta un menor tamaño (1220 nm) sin embargo, presenta un valor de PDI alto (0.73) sugiriendo que la variación de tamaños encontrados en la muestra no es completamente uniforme.

Tabla 1. Matriz experimental de la síntesis de los geles Ch-EPS

Código	Temperatura (°C)	Exopolisacáridos (mg)	Tiempo de sonicación (min)	Tamaño DLS (nm)	Índice de polidispersidad
A1	20	2	15	1226 ± 12	0.48
A2	24	1.4	21	1737 ± 10	0.29
A3	24	2.6	21	2146 ± 14	0.5
A4	24	2.59	9	1815 ± 20	0.59
A5	24	1.4	9	1702 ± 12	0.6
A6	30	2	5	1757 ± 10	0.65
A7	30	3	15	2689 ± 11	1
A8	30	2	15	1200 ± 10	0.73
A9	30	2	15	1188 ± 15	0.41
A10	30	2	25	2318 ± 20	0.85
A11	30	1	15	1448 ± 17	0.78
A12	36	1.4	21	2417 ± 16	0.29
A13	36	2.6	9	2807 ± 19	0.5
A14	36	2.6	21	2146 ± 12	0.59
A15	36	1.4	9	2696 ± 9	0.6
A16	40	2	15	1729 ± 8	0.65

La **Figura 3** resume los resultados del análisis estadístico (ANOVA) de la primera estrategia experimental. El valor p para β_0 fue <0.05, indicando que el diseño es estadísticamente significativo. Para este análisis el coeficiente de determinación (R^2) fue de 86 %, indicando un ajuste sustancial. La temperatura de reacción y la concentración del EPS, así como el termino cuadrático del tiempo de sonicado son factores que afectan el tamaño de los hidrogeles sintetizados (**Figura 3a**). En la gráfica de superficie de respuesta (**Figura 3b**) se observa que las condiciones óptimas para un menor tamaño de partícula se encuentran a 30 °C, 2 mg de EPS y 15 min de sonicación. Se confirmó la formación de partículas esféricas con un tamaño aproximado de 100 nm mediante microscopia TEM (**Figura 3c**). El entrecruzamiento de estas partículas se debe a interacciones electrostáticas de carácter iónico entre el quitosano y el EPS. Sin embargo, este tipo de interacciones son inestables. Esto se comprobó al sonicar las partículas para dispersarlas, estas se rompieron con facilidad.

De tal manera que se decidió adicionar al proceso un agente entrecruzante que mejore la estabilidad de los geles.

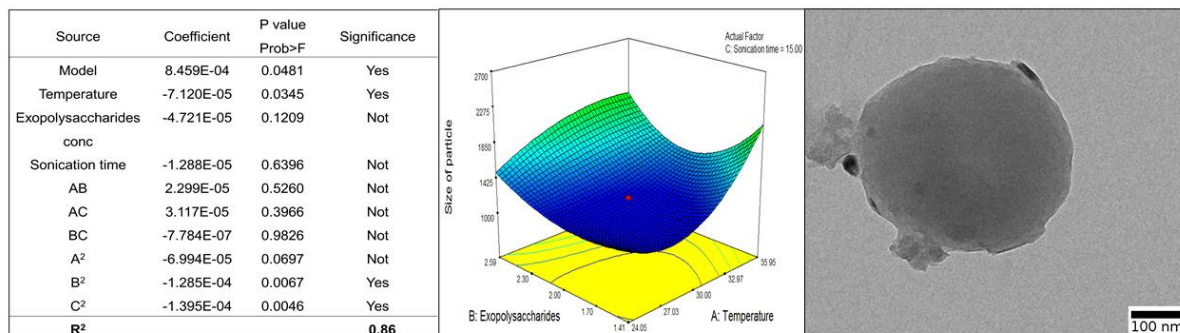


Figura 3. a) Análisis de varianza (ANOVA) de los factores (temperatura, concentración de EPS y tiempo de sonication) sobre el tamaño de partícula b) gráfica de superficie de respuesta c) imagen TEM de Ch-EPS. Variables en el modelo A: temperatura de reacción, B: cantidad de exopolisacárido y C: tiempo de sonication

7.3. Síntesis de geles núcleo-carcasa Ch-EPS-TPP

Los resultados de la segunda estrategia indicaron que el pH y el TPP promovieron la formación de geles en un rango de tamaño de 400 a 1000 nm acorde a la medición por DLS. Las muestras que presentaron el menor tamaños de partícula fueron los puntos centrales (D1 y D4), así como D8. Las muestras elegidas para la caracterización fueron D4 (pH 3.25 y 7.5 mg/ml de TPP) y D8 (pH 4.13 y 4.32 mg/ml de TPP), con tamaños de partícula de 496 y 401 nm, respectivamente. Los valores de PDI de ambas muestras fueron de 0.54 y 0.448, asegurando que la distribución de tamaños es lo más uniforme posible.

El pH es un factor clave en la síntesis de hidrogeles. A valores de pH bajos existe una alta concentración de H⁺ en el medio que conduce a la protonación de los grupos funcionales del quitosano, el EPS y el TPP. La excesiva protonación genera una carga positiva significativa en las superficies de las moléculas, generando repulsión electrostática entre las partículas en demérito de la eficiencia del entrecruzamiento (Moeini et al., 2018; Noureen et al., 2023; Pati et al., 2011). La repulsión estérica ocasiona que las partículas formadas tengan mayor tamaño como

se observa en las muestras D3, D5 y D10 (**Tabla 2**. Matriz experimental de la síntesis de los geles Ch-EPS-TPP a 30° C, 2 mg de EPS, 15 min de sonicación). Las altas concentraciones de TPP resultan en un mayor entrecruzamiento, aumentando la repulsión entre las cargas y por ende el tamaño de partícula (Pati et al., 2011; Tabrizi et al., 2018; Biswas et al., 2015).

Tabla 2. Matriz experimental de la síntesis de los geles Ch-EPS-TPP a 30° C, 2 mg de EPS, 15 min de sonicación

Código	pH	TPP (mg/ml)	Tamaño DLS (nm)	Índice de polidispersidad
D1	3.25	7.5	500 ± 15	0.688
D2	4.13	10.68	1416 ± 12	0.477
D3	2.37	4.32	904 ± 12	0.5
D4	3.25	7.5	496 ± 8	0.54
D5	2.37	10.68	844 ± 10	0.713
D6	3.25	3	498 ± 15	0.471
D7	3.25	12	1500 ± 20	0.933
D8	4.13	4.32	401 ± 10	0.448
D9	4.5	7.5	1000 ± 12	0.699
D10	2	7.5	952 ± 10	0.807

7.4. Análisis estadístico para los geles Ch-EPS-TPP

El ANOVA de la segunda estrategia indicó que los factores evaluados afectan significativamente el tamaño de los geles. Aunque el pH no fue un parámetro que mostró significancia estadística de forma individual, las interacciones con el TPP si fueron representativas (**Figura 4a**). El TPP es un agente entrecruzante ampliamente utilizado en la síntesis de geles físicos. En este trabajo se observó que al aumentar la cantidad del entrecruzante aumenta el tamaño de los geles. La explicación a este comportamiento podría atribuirse a que hay mayor cantidad de grupos funcionales disponibles pertenecientes al TPP que promueven un mayor entrecruzamiento, generando partículas más densas. El modelo, el TPP, las interacciones lineales y

cuadráticas fueron estadísticamente significativos con un $\alpha < 0.05$ y el coeficiente de determinación (R^2) mostró un ajuste considerable del 96 % (Olvera-sosa et al., 2020).

La gráfica de superficie de respuesta indicó que las condiciones óptimas a las cuales se logró obtener el menor tamaño de partícula fueron 7.5 mg/ml de TPP y un pH de 3.25 (**Figura 4b**).

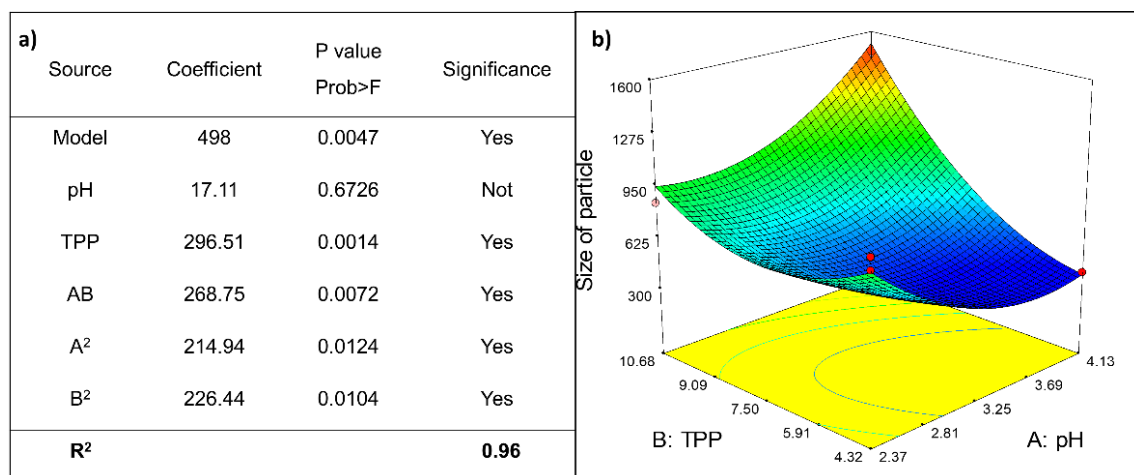


Figura 4. a) Análisis de varianza (ANOVA) de la síntesis de los geles Ch-EPS-TPP b) gráfica de superficie de respuesta. Variables en el modelo A: pH y B: Concentración de TPP

7.5. Caracterización química de los geles Ch-EPS-TPP

El espectro de los geles sintetizados y de los precursores es mostrado en la **Figura 5**. El quitosano exhibe bandas características en la región de 3372 y 3274 cm^{-1} atribuidas a vibraciones O-H y N-H, respectivamente (Moeini et al., 2018; Tomaz et al., 2018; Pati et al., 2011). A 2856 cm^{-1} se encontró una banda correspondiente a vibraciones asimétricas C-H asociada a polisacáridos (Queiroz et al., 2015). Las bandas típicas de las proteínas son encontradas a 1662 (amida I (C=O)) y 1554 cm^{-1} (amida II (N-H)) (Costa-Júnior et al., 2009; Tomaz et al., 2018; Moeini et al., 2018). En la región de la huella dactilar se aprecia una señal pronunciada localizada a 1056 cm^{-1} asignada a vibraciones en el enlace C-O-C (Antosova et al., 2009; Tathe et al., 2010; Zhang & Khademhosseini, 2017). En el caso del TPP, las vibraciones características

corresponden a vibraciones asimétricas de P=O y PO₂, así como vibraciones simétricas en PO₂, vibraciones asimétricas para PO₃ y simétricas en PO₃. Además de vibraciones asimétricas en P-O-P y vibraciones simétricas para P-O-P situadas en 1216, 1139, 1095 y 881 cm⁻¹, respectivamente (Rodrigues et al., 2012; Loutfy et al., 2016; Tomaz et al., 2018).

Los geles analizados por FTIR corresponden a las muestras que presentaron el menor tamaño de partícula (D4 y D8). La muestra D8 indica una banda notable alrededor de los 3400 cm⁻¹, la cual sugiere la posible formación de enlaces intermoleculares de hidrógeno entre los grupos P=O del TPP y los grupos O-H del EPS. Esta hipótesis podría corroborarse comparando el espectro de TPP en la región de 1100 a 1300 cm⁻¹ con el espectro de D8. En esta región, se observa desplazamiento y una drástica disminución en la intensidad de la banda del P=O del TPP, sugiriendo que la formación de puentes de hidrógeno debilitaría la banda por la formación de interacciones físicas. La literatura describe la formación de puentes de hidrógeno como cambios de posición, intensidad y forma de las bandas detectadas por espectroscopia infrarroja (Farmahini et al., 2006; Susi, 1972). En el caso de los desplazamientos, estos conllevan la disminución de vibraciones de estiramiento y aumento en las vibraciones de flexión. Se observa un desplazamiento de las bandas de los grupos amida del quitosano (1390 a 1400 cm⁻¹) y sulfatados del EPS (1421 a 1400 cm⁻¹) sugiriendo la formación de interacciones electrostáticas (Derkach et al., 2022). En la muestra D4 a 3300 cm⁻¹ se observa un pico ensanchado atribuible a distintas vibraciones de estiramiento de grupos O-H y N-H. El desplazamiento a frecuencias más bajas indica la formación de puentes de hidrógeno debido a que los enlaces involucrados en puentes de hidrógeno se debilitan y alargan, reduciendo la frecuencia de vibración (Athokpam et al., 2017; Peter J Larkin, 2011). El grupo C=O (ácido glucurónico) presenta un desplazamiento de 1650 a 1660 cm⁻¹, así como en el caso de los grupos sulfatados de 1100 a 1090 cm⁻¹. Los desplazamientos en estas bandas indicarían formación de enlaces físicos atribuibles a interacciones electrostáticas, al igual que las

bandas P=O y P-O-P que mostraron una drástica reducción en la intensidad de la señal (Ashrafi et al., 2019).

En resumen, los cambios de frecuencia encontrados en los geles D4 y D8 pueden ser originados por las interacciones físicas entre los polisacáridos (quitosano y EPS) y el polianión (TPP) debidas a interacciones intermoleculares.

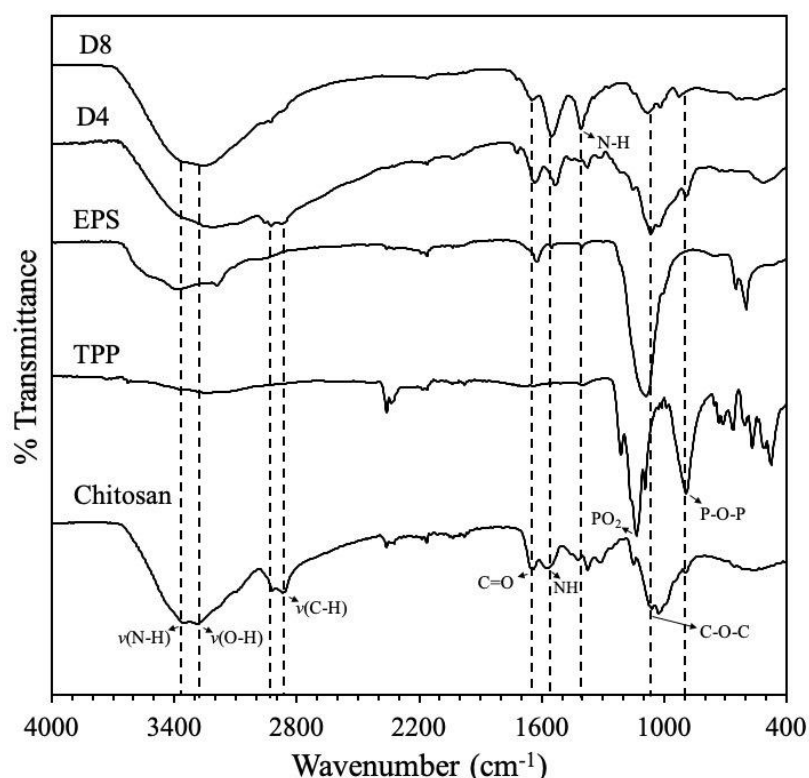


Figura 5. Espectro FTIR de quitosano, EPS, TPP, D4 y D8

7.6. Mecanismo de formación de los geles Ch-EPS-TPP

La síntesis de los geles comprende dos procesos. El primer paso consistió en la solubilización del EPS. El proceso de cavitación ayudó a fraccionar la estructura del polisacárido, promoviendo la solubilización y la interacción con el quitosano. La gelación involucró el entrecruzamiento de las especies iónicas encontradas en los polisacáridos; los grupos aminos (NH_3^+) de carácter positivo provenientes del

quitosano y los aniones del EPS, grupos sulfato (O-SO_3^-) y carboxilato (CO_2^-). Obteniéndose geles esféricos entrecruzados por interacciones intermoleculares.

El segundo paso consistió en la adición de un agente entrecruzante; los geles físicos obtenidos en el primer paso son débiles debido a la naturaleza de su entrecruzamiento. Debido a esto se decidió adicionar una gente entrecruzante para mejorar la estabilidad estructural. El TPP se adicionó gota a gota a la solución de quitosano y EPS posterior a la sonicación. El mecanismo de formación de las partículas núcleo-carcasa podría atribuirse a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos O-H del EPS y NH_3 del quitosano (remanentes superficiales de los geles Ch-EPS) y los grupos P=O del TPP (**Figura 6**).

Estas conclusiones pueden apoyarse con espectroscopia infrarroja y el mapeo de elementos químicos realizado a los geles (**Figura 5** y **Figura 6**, respectivamente). Los espectros obtenidos mostraron corrimientos en las bandas asociadas a grupos amino, hidroxilo, fosfato y sulfato, indicando entrecruzamiento asociado la formación de interacciones iónicas y puentes de hidrógeno. En el caso del mapeo el cual se discutirá con mayor detalle posteriormente, se puede observar que la distribución de los elementos es consistente con el mecanismo propuesto. El carbono está presente en la carcasa y el núcleo, siendo el componente mayoritario de la partícula. El oxígeno al igual que el carbón esta diseminado en toda la estructura. Pero se aprecia mayoritariamente en la carcasa, siendo asociado al TPP. En el caso del azufre se observan pocos puntos en el núcleo, siendo su mayor concentración detectada en la carcasa. Indicando que el entrecruzamiento del núcleo es llevado a cabo por los carboxilatos y los grupos amino en mayor proporción que los sulfatos. Los cuales acorde al análisis, quedarían en la superficie de los geles. Por otro lado, el fósforo se encuentra concentrado en la carcasa, enlazándose mediante interacciones intermoleculares con los grupos amino y sulfato remanentes en la superficie del núcleo.

Diversas investigaciones han reportado la obtención de estructuras núcleo-carcasa como sistemas de liberación de fármacos o vehículos de entrega de antígeno. La síntesis se basa en estrategias supramoleculares o la formación de enlaces

covalentes. Chen y su equipo desarrollaron geles a base de proteína de soya y polisacáridos solubles de soya, sugiriendo interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Los geles obtenidos tuvieron un rango tamaño de 100 a 500 nm y presentaron una eficiencia de carga de curcumina superior al 90% (Chen et al., 2016). El aprovechamiento de interacciones físicas para el diseño de estructuras tipo núcleo-carcasa ha sido documentada por diversos autores. Zhang et al., 2022 describen en su trabajo la generación de partículas de gliadina y polisacáridos de tremella unidos mediante puentes de hidrógeno formados entre los grupos amida y carbonilo de la gliadina y los grupos hidroxilo pertenecientes a los polisacáridos de la tremella (Zhang et al., 2022).

Por otra parte, la obtención de geles núcleo-carcasa a través de interacciones covalentes fue descrita por Auriemma et al., 2020, quienes desarrollaron geles de pectina (núcleo) y alginato de zinc (carcasa) para la encapsulación de betametasona de administración oral (Auriemma et al., 2020). Partículas de la misma naturaleza fueron reportadas por Guo y su equipo de investigación. Se sintetizaron geles de gelatina/alginato basadas en interacciones híbridas, covalentes y no covalentes. El mecanismo de formación del núcleo de gelatina con glutaraldehído se explica por la reacción de los grupos aldehído con los grupos amino libres ($-NH_2$) de lisina o hidroxilisina mediante una adición nucleofílica. Esta reacción se favorece en pH neutro a ligeramente alcalino. Primero, los grupos amino se adicionan nucleofílicamente a los grupos carbonilo del aldehído, formando un intermedio inestable llamado carbinolamina (Arris et al., 2010). Luego, la protonación del grupo $-OH$ y la pérdida de una molécula de agua generan las bases de Schiff conjugadas. La formación de la carcasa conlleva interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilo desprotonados ($-COO^-$) del alginato y los grupos amino protonados ($-NH_3^+$) de la gelatina (Guo et al., 2018).

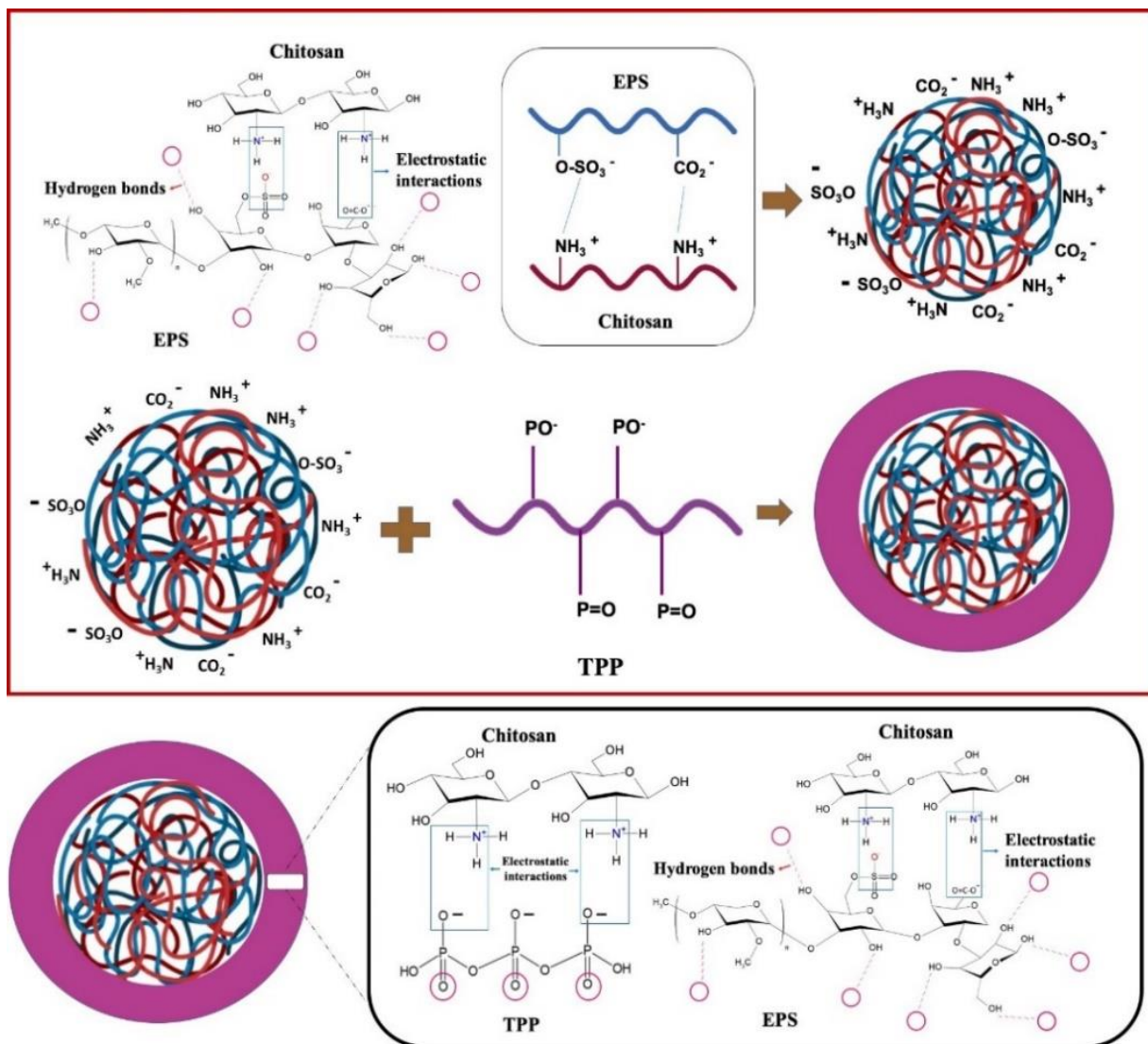


Figura 6. Mecanismo de formación de los geles núcleo carcasa. La gelación iónica se logró mediante el entrecruzamiento de las especies encontradas (NH_3^+ , O-SO_3^- y CO_2^-) través de fuerzas intermoleculares

7.7. Tamaño y morfología

Las imágenes TEM de las muestras D4 y D6 indican partículas esféricas y partículas tipo núcleo-carcasa bien definidas. Los tamaños se encuentran entre los 100

nm para ambos casos. Los resultados sugirieron que el núcleo está compuesto por quitosano y EPS entrecruzados mediante interacciones electrostáticas del tipo iónicas, mientras que la carcasa se conforma principalmente por TPP interaccionando con grupos superficiales encontrados en el núcleo (grupos amino e hidroxilo provenientes del quitosano y EPS, respectivamente) a través de puentes de hidrógeno e interacciones iónicas (como se describió en el mecanismo de formación de los geles). La literatura reporta la formación de estructuras núcleo-carcasa formadas mediante interacciones electrostáticas como nano-vehículos con un tamaño de 40 nm. Para la entrega de doxorrubicina, se observó que estas partículas penetran a mayor profundidad la densa matriz extracelular de los tumores sólidos (L. Chen et al., 2015).

La medición de los tamaños de partícula por DLS registró un rango de 401 a 496 nm, para D8 y D4, respectivamente. Estos tamaños presentan una diferencia significativamente alta respecto a la medición por TEM, donde los rangos oscilaron entre los 100 nm para ambas muestras. Estas diferencias son atribuibles a los residuos remanentes del proceso de síntesis (**Figura 7**) o a la aglomeración de las micropartículas. El tamaño de partícula se relaciona directamente con la aplicación clínica del material. Se ha reportado que tamaños del orden micrométrico ($> 0.5 \mu\text{m}$) generan una respuesta inmune mediada por fagocitosis promoviendo una respuesta inmunitaria humoral. Las partículas entre 200 y 300 nm inciden directamente en la respuesta inmune, siendo fácilmente capturadas por las células dendríticas, mientras que partículas más chicas (20-200 nm) son transportadas por endocitosis generando una respuesta inmune celular (Hellfritzsche & Scherließ, 2019). En el caso de administración de fármacos, se ha encontrado que partículas con tamaños alrededor de 1-100 nm pueden infiltrarse fácilmente en tumores densos, mejorando las terapias contra el cáncer (Aieneravaie et al., 2020).

El potencial Z es una propiedad física que relaciona la movilidad de partículas en suspensión en presencia de un campo eléctrico (Angel-Olarte et al., 2019; Jagdale & Karekar, 2020). Por tanto, es un indicador que predice la estabilidad de partículas basándose en las interacciones electrostáticas que ocurren en la superficie de las

mismas, determinando su tendencia a la aglomeración o dispersión. La literatura reporta que los sistemas con valores entre -30 y +30 mV estabilizan la suspensión mediante repulsión electrostática (Chatterjee et al., 2019; Huynh et al., 2009).

La determinación del potencial Z para D4 arrojó un valor de ± 27 mV, indicando estabilidad media asociada a la repulsión de las cargas superficiales (Chatterjee et al., 2019; Loutfy et al., 2016). El signo positivo indica que las cargas superficiales están regidas por los grupos catiónicos del quitosano. Estas cargas positivas generan repulsión entre los geles, evitando así la aglomeración.

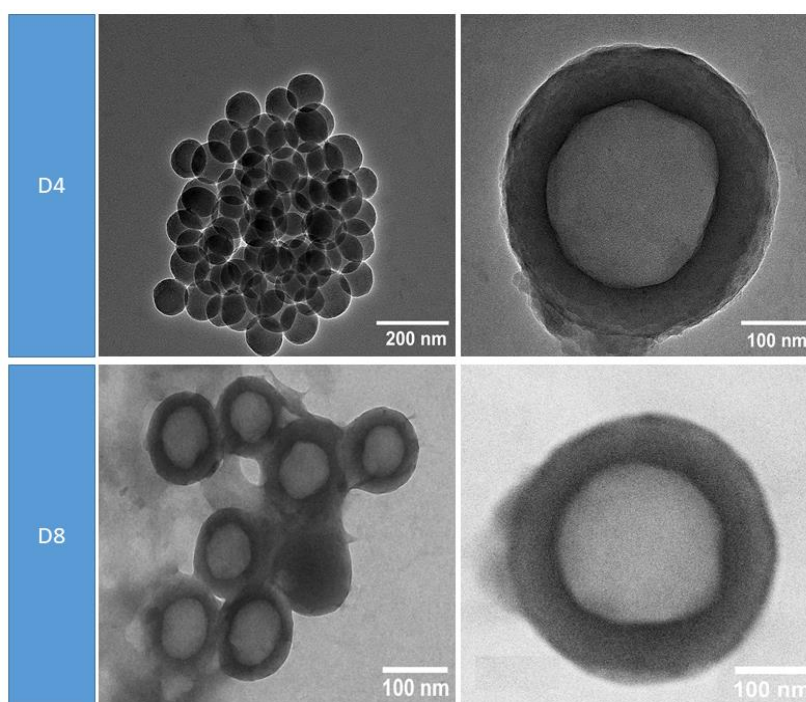


Figura 7. Imágenes TEM de las muestras D4 (Condiciones de síntesis pH 3.25 y 7.5 mg/ml de TPP) y D8 (condiciones de síntesis pH 4.13 and 4.32 mg/ml de TPP). Derecha partículas núcleo carcasa, izquierda aglomerado de partículas núcleo-carcasa y partículas solidas

7.8. Mapeo de elementos químicos

En la **Figura 8** se observamos el patrón de distribución de los elementos analizados (C, S, O y P) en la muestra D4, analizados mediante espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDS). El mapeo de elementos indicó que el azufre (color amarillo) está disseminado en toda la partícula, concentrándose principalmente en la carcasa De

acuerdo con el mecanismo, durante la primera etapa de la síntesis, los grupos carboxilato del EPS interactúan iónicamente con los grupos amino del quitosano, formando el núcleo sólido de la partícula. La menor participación de los grupos sulfatados en esta etapa inicial sugiere que estos grupos se orientan hacia la superficie, donde contribuyen a la formación de la carcasa externa. Los grupos sulfatados y amino remanentes en la superficie interactúan para estabilizar la carcasa. El fósforo (color blanco), procedente del tripolifosfato de sodio (TPP), se observa mayoritariamente en la carcasa de la partícula núcleo-carcasa. Esta distribución indica que el TPP está participando activamente en el entrecruzamiento de los grupos funcionales superficiales. Específicamente, los grupos fosfato del TPP forman enlaces iónicos con los grupos amino del quitosano, estabilizando la estructura de la carcasa mediante interacciones electrostáticas. Además, los grupos hidroxilo y amino en la superficie, procedentes del EPS y del quitosano, respectivamente, contribuyen al entrecruzamiento adicional mediante puentes de hidrógeno. El oxígeno (color rosa), al igual que el azufre, se encuentra distribuido en toda la partícula, con una mayor concentración en la carcasa. Esto es consistente con la presencia de grupos hidroxilo del EPS y del quitosano, que participan en la formación de puentes de hidrógeno.

En resumen, el mapeo elemental proporciona una confirmación visual del mecanismo de formación propuesto para los geles Ch-EPS-TPP. La distribución específica de los elementos S, P y O respalda la idea de que las interacciones iónicas y los puentes de hidrógeno juegan roles cruciales en la estabilización de la estructura núcleo-carcasa, con los grupos funcionales orientándose de manera que maximicen estas interacciones en la carcasa superficial.

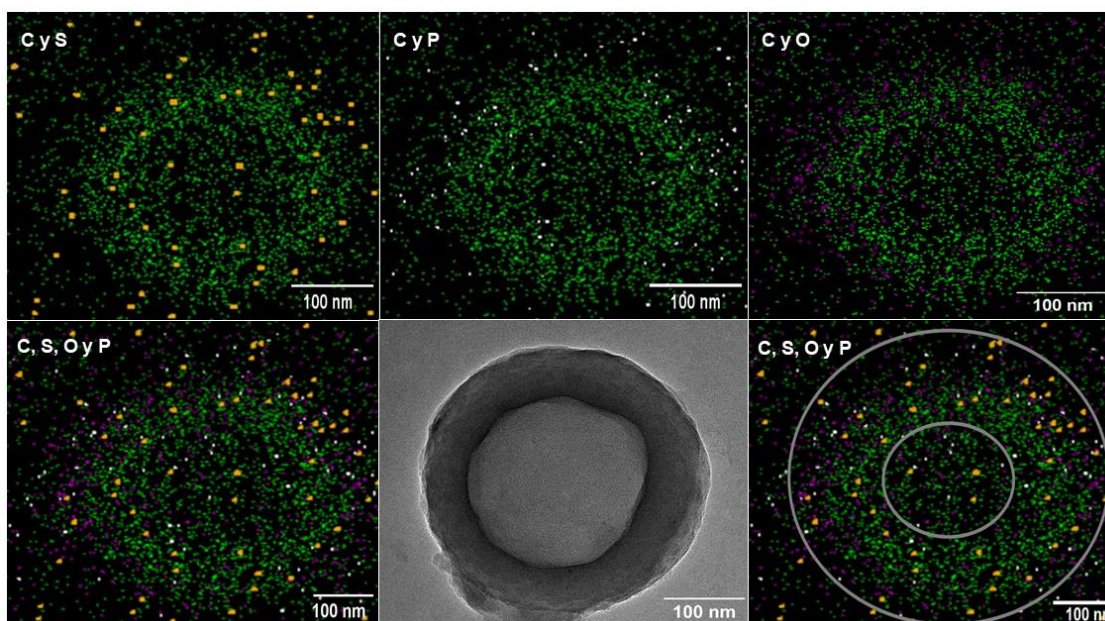


Figura 8. Mapeo de elementos químicos de la muestra D4 mediante la técnica de EDS correspondientes a carbón (verde), azufre (amarillo), oxígeno (rosa) y fósforo (blanco).

7.9. Análisis térmico

Se analizó la estabilidad térmica de los geles Ch-EPS, Ch-EPS-TPP y de los precursores (EPS, TPP y quitosano). El análisis termogravimétrico (TGA) indicó que la primera etapa de degradación ocurre de 30 a 130 °C para todas las muestras analizadas. La pérdida de masa en este rango de temperatura está asociada a la evaporación de agua contenida en las muestras. En el caso del quitosano, a 289 °C ocurre un pico de degradación atribuido a despolimerización y rompimiento de enlaces glicosídicos. El TPP y el EPS mostraron mayor estabilidad térmica al perder un 5 y 10 % de masa. En el caso del EPS, se asocia a la pérdida de agua adsorbida físicamente a los grupos carboxilatos (Cerchezan et al., 2022).

El gel Ch-EPS presentó dos etapas de degradación: la primera a 205 °C y la segunda a 249 °C. Estas etapas se pueden relacionar con la despolimerización de los polisacáridos componentes. En contraste, el gel Ch-EPS-TPP mostró una mayor estabilidad térmica, con un solo pico de degradación observado a 257 °C, ocho grados

más alto que el Ch-EPS. Este aumento en la estabilidad térmica puede atribuirse a la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas entre los grupos amino, carboxilato y sulfato del núcleo, y los grupos del TPP en la carcasa.

La mayor estabilidad térmica del gel Ch-EPS-TPP sugiere que la adición de TPP fortalece la estructura del gel, lo que coincide con el mecanismo de formación propuesto para las partículas (**Figura 9**). Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que han demostrado que la incorporación de agentes entrecruzantes como el TPP puede mejorar significativamente las propiedades térmicas de los sistemas poliméricos.

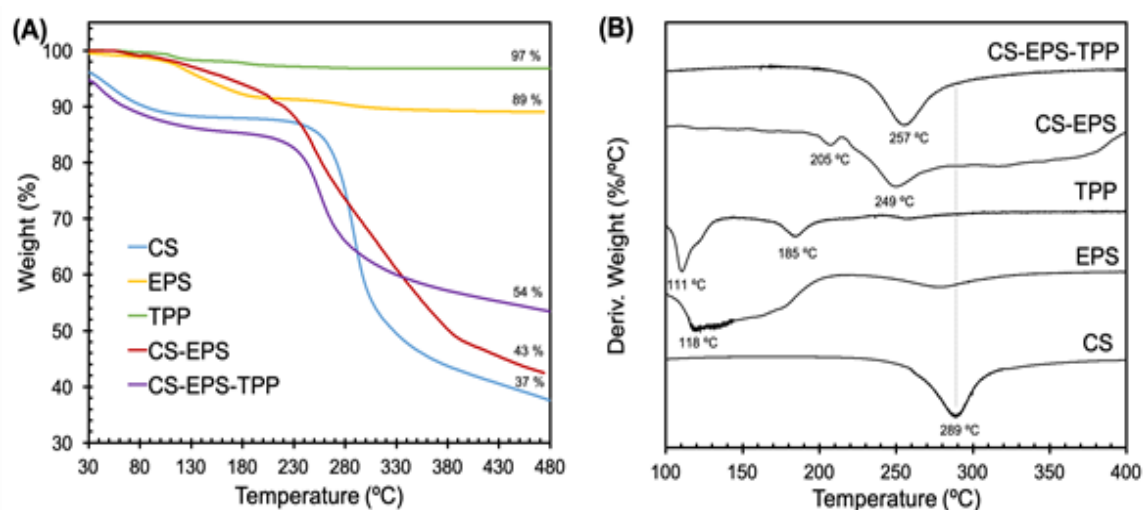


Figura 9. Análisis termogravimétrico (TGA) de las muestras quitosano (CS), EPS, TPP, Ch-EPS y Ch-EPS-TPP

7.10. Ensayo de mucoadhesividad

El epitelio mucosal es el tejido que recubre las superficies internas de órganos y cavidades del cuerpo que están en contacto con el exterior, como el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, el tracto genitourinario y algunas partes del oído y la cavidad nasal. La función esencial del epitelio es la protección, actuando como barrera física contra agentes externos como patógenos, toxinas o algún agente extraño. El epitelio está recubierto por moco, una capa viscosa que tiene la capacidad

de interaccionar con partículas con cargas opuestas, aumentando el tiempo de residencia en el epitelio. Esta característica se denomina mucoadhesión y es de vital importancia en el desarrollo de vehículos de entrega de antígenos (Boddupalli et al., 2010; Boegh & Nielsen, 2015; Andrews et al., 2009).

La adhesión es un proceso entre la unión de dos superficies. La terminología varía según el contexto del que se trate. En sistemas biológicos es denominada bioadhesión, y si se lleva a cabo en las mucosas es llamada mucoadhesión (Andrews et al., 2009). La mucoadhesividad o mucoadhesión es un parámetro clave en el desarrollo de materiales con aplicaciones en vías mucosales (orales o nasales) y representa la capacidad de un material de adherirse al epitelio mucosal mediante interacciones intermoleculares. La mucosa nasal está compuesta por glicoproteínas (mucinas), oligosacáridos, agua, además de residuos sulfatados de ésteres y grupos carboxílicos provenientes del ácido siálico que le confieren carácter negativo (Boegh & Nielsen, 2015). El mecanismo de mucoadhesión sugiere interacción entre cargas eléctricas opuestas entre el epitelio mucosal, cargado negativamente y materiales como vehículos de entrega de antígeno o sistemas de liberación de fármacos cargados positivamente (Carvalho et al., 2010; Revuri et al., 2017; Andrews et al., 2009).

En el desarrollo de vacunas, los materiales adhesivos prolongan el tiempo de contacto con epitelio mucosal, lo que promueve que las células inmunológicas circundantes fagociten el material y comience el proceso de presentación de antígeno. En el caso de liberación de fármacos, la mucoadhesividad puede mejorar la biodisponibilidad del fármaco y el tiempo de residencia. Sinh et al., 2023 reportó que hidrogeles a base de moringa presentaron una capacidad de adhesión de 109 mN, la cual se adjudica a los enlaces que se forman entre los grupos -COOH y -OH del gel con los grupos funcionales de las glicoproteínas encontradas en la mucosa del epitelio intestinal (Singh et al., 2023).

Boni et al., 2021 diseñaron distintos compositos a base de goma gelana, almidón y pectina entrecruzados con iones de aluminio y calcio para explorar la modulación de la mucoadhesividad en las distintas formulaciones. Los resultados mostraron que

los geles sintetizados exhibieron porcentajes de adsorción de mucina 84 a 97 % (Boni et al., 2021). Otros materiales como las microcápsulas de quitosano mostraron porcentajes más bajos de adsorción de mucina (70 %) al ser evaluados como sistema de liberación oral de ciclosporina (Jaafari, 2008).

En este trabajo se evaluó el porcentaje de mucoadhesividad en las muestras con menor tamaño de partícula. Los resultados indicaron que D4 y D8 presentaron una capacidad de adsorción de mucina superior al 85 % para ambas concentraciones de mucina. En el caso de 1 mg/ml, D8 mostró un porcentaje mayor (93.5 %) respecto a D4 (92.8 %). Un comportamiento opuesto fue observado en la concentración de 0.5 mg/ml (**Figura 10**), en donde D4 mostró una capacidad ligeramente mayor de adsorción de mucina (93.1 %) respecto a D8 (92 %). En conclusión, los geles Ch-EPS-TPP mostraron características mucoadhesivas para ser empleados en vías de administración mucosales.

La capacidad de adhesión de los geles Ch-EPS-TPP se puede correlacionar con la determinación del potencial zeta. El valor obtenido de este ensayo fue de 27 mV, lo que indica, como se mencionó anteriormente, que existe una estabilidad media asociada a la repulsión generada posiblemente por los grupos NH_3^+ en la carcasa. La naturaleza de estas cargas genera interacciones electrostáticas con las especies aniónicas encontradas en la mucina, promoviendo la mucoadhesión.

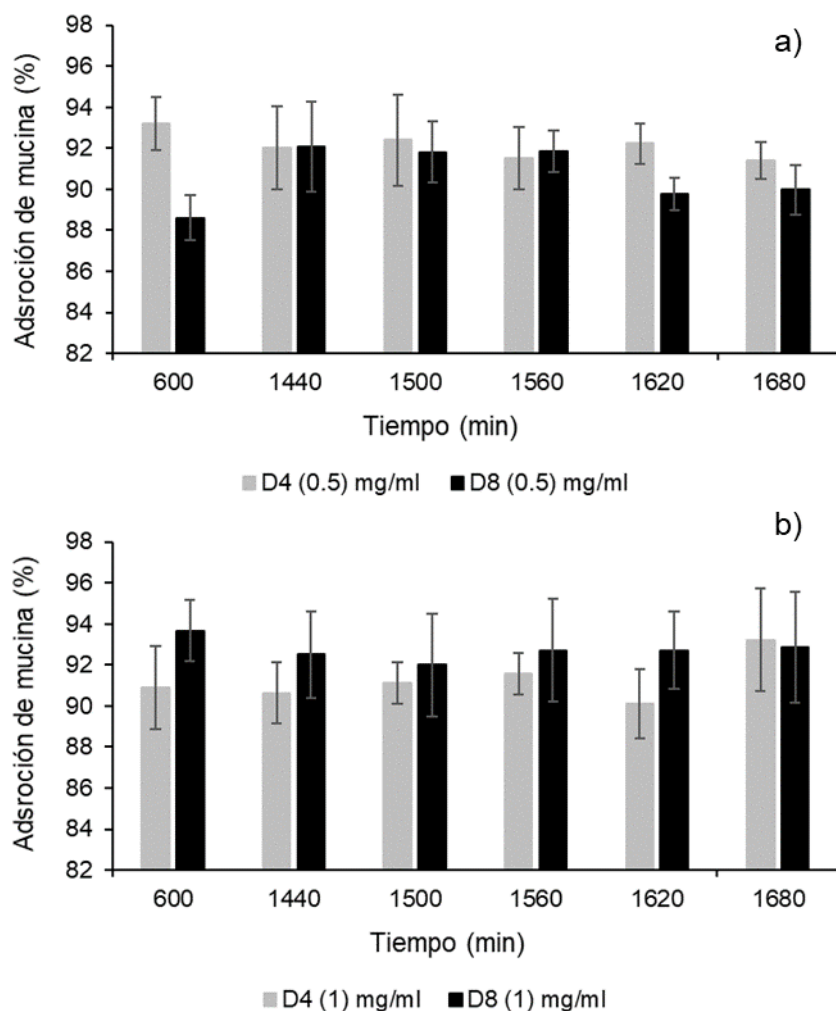


Figura 10. Gráfica del ensayo de mucoadhesividad en las muestras D4 y D8 para concentraciones de a) 0.5 mg/ml y b) 1 mg/ml

7.11. Capacidad de carga en una proteína modelo

El proceso de adsorción de la BSA en los geles implica un mecanismo de interacción entre cargas eléctricas opuestas. El punto isoeléctrico proporciona información sobre la carga neta superficial de una molécula, indicando el pH al cual una proteína tiene una carga neta cero (Salg et al., 2012; Bukackova et al., 2018; Li et al., 2016). En el caso de la BSA, al pH del experimento (7.4) presenta una carga

negativa (ver gráfica en el anexo), que se asocia a los aminoácidos aniónicos como el ácido aspártico y el ácido glutámico (Kubiak-Ossowska et al., 2017).

Los resultados de la evaluación de la capacidad de carga de BSA en la muestra D4 indicaron un porcentaje máximo de adsorción del 54 % después de 144 horas (**Figura 11**). Comparativamente, en otros sistemas, las partículas de quitosano recubierto de alginato han mostrado una adsorción del 70 % de proteína (Li et al., 2008), mientras que los hidrogeles a base de quitosano han reportado hasta un 90 % de adsorción de BSA (Yadav & Yadav, 2021). Esta diferencia puede atribuirse a las variaciones en las composiciones y estructuras de los geles utilizados en cada estudio.

El pH de la solución amortiguadora (7.4) asegura que la BSA esté cargada negativamente, facilitando su interacción electrostática con los grupos superficiales positivos del gel D4, compuesto de quitosano-EPS-TPP. La carga negativa de la BSA se debe principalmente a la desprotonación de sus grupos carboxilo, mientras que los grupos amino protonados del quitosano en el gel D4 proporcionan las cargas positivas donde surge interacción electrostática. La adsorción observada en este estudio es relativamente baja en comparación con algunos estudios previos. Este fenómeno podría explicarse por la mayor estabilidad y menor disponibilidad de sitios activos en la estructura núcleo-carcasa de los geles, comparado con otros sistemas de liberación de fármacos. La literatura indica que los sistemas de liberación de fármacos con estructuras núcleo-carcasa, como los reportados por Chen et al. (2015) muestran una capacidad de penetración y liberación controlada, lo cual puede ser crucial para aplicaciones específicas, como la administración de doxorrubicina en tumores sólidos (Chen et al., 2015).

En resumen, la adsorción de BSA en los geles D4 demuestra la importancia de la interacción electrostática en la eficacia de los sistemas de liberación de fármacos y subraya la necesidad de optimizar las condiciones experimentales y la composición del material para maximizar la capacidad de carga y la estabilidad de los geles en diferentes aplicaciones médicas.

Los resultados de la evaluación de capacidad de carga de BSA en la muestra D4 indicaron que se logró un porcentaje máximo de adsorción de 54 % después de 144 h. La BSA como proteína modelo ha sido estudiada en otros sistemas, como las partículas de quitosano recubierto de alginato adsorbiendo un 70 % de proteína. Otro ensayo reporta 90 % de adsorción de BSA en hidrogeles a base de quitosano. La BSA se encuentra cargada negativamente a un pH de 7.4 (valor pH de la solución amortiguadora), enlazándose electrostáticamente con los grupos superficiales positivos de la muestra D4.

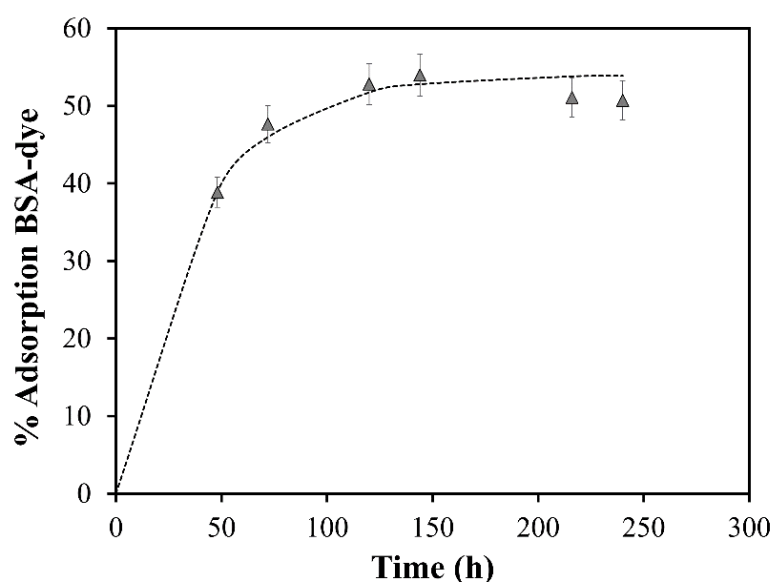


Figura 11. Capacidad de carga de BSA en D4, modelo de primer orden

7.12. Ensayo de estabilidad al frío

En el diseño de vacunas, la evaluación de la estabilidad térmica a bajas temperaturas es un parámetro importante. Por ejemplo, la vacuna contra COVID 19 diseñadas por Pfizer, la vacuna MMRII® (rubeola, sarampión y paperas), ERVEBO® (vacuna contra el Ébola) y la vacuna Moderna contra COVID 19 requieren temperaturas de almacenamiento especialmente críticas como -50°, -80°, -20° y -50°C, respectivamente (Kumru et al., 2014; Max, 2021), (C. for D. and C. and Prevention,

2021; C. for D. and C. Prevention, 2023). Algunos componentes vacunales como ADN, ARN, péptidos y proteínas son sensibles e inestables y requieren condiciones específicas. En este estudio se evaluó la estabilidad de los geles bajo condiciones de congelamiento a -20°C por 5 meses. Las muestras fueron analizadas por imágenes TEM para observar la morfología de los geles una vez descongelados. En la **Figura 12** se observan las distintas regiones de la rejilla para la muestra D4 y D8. En la muestra D4 se observa que el núcleo se contrajo (**Figura 12b**), posiblemente asociado a un proceso hidrolítico entre los polisacáridos debido al agua absorbida durante el hinchamiento. Al comenzar el proceso de descongelamiento, el agua se descongela causando la hidrólisis y colapsa la estructura causando aglomeración de los polisacáridos del núcleo (Harnkarnsujarit et al., 2016). Otro estudio llevado a cabo por Qu et al. (2000) sugiere repulsión electrostática entre los grupos amino de hidrogeles a base de quitosano. En medios ácidos, la repulsión ocasiona expansión en la cadena tridimensional, absorbiendo más agua que promueve el proceso hidrolítico (Albertsson et al., 2000). En el proceso de hinchamiento el agua absorbida en la estructura forma cristales de hielo durante el congelamiento. Esos cristales se expanden dejando huecos al descongelarse, formando poros en el núcleo como se observa en la **Figura 12c**. Este proceso de formación de poros ha sido descrito por diversos autores (Genevro et al., 2019; Kang et al., 1999; Yuan et al., 2009).

A diferencia de D4 donde el shell (carcasa) fue más estable, en D8 el núcleo mostró mayor resistencia. En conclusión, los parámetros de síntesis son un factor crucial de este ensayo. D4 tuvo aproximadamente el doble de la concentración de TPP que D8, favoreciendo la estabilidad estructural de la carcasa.

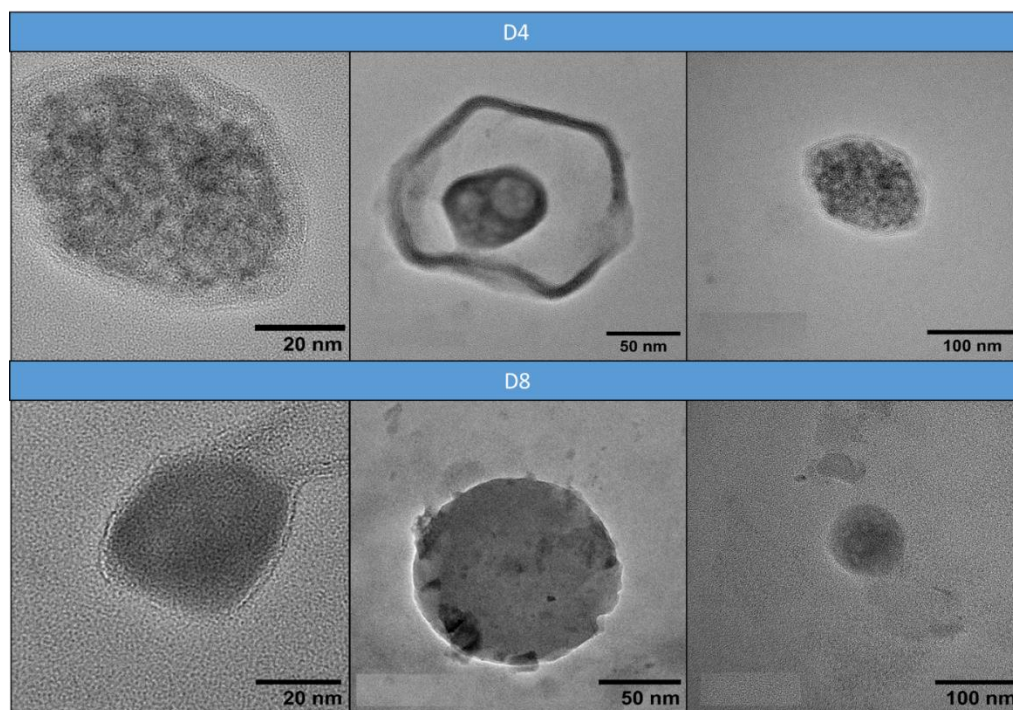


Figura 12. Imágenes TEM del ensayo de estabilidad al frío en las muestras D4 y D8, llevadas a cabo a -20°C por 5 meses

7.13. Evaluación del efecto del pH en la estabilidad en los microgeles

El pH es un factor crucial en el diseño de materiales para aplicaciones biomédicas, específicamente en la administración oral de medicamentos. El sistema digestivo humano presenta una variedad de pH que los materiales deben soportar. En el esófago, el pH es aproximadamente 6, mientras que en el estómago el pH puede variar entre 1 y 3 debido a la presencia de ácido clorhídrico. El duodeno, que es la primera parte del intestino delgado, presenta un pH que varía de 4 a 7, volviéndose gradualmente más alcalino a medida que los alimentos y los medicamentos se mueven hacia el intestino delgado y el colon.

El pH es un factor clave que afecta la estructura del material que constituye los sistemas de liberación. Por ejemplo, un estudio sobre geles de alginato/quitosano demostró que el pH influye en la estructura y la capacidad de liberación de fármacos. El quitosano, un polímero con grupos amino, es sensible a los cambios de pH, lo que

afecta su solubilidad y su capacidad para formar redes gelificadas. En condiciones ácidas, los grupos amino del quitosano se protonan, lo que aumenta su solubilidad y favorece la formación de geles más densos y compactos. Sin embargo, en condiciones alcalinas, los grupos amino del quitosano se desprotonan, reduciendo su solubilidad y la integridad del gel (Gierszewska et al., 2018). Este ejemplo subraya la importancia de considerar el pH en el diseño de geles para la administración de fármacos, ya que las condiciones del entorno pueden afectar significativamente la eficacia del sistema de liberación.

El experimento consistió en simular las condiciones de pH de distintos órganos del sistema digestivo, esófago (pH 6), estómago (pH 1-3) y duodeno (pH 4-7). Los pH evaluados fueron 3, 6 y 10. El efecto del pH sobre la morfología de los geles fue evaluado mediante la variación del tamaño de partícula respecto al tiempo. Al finalizar el experimento las muestras de los 3 pH evaluados se analizaron por microscopía TEM para determinar el efecto en la morfología de los geles.

Los resultados indicaron que los geles fueron sensibles a los pH evaluados. Se registró un aumento del tamaño de partícula medido por DLS, encontrándose a 1440 min el valor más alto (**Figura 13b**). El aumento de tamaño se relaciona directamente con la degradación de los geles, siendo confirmado por TEM (**Figura 13a**), observándose la disociación de la carcasa. La inestabilidad de las partículas puede describirse a partir de las cargas. A pH bajos proliferan los protones en el medio enlazándose a los grupos $P=O$ del TPP, debilitando la interacción con el núcleo. A pH altos, predominan los grupos hidroxilos protonando al TPP, causando degradación estructural.

En conclusión, el tiempo de contacto determina fortaleza de la estructura, ya que hasta aproximadamente 180 min no se observa un aumento drástico en el tamaño de partícula. Sin embargo, el tiempo que tarda en desplazarse un fármaco en el sistema digestivo varía de 1 a 6 h, dependiendo de varios factores, por lo tanto, el vehículo o acarreador debe permanecer inerte o estable para evitar la degradación del principio activo en ese lapso de tiempo

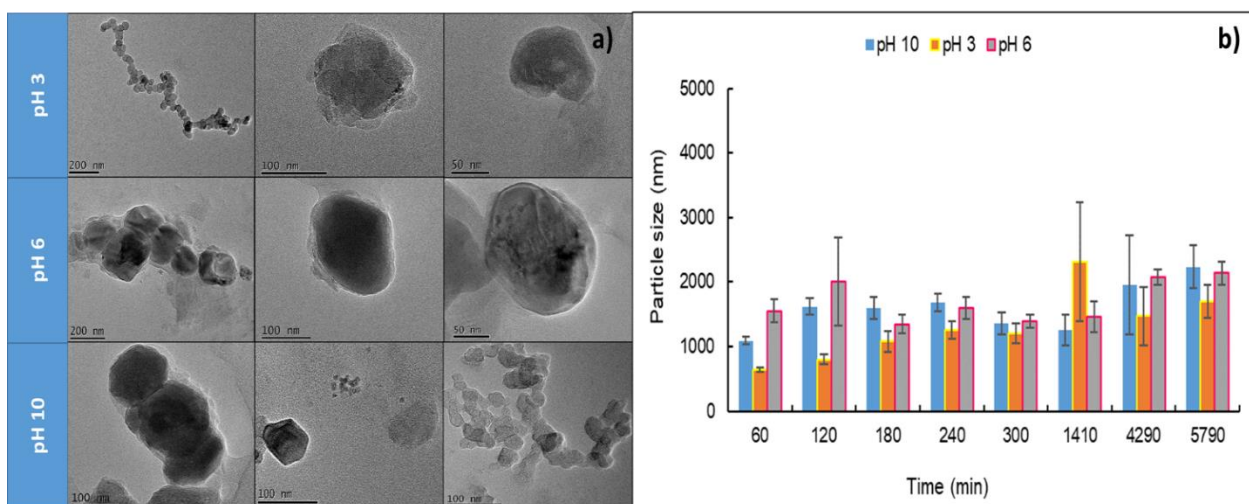


Figura 13. a) Imágenes TEM y b) gráfica del efecto del pH sobre la muestra D4

7.14. Ensayo biológico de los microgeles

El ensayo de viabilidad conducido en células HEK 293-T, no mostró indicios de citotoxicidad en el rango de concentraciones de microgeles evaluadas (**Figura 14**), comparativamente el control con H₂O₂ indicó un decremento en la viabilidad celular a 10% ($p < 0.05$). Resultados equivalentes fueron reportados en la línea celular L929 y en células dendríticas JAW II (Chuang et al., 2020).

Estudios similares reportan la evaluación de actividad antioxidante y antiinflamatoria de los exopolisacáridos de *Porphyridium cruentum*. El ensayo fue llevado a cabo empleando dos líneas celulares: queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT) y fibroblastos murinos inmortalizados (Balb/c-3T3). Ambas líneas células presentaron un porcentaje de viabilidad celular superior al 90% en todas las concentraciones evaluadas. Los autores proponen una relación directa entre la actividad antioxidante y la viabilidad celular observada, ya que la actividad antioxidante del EPS inhibe la formación de especies reactivas de oxígeno que afectan los procesos metabólicos, evitando así el daño celular (Liberti et al., 2023).

Se ha investigado la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los exopolisacáridos de *Porphyridium aerugineum* en células humanas tumorales (MCF-7

y HeLa) y células sanas (BJ, fibroblastos de piel humana normal). Se observó una reducción en la viabilidad celular de la línea MCF-7, la cual fue dependiente de la concentración de exopolisacárido; mientras que en el caso de HeLa y BJ no se observó citotoxicidad. Este comportamiento podría deberse a la expresión diferencial de receptores de exopolisacáridos en dichas líneas celulares (Ivanova et al., 2024).

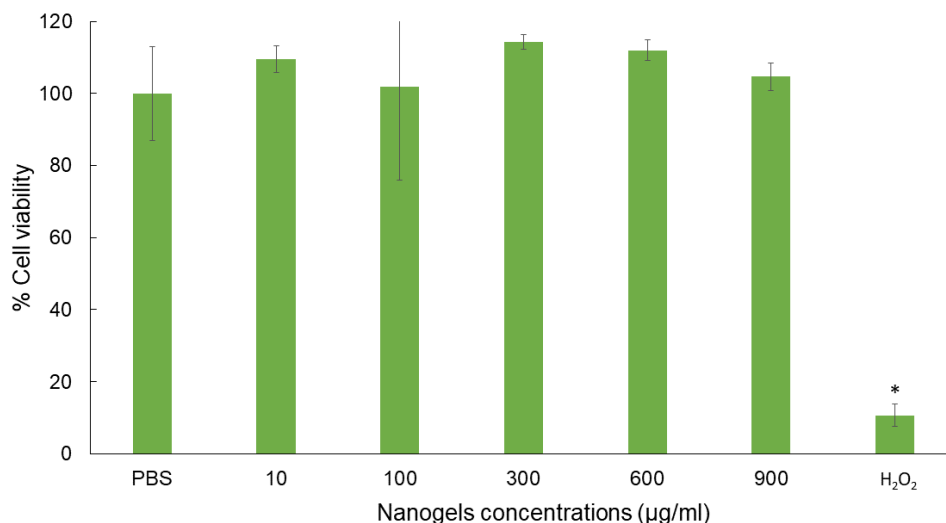


Figura 14. Evaluación de la citotoxicidad de la muestra D4 en la línea celular HEK-293T. Las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células y fueron tratadas en un rango de concentración de gel de 10-900 $\mu\text{g/ml}$, H_2O_2 o PBS e incubadas por 72 h. La viabilidad celular fue evaluada por el método de la resazurina. La viabilidad celular fue calculada como % respecto al control (PBS). El ensayo fue realizado por triplicado. Los asteriscos denotan diferencias estadísticas ($P < 0.05$) respecto al tratamiento con PBS.

El análisis en esplenocitos de ratón denota que la viabilidad celular decrece ligeramente conforme aumenta la concentración de hidrogeles (**Figura 15**), las células expuestas a 300 $\mu\text{g/ml}$ redujeron su viabilidad a cerca de un 20 % ($P < 0.05$).

En resumen, con base en el ensayo de citotoxicidad en ambos tipos de células, se concluyó que los geles en general estimulan en crecimiento celular.

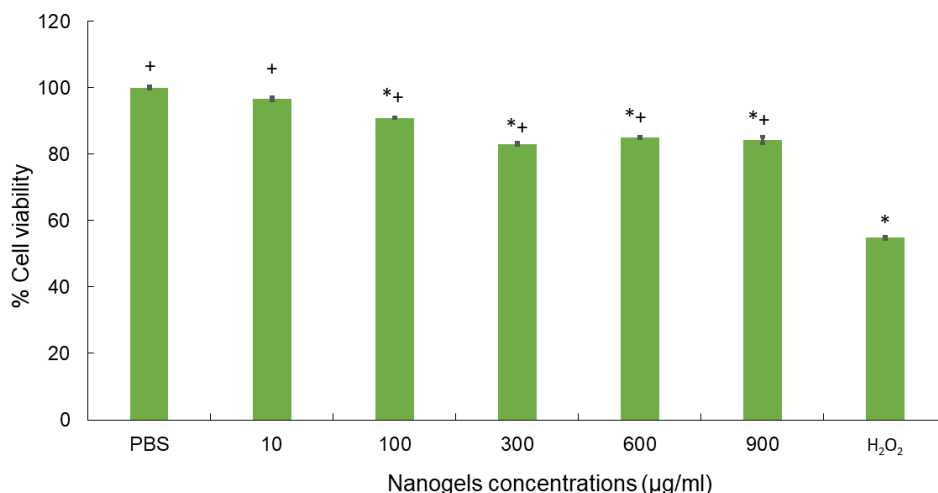


Figura 15. Evaluación citotóxica de la muestra D4 en esplenocitos de ratón. Las células fueron sembradas a una densidad de 1×10^6 células y fueron tratadas en un rango de concentración de gel de 10-900 µg/ml, H₂O₂ o PBS e incubadas por 72 h. La viabilidad celular fue evaluada por el método de la resazurina. La viabilidad celular fue calculada como % respecto al control (PBS). El ensayo fue realizado por triplicado. Los asteriscos denotan diferencias estadísticas ($P < 0.05$) respecto al tratamiento con PBS.

Los EPS de *Porphyrium* tienen propiedades antiinflamatorias, hipocolesterolémicas, inmunomoduladoras, antimicrobianas, antitumorales antiparasitarias y antivirales (Cifuentes & Herrero, 2019; Kathiresan et al., 2007) que pueden ser aprovechadas para el diseño de plataformas de administración o vehículos de entrega de antígeno. La adición de quitosano al sistema para el diseño de compositos puede potenciar éstas características haciendo sinergia con su capacidad de adhesión, biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas y antivirales, por mencionar algunas (Abkar et al., 2018; Loutfy et al., 2016; Lin et al., 2014; Carroll et al., 2016).

Diversos reportes bibliográficos se centran en el estudio de las propiedades inmunogénicas y antitumorales de los exopolisacáridos de *Porphyridium*. Los exopolisacáridos con distintos pesos moleculares poseen características diversas. Gargouch et al., 2021 analizaron el potencial antibacterial y antitumoral de 3 distintas

fracciones del polisacárido. Las fracciones con menor peso molecular redujeron la viabilidad celular en 51% en carcinoma murino cerebral, observándose el mismo patrón en el caso de la actividad antibacteriana en las 4 cepas evaluadas. Los autores concluyeron que las fracciones de menor peso molecular están relacionadas directamente con la actividad antibacteriana y anticancerígena, asociándose con un mayor contenido de ácido urónico y grupos sulfatados (Gargouch et al., 2021). Esto es consistente por lo reportado por Sun et al., 2012, quienes describieron el efecto de 6 exopolisacáridos, de pesos moleculares variables y degradados por microondas, en la reducción de células tumorales S180 implantado en ratones Kumming. Se observó que las muestras con menores pesos moleculares estimularon la producción de linfocitos y macrófagos. Los autores sugieren que el efecto antitumoral no fue promovido por mecanismos citotóxicos si no por la cascada inmunitaria que se activó (Sun et al., 2012).

8. Conclusiones

La estrategia de síntesis basada en interacciones intermoleculares entre el EPS de *P. purpurem* y el quitosano, empleando a la vez TPP como un agente entrecruzante no tóxico, permite el ensamble exitoso de geles novedosos núcleo-carcasa (Ch-EPS-TPP).

Los geles Ch-EPS-TPP representan una alternativa sustentable con el medio ambiente, en contraste con materiales en los que la ruta de síntesis implica el uso de solventes tóxicos (glutaraldehído, glioxal y carbodiimidas) que requieren un tratamiento especial de los residuos.

Los geles Ch-EPS-TPP son monodispersos y exhiben un tamaño promedio de 100 nm, por lo que son aplicables en el desarrollo de sistemas de entrega de biofármacos, dado que este rango de tamaño permite un acceso eficiente a los tejidos de mamíferos.

Los geles Ch-EPS-TPP son seguros, en términos de no presentar actividad citotóxica en células de mamífero en cultivo, en cambio se observa proliferación celular.

Dado que los geles Ch-EPS-TPP son mucoadhesivos, con un índice mayor al 90%, dichos materiales son candidatos para el desarrollo de sistemas de entrega de biofármacos por las vías mucosales.

Los geles Ch-EPS-TPP tienen una capacidad de adsorción de proteínas complejas mayor al 50 %, así como una estabilidad térmica alta (hasta 250°C); por lo que se proponen como un sistema de liberación de biofármacos atractivo.

9. Bibliografía

- Abkar, M., Fasihi-Ramandi, M., Kooshki, H., & Lotfi, A. S. (2018). Intraperitoneal immunization with Urease loaded N-trimethyl Chitosan nanoparticles elicits high protection against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infections. *Immunology Letters*, 199, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.004>.
- Ada, G. (2005). Overview of vaccines and vaccination. *Molecular Biotechnology*, 29(3), 255–271. <https://doi.org/10.1385/MB:29:3:255>.
- Aieneravaie, M., Ho, J. Q., Arabi, L., Lee, J., & Herrera, K. (2020). Use of nanoparticulate systems to salvage the myocardium. In *Nanomedicine for Ischemic Cardiomyopathy: Progress, Opportunities, and Challenges* (pp. 89-111). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817434-0.00007-6>Albertsson.
- A., Qu, X., & Wirse, A. (2000). Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer*, 41(12), 4589–4598. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00685-0](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00685-0).
- Andrews, G. P., Lavery, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 71(3), 505–518. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.09.028>.
- Angel-Olarte, C. del, Hernández-Adame, L., Mendez-Blas, A., & Palestino, G. (2019). Eu³⁺/Yb³⁺ co-doped gadolinium oxysulfide upconverting nanorods: Morphological, physicochemical and optical evaluation. *Journal of Alloys and*

Compounds, 787, 1032–1043. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.02.113>.

Antosova, Z., Mackova, M., Kral, V., & Macek, T. (2009). Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever ?. *Trends in Biotechnology*, 27(11), 628–235. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.07.009>.

Arad, S. M., & Levy-ontman, O. (2010). Red microalgal cell-wall polysaccharides : biotechnological aspects. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3), 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.02.008>.

Arris, S. T. F., Ong, J. I. S., & Uang, Q. I. H. (2010). Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 998–1003. <https://doi.org/10.1021/jf9031603>.

Ashrafi, B., Rashidipour, M., Marzban, A., Soroush, S., Azadpour, M., Delfani, S., & Ramak, P. (2019). Mentha piperita essential oils loaded in a chitosan nanogel with inhibitory effect on biofilm formation against S. mutans on the dental surface. *Carbohydrate Polymers*, 212, 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.018>.

Athokpam, B., Ramesh, S. G., & Mckenzie, R. H. (2017). Effect of hydrogen bonding on the infrared absorption intensity of OH stretch vibrations. *Chemical Physics*, 488–489, 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2017.03.006>.

Atwal, A., Dale, T. P., Snow, M., Forsyth, N. R., & Davoodi, P. (2023). Injectable hydrogels : An emerging therapeutic strategy for cartilage regeneration. *Advances in Colloid and Interface Science*, 321, 103030.

<https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103030>.

Auriemma, G., Cerciello, A., Aquino, R. P., Gaudio, P. Del, Fusco, B. M., & Russo, P. (2020). Pectin and Zinc Alginate: The Right Inner / Outer Polymer Combination for Core-Shell Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*, 12(2), 87. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020087>.

Balti, R., Le Balc'h, R., Brodu, N., Gilbert, M., Le Gouic, B., Le Gall, S., Siquin, C., & Massé, A. (2018). Concentration and purification of Porphyridium cruentum exopolysaccharides by membrane filtration at various cross-flow velocities. *Process Biochemistry*, 74, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.021>.

Bhattacharya, D., Price, D. C., Chan, C. X., Qiu, H., Rose, N., Ball, S., Weber, A. P. M., Arias, M. C., Henrissat, B., Coutinho, P. M., Krishnan, A., Egizi, A., Perrineau, M., & Morath, S. (2013). Genome of the red alga *Porphyridium purpureum*. *Nature Communications*, 4, 1941. <https://doi.org/10.1038/ncomms2931>.

Biswas, S., Chattopadhyay, M., Sen, K. K., & Saha, M. K. (2015). Development and characterization of alginate coated low molecular weight chitosan nanoparticles as new carriers for oral vaccine delivery in mice. *Carbohydrate Polymers*, 121, 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.12.044>.

Boccafroschi, F., Ramella, M., Fusaro, L., Catoira, M. C., Orientale, P., Casella, F., & Maggiore, O. (2019). Biological Grafts: Surgical Use and Vascular Tissue Engineering Options for Peripheral Vascular Implants. In *Encyclopedia of*

Biomedical Engineering, (310-321). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.10997-3>.

Boddupalli, B. M., Mohammed, Z. N. K., Nath A., R., & Banji, D. (2010). Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research*, 1(4), 381–387. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.76436>.

Boegh, M., & Nielsen, H. M. (2015). Mucus as a Barrier to Drug Delivery—Understanding and Mimicking the Barrier Properties. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 116(3), 179–186. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12342>.

Boni, F. I., Cury, B. S. F., Ferreira, N. N., Palmira, M., & Gremião, D. (2021). Ionic Cross-Linking as a Strategy to Modulate the Properties of Oral Mucoadhesive Microparticles Based on Polysaccharide Blends. *Pharmaceutics*, 13(3), 407. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13030407>.

Bookstaver, M. L., Tsai, S. J., Bromberg, J. S., & Jewell, C. M. (2018). Improving Vaccine and Immunotherapy Design Using Biomaterials. *Trends in Immunology*, 39(2), 135–150. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.10.002>.

Bukackova, M., Rusnok, P., & Marsalek, R. (2018). Mathematical Methods in the Calculation of the Zeta Potential of BSA. *Journal of Solution Chemistry*, 47(5), 1942–1952. <https://doi.org/10.1007/s10953-018-0830-0>.

Carroll, E. C., Jin, L., Mori, A., Muñoz-Wolf, N., Oleszycka, E., Moran, H. B. T., Mansouri, S., McEntee, C. P., Lambe, E., Agger, E. M., Andersen, P.,

- Cunningham, C., Hertzog, P., Fitzgerald, K. A., Bowie, A. G., & Lavelle, E. C. (2016). The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity*, 44(3), 597–608. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.004>.
- Carvalho, F. C., Bruschi, M. L., Evangelista, R. C., & Gremião, M. P. D. (2010). Mucoadhesive drug delivery systems. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1), 1–17. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000100002>.
- Casas-Arrojo, V., Decara, J., Arrojo-Agudo, M. de los Á., Pérez-Manríquez, C., & Abdala-Díaz, R. T. (2021). Immunomodulatory, antioxidant activity and cytotoxic effect of sulfated polysaccharides from porphyridium cruentum. (s.f.gray) nägeli. *Biomolecules*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biom11040488>.
- Cerchezan, G., Frone, A. N., Vasilievici, G., & Paulenco, A. (2022). Microalgae Strain Porphyridium purpureum for Nutrient Reduction in Dairy Wastewaters. *Sustainability*, 14(14), 8545. <https://doi.org/10.3390/su14148545>.
- Chatterjee, B., Gorain, B., Mohananaidu, K., & Sengupta, P. (2019). Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: Available proof of concept and existing challenges. *International Journal of Pharmaceutics*, 565, 258–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.05.032>.
- Chen, F., Ou, S., & Tang, C. (2016). Core-shell Soy Protein-Soy Polysaccharide Complex (Nano) particles as Carriers for Improved Stability and Sustained-Release of Curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(24), 5053–

5059. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01176>.

Chen, L., Xue, Y., Xia, X., Song, M., Huang, J., Zhang, H., Yu, B., Long, S., Liu, Y., Liu, L., Huang, S., & Yu, F. (2015). A redox stimuli-responsive superparamagnetic nanogel with chemically anchored DOX for enhanced anticancer efficacy and low systemic adverse effects. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(46), 8949–8962. <https://doi.org/10.1039/c5tb01851j>.

Chuang, C., Tsai, M., Yen, H., Shyu, H., & Cheng, K. (2020). A fucoidan-quaternary chitosan nanoparticle adjuvant for anthrax vaccine as an alternative to CpG oligodeoxynucleotides. *Carbohydrate Polymers*, 229, 115403. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115403>.

Cifuentes, A., & Herrero, M. (2019). *Development of a Green Downstream Process for the Valorization of Porphyridium cruentum Biomass*. *Molecules*, 24(8):1564. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24081564>.

Cordeiro, A. S., Alonso, M. J., & de la Fuente, M. (2015). Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 33(6), 1279–1293. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.010>.

Costa-Júnior, E. S., Barbosa-Stancioli, E. F., Mansur, A. A. P., Vasconcelos, W. L., & Mansur, H. S. (2009). Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 76(3), 472–481. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.11.015>.

Derkach, S. R., Voron'ko, N. G., & Kuchina, Y. A. (2022). Intermolecular Interactions

in the Formation of Polysaccharide-Gelatin Complexes: A Spectroscopic Study. *Polymers*, 14(14), 2777. <https://doi.org/10.3390/polym14142777>.

Devi, K., Kumar, R., & Singh, B. (2023). Exploring bioactive tragacanth gum for developing nerve regenerating agent imprinted hydrogels for brain drug delivery. *Hybrid Advances*, 4, 100103. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2023.100103>.

Devi, L. S., Das, A. J., & Das, A. B. (2022). Characterization of high amylose starch-microcrystalline cellulose based floatable gel for enhanced gastrointestinal retention and drug delivery. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 3(3), 100185. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100185>.

Favatela, F., Horst, M. F., Bracone, M., Gonzalez, J., Alvarez, V., & Lassalle, V. (2021). Gelatin/Cellulose nanowhiskers hydrogels intended for the administration of drugs in dental treatments: Study of lidocaine as model case. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 101886. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101886>.

Filomena, M., Raposo, D. J., Manuel, R., Costa, S., Maria, A., & Bernardo, M. (2013). Bioactivity and Applications of Sulphated Polysaccharides from Marine Microalgae. *Marine Drugs*, 11(1), 233–252. <https://doi.org/10.3390/md11010233>.

Fuentes-grünewald, C., Bayliss, C., Zanain, M., Pooley, C., Scolamacchia, M., & Silkina, A. (2015). 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. *Bioresource Technology Journal*, 189, 357–363.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.042>.

Gargouch, N., Elleuch, F., Karkouch, I., Tabbene, O., Pichon, C., Gardarin, C., Rihouey, C., Picton, L., Abdelkafi, S., Fendri, I., & Laroche, C. (2021). Potential of Exopolysaccharide from *Porphyridium marinum* to Contend with Bacterial Proliferation, Biofilm Formation, and Breast Cancer. *Marine Drugs*, 19(2), 66. <https://doi.org/10.3390/md19020066>.

Genevro, G. M., de Moraes, M. A., & Beppu, M. M. (2019). Freezing influence on physical properties of glucomannan hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.112>.

Gierszewska, M., Ostrowska-czubenko, J., & Chrzanowska, E. (2018). pH-responsive chitosan/alginate polyelectrolyte complex membranes reinforced by tripolyphosphate. *European Polymer Journal*, 101, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2018.02.031>.

Tiwari, A. (2016). *Polysaccharide Hydrogels Characterization and Biomedical Applications*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-03972-1>.

Gunay, M. S., Ozer, A. Y., & Chalon, S. (2016). Drug Delivery Systems for Imaging and Therapy of Parkinson ' s Disease. *Current Neuropharmacology*, 14(4), 376–391. <https://doi.org/10.2174/1570159X14666151230124904>.

Guo, T., Zhang, N., Huang, J., Pei, Y., & Wang, F. (2018). A facile fabrication of core – shell sodium alginate / gelatin beads for drug delivery systems. *Polymer Bulletin*, 76(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00289-018-2377-z>.

- Harnkarnsujarit, N., Kawai, K., & Suzuki, T. (2016). Impacts of freezing and molecular size on structure, mechanical properties and recrystallization of freeze-thawed polysaccharide gels. *LWT-Food Science and Technology*, 68(4), 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.030>.
- Haworth, K., Travis, D., Sa, A., Fuller, D., Ad, P., Haworth, K., Travis, D., Sa, A., Fuller, D., & Ad, P. (2021). Silicone hydrogel versus hydrogel so contact lenses for differences in patient-reported eye comfort and safety. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 9(9) CD014791. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD014791.pub2>.
- Hellfritzsche, M., & Scherließ, R. (2019). Mucosal vaccination via the respiratory tract. *Pharmaceutics*, 11(8), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080375>.
- Herrmann, A., Haag, R., & Schedler, U. (2021). Hydrogels and Their Role in Biosensing Applications. *Advanced Healthcare Materials*, 10(11), e2100062. <https://doi.org/10.1002/adhm.202100062>.
- Ho, T., Chang, C., Chan, H., Chung, T., & Shu, C. (2022). Hydrogels : Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*, 27(9), 2902. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>.
- Huang, T., Song, X., Jing, J., Zhao, K., Shen, Y., Zhang, X., & Yue, B. (2018). Chitosan-DNA nanoparticles enhanced the immunogenicity of multivalent DNA vaccination on mice against *Trueperella pyogenes* infection. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0337-2>.

- Huynh, N. T., Passirani, C., Saulnier, P., & Benoit, J. P. (2009). Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics*, 379(2), 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.04.026>.
- Iqbal, M. J., Javed, Z., Bravo, J. H., Sadia, H., Anum, F., & Raza, S. (2022). Biosensing chips for cancer diagnosis and treatment: a new wave towards clinical innovation. *Cancer Cell International*, 22(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02777-7>.
- Ivanova, J. G., Toshkova-yotova, T. S., Toshkova, R. A., Deleva, V. R., Georgieva, A. K., & Gigova, L. G. (2024). Antioxidant and Anticancer Potential of Extracellular Polysaccharide from *Porphyridium aerugineum* (Rhodophyta). *Fermentation*, 10(5), 259. <https://doi.org/10.3390/fermentation10050259>.
- Jaafari, M. R. (2008). Properties of Chitosan-Coated Microspheres Encapsulated with Cyclosporine A. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(5), 492–498. <https://doi.org/10.1080/03639040701744004>.
- Jagdale, S., & Karekar, S. (2020). Bird's eye view on aquasome: Formulation and application. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 58, 101776. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101776>.
- Jayachandran, B., Parvin, T. N., Alam, M. M., Chanda, K., & Mm, B. (2022). Insights on Chemical Crosslinking Strategies for Proteins. *Molecules*, 27(23), 8124. <https://doi.org/10.3390/molecules27238124>.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. S. (2011). Chemical Structures and Bioactivities

of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Marine Drugs*, 9(2), 196–223.
<https://doi.org/10.3390/md9020196>.

Kang, H. W., Tabata, Y., & Ikada, Y. (1999). Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 20(14), 1339–1344.
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00036-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00036-8).

Karthick Raja Namasivayam, S., Nishanth, A. N., R S, A. B., Nivedh, K., Syed, N. H., & R, R. S. (2020). Hepatitis B-surface antigen (HBsAg) vaccine fabricated chitosan-polyethylene glycol nanocomposite (HBsAg-CS-PEG- NC) preparation, immunogenicity, controlled release pattern, biocompatibility or non-target toxicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 144, 978–994.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.175>.

Kathiresan, S., Sarada, R., Bhattacharya, S., & Ravishankar, G. A. (2007). Culture Media Optimization for Growth and *Phycoerythrin* Production from *Porphyridium purpureum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), 456-463.
<https://doi.org/10.1002/bit.21138>.

Kole, S., Shariq, S., Qadiri, N., Shin, S., Kim, W., Lee, J., & Jung, S. (2019). Nanoencapsulation of inactivated-viral vaccine using chitosan nanoparticles: Evaluation of its protective efficacy and immune modulatory effects in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 91, 136–147.
<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.05.017>.

- Kubiak-ossowska, K., Tokarczyk, K., Jachimska, B., & Mulheran, P. A. (2017). Bovine Serum Albumin Adsorption at a Silica Surface Explored by Simulation and Experiment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 121(16), 3975–3986. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b01637>.
- Kumarasamy, D., & Giri, T. K. (2019). Biopolysaccharide-based hydrogel materials for drug delivery. In *Polysaccharide Carriers for Drug Delivery*. (pp. 585-613). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817056-4.00020-9>.
- Kumru, O. S., Joshi, S. B., Smith, D. E., Middaugh, C. R., Prusik, T., & Volkin, D. B. (2014). Vaccine instability in the cold chain: Mechanisms, analysis and formulation strategies. *Biologicals*, 42,(5) 237–259. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2014.05.007>.
- Kundu, B., Reis, R. L., & Kundu, S. C. (2020). Metastasis in three-dimensional biomaterials. In *Biomaterials for 3D Tumor Modeling* (pp. 191-216). *Materials Today*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816433-4.00009-9>.
- Li, B., Li, X., Chu, X., Lou, P., Yuan, Y., & Zhuge, A. (2022). Bioactive Materials Micro-ecology restoration of colonic inflammation by in-Situ oral delivery of antibody-laden hydrogel microcapsules. *Bioactive Materials*, 15, 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.12.022>.
- Li, J., & Cooper-white, Y. O. J. (2018). *Functional Hydrogels as Biomaterials*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-57511-6>.
- Li, J., Shui, S., Leung, Y., Lok, Y., Kwoon, S., Chow, H., Alt, V., Rupp, M.,

Brochhausen, C., Sing, C., Ip, M., Cheung, W., Man, R., Wong, Y., Chinese, T., Kong, H., & Sar, H. K. (2023). Hydrogel delivery of DNase I and liposomal vancomycin to eradicate fracture-related methicillin-resistant staphylococcus aureus infection and support osteoporotic fracture healing. *Acta Biomaterialia*, 164, 223–239. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.03.044>.

Li, P., & Wang, F. (2015). Polysaccharides: Candidates of promising vaccine adjuvants. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 9(2), 88–93. <https://doi.org/10.5582/ddt.2015.01025>.

Li, W., Hu, J., Chen, C., Li, X., Zhang, H., & Xin, Y. (2023). Emerging advances in hydrogel-based therapeutic strategies for tissue regeneration. *Regenerative Therapy*, 24, 459–471. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2023.09.007>.

Li, X., Kong, X., Shi, S., Zheng, X., Guo, G., Wei, Y., & Qian, Z. (2008). Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery. *BMC Biotechnology*, 8,(1) 89. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-89>.

Li, X., Min, M., Du, N., Gu, Y., Hode, T., Naylor, M., Chen, D., Nordquist, R. E., & Chen, W. R. (2013). Chitin, chitosan, and glycated chitosan regulate immune responses: The novel adjuvants for cancer vaccine. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 387023. <https://doi.org/10.1155/2013/387023>.

Li Zhaoliang R, Ynaji Wangb W, Ding L, W. Y. (2016). Role of pH-induced structural change in protein aggregation in foam fractionation of bovine serum albumin. *Biotechnology Reports*, 9, 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.01.002>.

- Liberti, D., Imbimbo, P., Giustino, E., Elia, L. D., Silva, M., & Monti, D. M. (2023). Shedding Light on the Hidden Benefit of *Porphyridium cruentum* Culture. *Antioxidants*, 12(2), 337. <https://doi.org/10.3390/antiox12020337>.
- Lin, Y. C., Lou, P. J., & Young, T. H. (2014). Chitosan as an adjuvant-like substrate for dendritic cell culture to enhance antitumor effects. *Biomaterials*, 35(31), 8867–8875. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.07.014>.
- Liu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Zhou, C., & Zhang, Z. (2008). Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(15), 1650–1662. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.09.001>.
- Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M. T. M., & Abdellah, A. M. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: In vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences Nanoscience and Nanotechnology* 7(3):035008. [http:// 10.1088/2043-6262/7/3/035008](http://10.1088/2043-6262/7/3/035008).
- Lu, Z., Dai, Z., & Zhu, J. (2023). Progress of Hydrogel Dressings with Wound Monitoring and Treatment Functions. *Gels*, 9 (9), 694. <https://doi.org/10.3390/gels9090694>.
- Madjid Farmahini-Farahani, Seyed-Hassan Jafari, Hosein Ali Khonakdar, Ahmad Yavari, A. M. (2006). FTIR and Thermal Analyses of Intermolecular Interactions in Poly(trimethylene terephthalate)/Phenoxy Blends. *Polymer Engineering and Science*, 51(3), 1–10. <https://doi.org/10.1002/pen.21839>.

- Manuscript, A. (2011). Carbohydrate-based immune adjuvants Nikolai. *Expert Review of Vaccines*, 10(4), 523–537. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Pfizer. (2021). Pfizer-BioNTech COVID-19 vaccine. Pfizer. Retrieved from <https://www.pfizer.com>.
- Moeini, A., Cimmino, A., Dal Poggetto, G., Di Biase, M., Evidente, A., Masi, M., Lavermicocca, P., Valerio, F., Leone, A., Santagata, G., & Malinconico, M. (2018). Effect of pH and TPP concentration on chemico-physical properties, release kinetics and antifungal activity of Chitosan-TPP-Ungeremine microbeads. *Carbohydrate Polymers*, 195, 631–641. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.05.005>.
- Morelle, X. P., Illeperuma, W. R., Tian, K., Bai, R., Suo, Z., & Vlassak, J. J. (2018). Highly Stretchable and Tough Hydrogels below Water Freezing Temperature. *Advanced Materials*, 30(35), 1–8. <https://doi.org/10.1002/adma.201801541>.
- Nan, W., Yi, W., Ying, L., Wen, Z., Xiang, Z., Fen, A., & Tao, L. (2021). Comparison on characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides from two *Porphyridium* strains. *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 2983–2994. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02518-9>.
- Netanel, G., Ochbaum, G., Mejubovsky-mikhelis, M., Bitton, R., & Malis, S. (2020). Physico-chemical characteristics of the sulfated polysaccharides of the red microalgae *Dixonella grisea* and *Porphyridium aerugineum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 1171–1179.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.205>.

Noureen, S., Noreen, S., Akram, S., Abdelrahman, E. A., Batool, F., Aslam, A., Mehdi, M., Shirinfar, B., & Ahmed, N. (2023). A novel pH-responsive hydrogel system based on *Prunus armeniaca* gum and acrylic acid: Preparation and evaluation as a potential candidate for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 189, 106555. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106555>.

Olvera-sosa, M., Guerra-contreras, A., Gómez-durán, C. F. A., González-garcía, R., & Palestino, G. (2020). Tuning the pH-responsiveness capability of poly (acrylic acid-co-itaconic acid)/NaOH hydrogel: Design, swelling, and rust removal evaluation. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(8), 48403. <https://doi.org/10.1002/app.48403>.

Organización Mundial de la Salud. (2023). *Enfermedades no transmisibles*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>

Parra-Riofrío, Geovanna, Virginia Casas-Arrojo, Roberto Pino-Selles, Jorge García-Márquez, Roberto Teófilo Abdala-Díaz, E. U. (2021). Adaptation of autotrophic to heterotrophic culture of *Porphyridium purpureum* (Bory) K . M . Drew & R . Ross: characterization of biomass and production of exopolysaccharides. *Journal of Applied Phycology*, 33(6), 3603–3615. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02566-1>.

Pati, F., Adhikari, B., & Dhara, S. (2011). Development of chitosan–tripolyphosphate

fibers through pH dependent ionotropic gelation. *Carbohydrate Research*, 346(16), 2582–2588. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.08.028>.

Paul, S. D., Sharma, H., Jeswani, G., & Jha, A. K. (2017). Novel Gels: Implications. In *Nanostructures for Drug Deliver* (379-412). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6/00012-9>.

Percival, E. and R. A. J. F. (1979). The extracellular polysaccharydes of *Porphyridium aertigineum*. *Carbohydrate Research*, 72(5), 165–176. [http:// 10.1016/S0008-6215\(00\)83932-4](http://10.1016/S0008-6215(00)83932-4).

Peter J Larkin. (2011). *IR and Raman Spectroscopy: Principles and Spectral Interpretation*. Elsevier Inc.

Centers for Disease Control and Prevention (2023). *Moderna COVID-19 Vaccine*. <https://www.cdc.gov/vaccines/covid-19/info-by-product/moderna/downloads/vaccine-at-a-glance.pdf>.

Centers for Disease Control and Prevention (2021). *Administration of ERVEBO®*. www.cdc.gov/vhf/ebola/clinicians/vaccine/vaccine-administration.html.

Queiroz, M. F., Rachel, K., Melo, T., Sabry, D. A., Sassaki, G. L., Alexandre, H., & Rocha, O. (2015). Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation? *Marine Drugs*, 13(1), 141–158. <https://doi.org/10.3390/md13010141>.

Raphael M. Ottenbrite, Kinam Park, T. O. (2010). *Biomedical applications of hydrogels handbook*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5919-5>.

- Review, A. U. (2017). Hydrogel Based Sensors for Biomedical Applications : An Updated Review. *Polymers*, 9(8), 1–25. <https://doi.org/10.3390/polym9080364>.
- Revuri, V., Huh, K. M., & Lee, Y. (2017). Polysaccharide based nano/microformulation: an effective and versatile oral drug delivery system. In *Nanostructures for Oral Medicine* (pp. 409–433). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47720-8/00015-8>.
- Rodrigues, S., Costa, A. M. R. Da, & Grenha, A. (2012). Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate Polymers*, 89(1), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.010>.
- RT Abdala-Díaz , M Chabrilón , A Cabello-Pasini , B López-Soler, F. F. (2010). Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. *Ciencias Marinas*, 36(4), 345–353. <https://doi.org/10.7773/cm.v36i4.1732>.
- Salg, S., Salgi, U., & Bahad, S. (2012). Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules : The Effects of Ion Types and Ionic Strengths. *International Journal of Electrochemical Science*, 7(12), 12404–12414. [https://doi.org/10.1016/S1452-3981\(23\)16554-0](https://doi.org/10.1016/S1452-3981(23)16554-0).
- Santos, M. A., & Grenha, A. (2015). Polysaccharide Nanoparticles for Protein and Peptide Delivery : Exploring Less-Known Materials. In *Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery* (1st ed.). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.003>.

Sheng, Y., Gao, J., Yin, Z. Z., Kang, J., & Kong, Y. (2021). Dual-drug delivery system based on the hydrogels of alginate and sodium carboxymethyl cellulose for colorectal cancer treatment. *Carbohydrate Polymers*, 269, 118325. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118325>.

Singh, B., Mohan, M., & Kumar, R. (2022). Food Hydrocolloids for Health Synthesis of hydrocortisone containing dietary fiber almond gum-based hydrogels as sustained drug delivery carriers for use in colon inflammation. *Food Hydrocolloids for Health*, 2(11), 100057. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100057>.

Singh, B., Singh, J., Sharma, V., Sharma, P., & Kumar, R. (2023). Functionalization of bioactive moringa gum for designing hydrogel wound dressings. *Hybrid Advances*, 4(6), 100096. <https://doi.org/10.1016/j.hybadv.2023.100096>.

Skwarczynski, M. (2017). Inulin: A New Adjuvant With Unknown Mode of Action. *EBioMedicine*, 15, 8–9. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.019>.

Sun, B., Yu, S., Zhao, D., Guo, S., Wang, X., & Zhao, K. (2018). Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine*, 36(35), 5226–5234. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.040>.

Sun, L., Wang, L., & Zhou, Y. (2012). Immunomodulation and antitumor activities of different-molecular-weight polysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1206–1210. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.097>.

- Sun, Y., Ma, X., & Hu, H. (2021). Marine polysaccharides as a versatile biomass for the construction of nano drug delivery systems. *Marine Drugs*, 19(6), 1–15. <https://doi.org/10.3390/md19060345>.
- Susi, H. (1972). The strength of hydrogen bonding: Infrared spectroscopy. *Methods in Enzymology*, 26, 381–391. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(72\)26019-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(72)26019-0).
- Tabrizi, N. M., Amani, J., Ebrahimzadeh, M., Nazarian, S., Kazemi, R., & Almasian, P. (2018). Preparation and evaluation of chitosan nanoparticles containing CtxB antigen against *Vibrio cholera*. *Microbial Pathogenesis*, 124, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.037>.
- Tathe, A., Ghodke, M., & Nikalje, A. P. (2010). A brief review: Biomaterials and their application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2, 19–23.
- Tomaz, A. F., de Carvalho, S. M. S., Barbosa, R. C., Silva, S. M. L., Gutierrez, M. A. S., de Lima, A. G. B., & Fook, M. V. L. (2018). Ionically crosslinked chitosan membranes used as drug carriers for cancer therapy application. *Materials*, 11(10), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ma11102051>.
- Toxic, N., Assessment, T., Zebrafish, U., & Shrimp, W. (2021). Not Toxic and Stimulates Immune Response against Vibriosis: The Assessment Using Zebrafish and White Shrimp. *Marine Drugs*, 19(3), 133. <https://doi.org/10.3390/md19030133>.
- Venkatesh, M. P., Kumar, T. P., & Pai, D. R. (2020). Targeted drug delivery of

Methotrexate in situ gels for the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(12), 1548–1557.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.10.003>.

Watanabe, K., Nishio, Y., Makiura, R., Nakahira, A., & Kojima, C. (2013). Paclitaxel-loaded hydroxyapatite/collagen hybrid gels as drug delivery systems for metastatic cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 446(1-2), 81–86.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.002>.

Wierzbicka, A., & Wilczek, P. (2023). A comprehensive review on hydrogel materials in urology: Problems, methods, and new opportunities. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 111(3), 730–756. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35179>.

Xeroudaki, M., Rafat, M., Moustardas, P., Mukwaya, A., Tabe, S., Bellisario, M., Peebo, B., & Lagali, N. (2023). A double-crosslinked nanocellulose-reinforced dexamethasone-loaded collagen hydrogel for corneal application and sustained anti-inflammatory activity. *Acta Biomaterialia Journal*, 172(2), 234–248.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.10.020>.

Xu, F., Dawson, C., Lamb, M., Mueller, E., & Stefanek, E. (2022). Hydrogels for Tissue Engineering : Addressing Key Design Needs Toward Clinical Translation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 849831. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.849831>.

Xu, W., Shen, Y., Jiang, Z., & Wang, Y. (2004). Intranasal delivery of chitosan – DNA vaccine generates mucosal SIgA and anti-CVB3 protection. *Vaccine*, 22(27-28),

3603–3612. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.033>.

Yadav, P., & Yadav, A. B. (2021). Preparation and characterization of BSA as a model protein loaded chitosan nanoparticles for the development of protein -/ peptide-based drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 200. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00345-w>.

Ye, E., Chee, P. L., Prasad, A., Fang, X., Owh, C., Yeo, V. J. J., & Loh, X. J. (2014). Supramolecular soft biomaterials for biomedical applications. *Materials Today*, 17(4), 194–202. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2014.04.004>.

Yuan, N. Y., Lin, Y. A., Ho, M. H., Wang, D. M., Lai, J. Y., & Hsieh, H. J. (2009). Effects of the cooling mode on the structure and strength of porous scaffolds made of chitosan, alginate, and carboxymethyl cellulose by the freeze-gelation method. *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 349–356. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.021>.

Zaib, M., Athar, M. M., Saeed, A., Farooq, U., & Salman, M. (2016). Equilibrium, kinetic and thermodynamic biosorption studies of Hg (II) on red algal biomass of *Porphyridium cruentum* Equilibrium, kinetic and thermodynamic biosorption studies of Hg (II) on red algal. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 9(4), 179–189. <https://doi.org/10.1080/17518253.2016.1185166>.

Zhang, L., Yang, W., Hu, C., Wang, Q., & Wu, Y. (2018). Properties and applications of nanoparticle/microparticle conveyors with adjuvant characteristics suitable for oral vaccination. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 2973–2987.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S154743>.

Zhang, X., Wei, Z., Wang, X., Wang, Y., Tang, Q., & Huang, Q. (2022). Current Research in Food Science Fabrication and characterization of core-shell gliadin/tremella polysaccharide nanoparticles for curcumin delivery: Encapsulation efficiency, physicochemical stability and bioaccessibility. *Current Research in Food Science*, 5, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.01.019>.

Zhang, Y. Q., Tsai, Y. C., Monie, A., Hung, C. F., & Wu, T. C. (2010). Carrageenan as an adjuvant to enhance peptide-based vaccine potency. *Vaccine*, 28(32), 5212–5219. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.068>.

Zhang, Y. S., & Khademhosseini, A. (2017). Advances in engineering hydrogels. *Science*, 356(6337), eaaf3627. <https://doi.org/10.1126/science.aaf3627>.

Zhao, L.-M., Shi, L.-E., Zhang, Z.-L., Chen, J.-M., Shi, D.-D., Yang, J., & Tang, Z.-X. (2011). Preparation and application of chitosan nanoparticles and nanofibers. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(3), 353–362. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322011000300001>.

10. Anexo

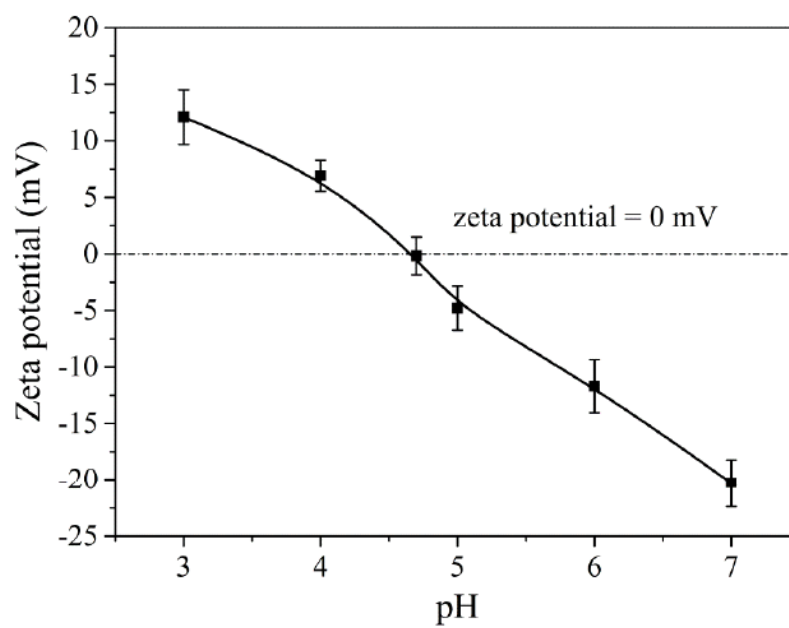


Figura 1. Gráfica de potencial zeta respecto al pH para la BSA (Li et al., 2016)



Core-shell chitosan/*Porphyridium*-exopolysaccharide microgels: Synthesis, properties, and biological evaluation

Claudia Elizabeth Ruiz-Dávila^{a,b}, Karla Ivón Solís-Andrade^{a,b}, Miguel Olvera-Sosa^{a,c}, Gabriela Palestino^{a,b,*}, Sergio Rosales-Mendoza^{a,b,*}

^a Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP 78210, Mexico

^b Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina (CICSaB), Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Mexico

^c División de Ciencias Ambientales, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. (IPICYT), Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4a Sección, San Luis Potosí C.P. 78216, SLP, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:
Hydrogel
Exopolysaccharides
Core-shell
Porphyridium

ABSTRACT

Advanced materials used in the biomedicine field comprises a diverse group of organic molecules, including polymers, polysaccharides, and proteins. A significant trend in this area is the design of new micro/nano gels whose small size, physical stability, biocompatibility, and bioactivity could lead to new applications. Herein a new synthesis route is described to obtain core-shell microgels based on chitosan and *Porphyridium* exopolysaccharides (EPS) crosslinked with sodium tripolyphosphate (TPP). First, the synthesis of EPS-chitosan gels through ionic interactions was explored, leading to the formation of unstable gels. Alternatively, the use of TPP as crosslinker agent led to stable core-shell structures. The influence of reaction temperature, sonication time, and exopolysaccharide concentration, pH and TPP concentration were determined as a function of particle size and polydispersity index (PDI). The obtained EPS-chitosan gels were characterized by TEM, TGA, and FTIR; followed by the assessment of protein load capacity, stability upon freezing, cytotoxicity, and mucoadhesivity. Experimentation revealed that the core-shell particles size ranges 100–300 nm, have a 52 % loading capacity for BSA and a < 90 % mucoadhesivity, and no toxic effects in mammalian cell cultures. The potential application of the obtained microgels in the biomedical field is discussed.

1. Introduction

Emergent challenges in medicine require novel and constant advances in the biomaterials field. Many research efforts in this field are found in the literature [1–6]. Biomaterials play a vital role during the designing prostheses, implants, cardiac valves, medical supplies, tissue regeneration strategies, biomarkers, contact lenses, scaffolds, and new drug delivery vehicles; with polymers, ceramics, metallic particles, composites, and carbon as the most used raw materials [7–9]. Biomaterials in the pharmacological area are of utmost importance due to the material's intrinsic properties and functionalities. Emerging diseases, as well as any clinical condition, demand optimal drug delivery agents. Vitamins, proteins, drugs, vaccines, and peptides are the most common molecules entrapped in hydrogels, particles, micelles, and liposomes to increase stability, bioavailability, and, ultimately, the target biologic effect. However, some carriers still have notable disadvantages related to the unspecificity of delivering the cargo to the desired site, no well-

controlled release, high cost, and poor bioavailability. Among the new strategies explored to address such limitations are liposomes, dendrimers, virosomes, carbon nanotubes, and hydrogels [10–12].

Hydrogels are an exceptional class of materials formed by a complex tridimensional matrix of flexible and hydrophilic architecture that can encapsulate biomolecules by swelling [13,14]. The compounds used for the synthesis of hydrogels typically comprise proteins, polymers, synthetic sources, and polysaccharides; which are prone to crosslink by either physical or chemical methods. Polysaccharides are polymeric structures formed by repetitive units of monosaccharides and are recognized for their stability, biodegradability, and also for their antimicrobial, anti-inflammatory, and immunostimulatory properties [2,15]. Moreover, these types of biomolecules can be obtained from low-cost biomass. All these characteristics are an incentive for choosing polysaccharides as raw materials for hydrogel synthesis. Relevant examples of polysaccharides include pullulan, chitosan, alginate, cellulose, hyaluronic acid, carrageenan, and xanthan gum.

* Corresponding authors at: Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, SLP 78210, Mexico.
E-mail addresses: palestinogabriela@uaslp.mx (G. Palestino), rosales.s@uaslp.mx (S. Rosales-Mendoza).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125655>

Received 7 March 2023; Received in revised form 15 June 2023; Accepted 30 June 2023

Available online 1 July 2023

0141-8130/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

