



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

**“Encapsulamiento y liberación de 5-fluorouracilo en  
microesferas de doble capa alginato-quitosano”**

Tesis que presenta

SILVIA ARGELIA PERAZA KU

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, México

Noviembre 2021

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  \_\_\_\_\_  
Silvia Argelia Peraza Ku

*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN MATERIALES POLIMÉRICOS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Silvia Argelia Peraza Kú** titulado “**Encapsulamiento y liberación de 5-fluorouracilo en microesferas de doble capa alginato-quitosano**”, fue realizado en la Unidad de Materiales dentro de la Línea de Materiales Compuestos y Nanomateriales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de los Dres. Jorge Alonso Uribe Calderón y José Manuel Cervantes Uc, y pertenece al Programa de Posgrado en Maestría en Ciencias en Materiales Poliméricos de este Centro.

**Atentamente**



---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 29 de octubre de 2021

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis padres Federico H. Peraza Ojeda y Silvia C. Ku Cáceres y, mi hermano Daniel H. Peraza Ku por siempre estar presentes para mí.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por permitirme utilizar sus instalaciones y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (número de becario 870653).

A mis directores de tesis, el Dr. Jorge Alonso Uribe Calderón y al Dr. José Manuel Cervantes Uc por haberme confiado el desarrollo de este proyecto y por su excelente asesoramiento que me permitieron elaborar este trabajo de tesis.

A mis revisores, el Dr. Gonzalo Canché Escamilla, la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, el Dr. Gabriel Lizama Uc y al Dr. Alejandro Ávila Ortega por todas sus observaciones y consejos que apoyaron al mejor desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Juan Valerio Cauich Rodríguez por permitirme el uso del laboratorio de química macromolecular y al Dr. Emmanuel Alejandro Flores Johnson por permitirme el uso del laboratorio de usos múltiples.

Al Dr. David Betancur Ancona y a la M.C Mariel Sinaí Garrido Balam por el apoyo en la realización de los análisis proximales.

A la Dra. Patricia Quintana Owen por el apoyo en la realización de los análisis RMN.

A la Dra. Rosa María Leal y a la Quim. Daniela Ortega Camacho de la Unidad Ciencias del Agua (UCIA), y al Dr. Raúl Tapia de la Unidad Energías Renovables (UER) por el apoyo en la determinación de metales pesados.

Al Q.I Santiago Duarte Aranda por su apoyo en el análisis de las muestras por SEM y a la Q.I Rossana Faride Vargas Coronado por toda su asesoría técnica.

A mis compañeros de la Unidad de Materiales por haber hecho del trabajo de laboratorio una experiencia más amena y agradable.

Gracias a todos los que compartieron algún momento conmigo, los llevaré siempre en mi memoria.

## Dedicatoria

Con cariño, al Dr. Jorge Uribe Calderón.

Gracias a toda su asesoría y consejo, pude crecer y llegar hasta el día de hoy.

Me siento muy afortunada de haber trabajado bajo su tutela.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO 1 .....	3
1 ANTECEDENTES .....	3
1.1 Sistemas de liberación de fármacos.....	3
1.2 Técnicas de encapsulación de fármacos .....	4
1.3 Alginato .....	6
1.3.1 Extracción de alginatos a partir de algas pardas .....	8
1.3.2 Entrecruzamiento de alginato .....	10
1.4 Quitosano.....	13
1.4.1 Entrecruzamiento del quitosano.....	14
1.5 Sistemas alginato-quitosano: revisión de la literatura.....	15
1.6 5-Fluorouracilo .....	17
1.7 Ultrasonido .....	18
1.7.1 El uso del ultrasonido en la liberación de fármacos .....	19
1.7.2 Ultrasonido terapéutico.....	19
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	21
Hipótesis.....	21
Objetivo general .....	21
Objetivos específicos.....	21
CAPÍTULO 2.....	22
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1 Materiales .....	22
2.2 Metodología.....	22
2.3 Obtención de alginato.....	22
2.3.1 Recolección de algas.....	22
2.3.2 Extracción de alginato .....	23
2.4 Elaboración de microesferas.....	24
2.4.1 Preparación de microesferas de alginato con y sin 5FU.....	24
2.4.2 Elaboración de microesferas alginato-quitosano con y sin 5FU.....	25

2.5	Estudio de la liberación del 5FU .....	26
2.5.1	Determinación de 5FU encapsulado.....	26
2.5.2	Determinación de la liberación del 5-fluorouracilo.....	28
2.6	Caracterización del alginato y microesferas.....	28
2.6.1	Análisis proximal.....	28
2.6.2	Determinación de metales pesados.....	31
2.6.3	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	32
2.6.4	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	32
2.6.5	Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	32
2.6.6	Viscosidad intrínseca y masa molar.....	32
2.6.7	Reología.....	33
CAPÍTULO 3.....		34
3	RESULTADOS .....	34
3.1	Obtención del alginato.....	34
3.1.1	Identificación de las algas y análisis proximales .....	34
3.1.2	Determinación de metales pesados .....	37
3.1.3	Reología de las suspensiones de alginato .....	38
3.1.4	Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR). .....	39
3.1.5	Resonancia Magnética Nuclear .....	41
3.1.6	Viscosidad intrínseca y masa molar.....	46
3.2	Microesferas de alginato.....	48
3.2.1	Rendimiento de la producción de microesferas.....	48
3.2.2	Morfología .....	49
3.3	Estudio de la liberación del 5FU .....	55
3.3.1	Determinación del 5FU encapsulado.....	55
3.3.2	Pruebas de liberación con y sin ultrasonido.....	56
CONCLUSIONES .....		59
RECOMENDACIONES.....		60
REFERENCIAS.....		61

## Índice de tablas

Tabla 3.1 Análisis proximales para la mezcla de <i>Sargassum natans</i> y <i>Sargassum fluitans</i> . ....	35
Tabla 3.2. Concentración de metales pesados en la muestra de alginato. ....	37
Tabla 3.3. Razón M/G del alginato de sodio obtenido. ....	41
Tabla 3.4. Composición química del alginato extraído. ....	44
Tabla 3.5. Desplazamientos químicos del espectro RMN- <sup>13</sup> C del alginato extraído. ....	45
Tabla 3.6. Viscosidad intrínseca y masas molares de alginatos de diversas fuentes. ....	47



## Índice de figuras

Figura 1.1. Estructura química del alginato .....	7
Figura 1.2. Entrecruzamiento iónico del alginato, modelo de “caja de huevo”.....	11
Figura 1.3. Mecanismo de gelificación externa .....	12
Figura 1.4. Mecanismo de gelificación interna. ....	13
Figura 1.5. Molécula de quitosano.....	14
Figura 1.6. Entrecruzamiento iónico del quitosano con (a) tripolifosfato de sodio y (b) citrato de sodio .....	15
Figura 1.7. Molécula de 5-fluorouracilo. ....	18
Figura 2.1. Etapas del trabajo de investigación.....	22
Figura 2.2. Metodología para la extracción de alginato.....	23
Figura 2.3. Procedimiento para la elaboración de microesferas de alginato.....	25
Figura 2.4. Procedimiento para la elaboración de microesferas alginato-quitosano.....	26
Figura 2.5. Espectro UV-vis de una solución 5FU/PBS .....	27
Figura 2.6. Curva de calibración del 5-fluorouracilo .....	27
Figura 3.1. Muestra de algas pardas después de secar (izquierda), fotografía de una muestra de Sargassum tomada de ©Deborah Barber en <a href="http://www.naturalista.com">www.naturalista.com</a> . (derecha). ....	34
Figura 3.2. Curvas de flujo de soluciones de alginato obtenido de Sargassum natans & Sargassum fluitans.....	38
Figura 3.3. Espectros FTIR de diferentes muestras de alginato.....	40
Figura 3.4. Espectro 1H RMN del alginato extraído.....	43
Figura 3.5. Espectro <sup>13</sup> C-RMN del alginato extraído.....	45
Figura 3.6. Gráfica de Huggins (izq.) y gráfica de Kraemer (der.) para la determinación de la viscosidad intrínseca del alginato extraído.....	46
Figura 3.7. Imágenes captadas con el microscopio óptico de microesferas de alginato sin 5FU (A) y con 5FU (B).....	49
Figura 3.8. Imágenes SEM de las micropartículas de alginato después de liofilizar; sin 5FU (A y B) y con 5FU (C y D).....	51
Figura 3.9. Microesferas de alginato recubiertas de quitosano. ....	52
Figura 3.10. Imágenes captadas con el microscopio óptico de las microesferas de alginato-quitosano entrecruzado con CTT al 1% p/v (A y B) y CTT al 3% p/v (C y D).....	53

Figura 3.11. Imágenes SEM de las micropartículas de alginato-quitosano entrecruzado con CTT al 1% p/v (A y B) y al 3% p/v (C y D) después de liofilizar, en magnificación 500x (A y C) y 2000x (B y D).....54

Figura 3.12. Imágenes captadas con el microscopio óptico (10 x) de las microesferas de alginato-quitosano entrecruzado con CTT al 1% (A) y CTT al 3% (B) cargadas con 5FU.....55

Figura 3.13. Perfiles de liberación de 5FU individuales a partir de ME, con y sin US. ....58

## Resumen

Los sistemas de liberación de fármacos en los tratamientos contra el cáncer tienen por objetivo introducir una alta dosificación de un principio activo, como el 5-fluorouracilo, en un sitio específico, con el fin de generar la muerte del tejido tumoral. Entre las medidas desarrolladas para lograr estos sistemas se encuentran la microencapsulación del fármaco en hidrogeles poliméricos como el alginato y el quitosano; los sistemas resultantes han demostrado tener la capacidad de liberar cargas del fármaco en respuesta a un estímulo externo. En este trabajo se estudió la encapsulación del fármaco 5-fluorouracilo en microesferas (ME) de doble capa alginato-quitosano y su liberación estimulada con ultrasonido, para su posible aplicación en el tratamiento contra el cáncer. Primero, se extrajo y caracterizó alginato de sodio a partir de sargazo mediante una digestión alcalina. Posteriormente, se elaboraron ME nebulizando una solución binaria de alginato y el fármaco sobre una solución de cloruro de calcio. Después, las ME obtenidas se recubrieron con una capa de quitosano la cual fue entrecruzada con citrato de sodio utilizando diferentes concentraciones del citrato. Las pruebas de liberación se realizaron en una solución búfer fosfato salina (PBS) a 37 °C durante tres horas, estimulada por ultrasonido durante 1 min a diferentes intervalos. Entre los resultados obtenidos se encuentran la identificación de las algas del sargazo, siendo éstas de las especies *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans*; los análisis proximales de la mezcla de algas mostraron un alto contenido de carbohidratos, seguido de cenizas y fibra. El rendimiento de la extracción de alginato a partir de sargazo se calculó en 45%. Las bandas de los espectros FTIR y los análisis de RMN-<sup>1</sup>H indican que la muestra extraída es alginato de sodio, con una composición de 45.6% de unidades manurónicas y 54.4% de unidades gulurónicas. La reología de las soluciones de alginato mostró un comportamiento newtoniano a bajas concentraciones, y pseudoplástico cuando la concentración del alginato fue alta. El diámetro promedio de las esferas de alginato se estimó en 120 µm. Las ME doble capa se obtuvieron exitosamente con una tendencia a aglomerarse durante el proceso. Se determinó que los estímulos de ultrasonido indujeron una liberación pulsátil del fármaco a partir de las microesferas, generando perfiles de liberación escalonadas controlado por el ultrasonido.

## Abstract

The aim of the drug delivery systems in cancer treatments is to introduce a high dosage of an active drug in a specific area to produce tumor death. Drug microencapsulation is one approach to develop these systems using polymeric hydrogels such as alginate or chitosan, which are capable to release drug loads in response to an external stimulus. This work proposes the encapsulation of 5-fluorouracil (5FU) in double-layer alginate-chitosan microspheres (ME) and its release promoted by ultrasound stimulus for potential cancer treatments. For that, alginate was extracted from sargassum by means of an alkaline digestion using sodium carbonate and was physicochemically characterized. Then, alginate ME were produced by nebulizing a binary solution containing alginate and 5FU over a calcium chloride solution. An external layer of chitosan was deposited over the alginate ME using a chitosan solution and crosslinked with sodium citrate at different concentrations. Drug release studies were performed in a phosphate buffer saline medium (PBS) at 37°C for three hours, with and ultrasound stimulus of 1 min at different intervals. Among the results, sargassum was identified to be a mix of *Sargassum fluitans* and *Sargassum natans*, with a high content of carbohydrates, followed by ashes and fiber. The extraction yield of alginate from *sargassum* was ~45%. Rheology of the alginate solutions showed a Newtonian or pseudoplastic behavior depending on the alginate concentration. The FTIR bands and the <sup>1</sup>H-NMR analysis indicate that the extracted sample was sodium alginate with a composition of 45.6% mannuronic units and 54.4% guluronic units. The average diameter of the ME was estimated to be 120 μm. Ultrasound stimuli promoted a pulsatile drug release from the microspheres leading to stepwise release profiles. In conclusion, alginate extraction was successfully achieved with a high yield compared with other authors. The double layered ME were successfully obtained, although, a tendency for agglomeration was observed. The ultrasound stimulus generated a significant release of the drug from the microspheres.

## **Introducción**

En los últimos años se han incrementado los esfuerzos para encontrar sistemas de liberación de fármacos que permitan obtener perfiles de liberación más controlados, que permitan un uso más eficiente de los mismos, disminuir los efectos adversos de las sobredosis, reducir las frecuencias de las dosis, etc.; todo esto, con el objetivo de incrementar la efectividad del tratamiento [1–4]. En especial, los tratamientos contra el cáncer requieren perfiles de liberación focalizados que permitan una alta dosificación del fármaco en el tumor, sin afectar, en lo posible, a los órganos sanos [5,6].

Entre las alternativas desarrolladas para lograr estos sistemas de liberación se encuentra la microencapsulación; esta técnica se ha utilizado en las industrias alimentaria y farmacéutica, y ofrece una fluctuación reducida de la concentración del fármaco, protección contra la volatilización del elemento activo durante el almacenamiento, minimización de deterioro por interacción con la luz, protección contra condiciones atmosféricas, enmascara propiedades organolépticas indeseables (olor, sabor, color), recubre partículas que por su forma irregular son difíciles de comprimir y, sobre todo, ha ayudado en el diseño de formulaciones de liberación controlada de fármacos con diferentes fines [7,8].

Entre los factores que afectan la viabilidad del encapsulamiento de un fármaco se encuentran las técnicas y los materiales utilizados; entre estos últimos, se pueden mencionar a los polímeros naturales como el alginato y el quitosano. El alginato es un polisacárido natural presente en las paredes celulares de las algas marrones, cuya propiedad principal es su habilidad de formar geles a partir de una serie de reacciones químicas de intercambio iónico, que dan lugar a la formación de enlaces entre las cadenas adyacentes del alginato [9]. El quitosano es otro polisacárido natural con la capacidad de formar redes tridimensionales con ayuda de un agente entrecruzante como el tripolifosfato de sodio (TPF) o el citrato de sodio (CTT) [10].

Por otra parte, los hidrogeles poliméricos han demostrado tener la habilidad de liberar cargas de fármaco en respuesta a estímulos externos como cambios en el pH, luz, temperatura, campo eléctrico, campo magnético y ultrasonido [11]. De estos últimos, el ultrasonido ha atraído la atención debido a sus ventajas de ser no invasivo y no ionizante, además de que los hidrogeles sensibles al ultrasonido son de interés para una variedad de aplicaciones terapéuticas debido a su seguridad, su habilidad para penetrar tejidos y su precisión espacio-temporal [12]. El estímulo

ultrasónico puede enfocarse en un área pequeña para desencadenar la liberación del principio activo, mientras que las áreas aledañas del cuerpo humano permanecerían inalterables debido a la baja intensidad de la onda empleada.

Los hidrogeles elaborados a partir de polisacáridos naturales como el alginato y el quitosano han demostrado ser capaces de encapsular fármacos eficientemente, y permitir la liberación de éstos ante la aplicación de un estímulo ultrasónico, generando perfiles de liberación de fármacos más beneficiosos para el tratamiento de ciertas enfermedades [13,14]. Además, el 5-fluorouracilo es un fármaco ampliamente usado en los tratamientos de quimioterapia para tratar el cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, cáncer del aparato digestivo, etc. Su medio más común de administración es por vía intravenosa; sin embargo, aún siguen los estudios para encontrar otros medios de administración más accesibles y menos invasivos para el paciente [15,16].

En este trabajo de investigación estudió la encapsulación del fármaco 5-fluorouracilo en microesferas de doble capa alginato-quitosano, y la liberación del fármaco mediante estímulos con ultrasonido, para su posible aplicación en el tratamiento contra el cáncer.

# CAPÍTULO 1

## ANTECEDENTES

### 1.1 Sistemas de liberación de fármacos

El objetivo de un sistema de liberación de fármacos consiste en administrar un principio activo al cuerpo humano con el fin de ofrecer un efecto terapéutico en el organismo. De modo general, se pueden mencionar los siguientes tipos de sistemas de liberación de fármacos [17–19]:

- **Sistemas de liberación inmediata:** También llamados sistemas de liberación convencional o sistemas de liberación rápida; se refieren a formulaciones en los que la liberación de la sustancia o sustancias activas ocurre inmediatamente después de la primera administración.
- **Sistemas de liberación retardada:** También llamada liberación lenta; es una forma farmacéutica que busca retrasar la liberación de las sustancias activas. Aquí, el principio activo se liberará cierto tiempo después de la administración inicial.
- **Sistemas de liberación extendida:** Permiten que la liberación de las sustancias activas se prolongue durante un tiempo mayor, con el objetivo de reducir la frecuencia de administración de la dosis.
- **Sistemas de liberación sostenida:** También llamada sistemas de liberación continuada; mantiene una velocidad de liberación constante del principio activo.
- **Sistemas de liberación controlada:** A diferencia de la liberación sostenida, este sistema busca mantener constante la concentración del fármaco en el organismo, alargando el efecto terapéutico y disminuyendo los efectos secundarios.
- **Sistemas de liberación modificada:** Son todos aquellos sistemas cuya velocidad y/o sitio de liberación del principio activo difiere de la forma de liberación convencional, administrada por la misma vía.
- **Sistemas de liberación selectiva:** a veces llamado métodos de liberación inteligentes; son métodos de liberación que dirigen al fármaco o aumentan su concentración en un órgano o sitio específico del cuerpo humano. Estos sistemas han ganado interés con los nuevos desarrollos en la nanotecnología.

Se han realizado estudios de los dos últimos sistemas en donde se exploran materiales poliméricos que han demostrado tener la habilidad de liberar cargas de fármacos en respuesta a estímulos externos como cambios en el pH, luz, temperatura, campo eléctrico, campo magnético, y ultrasonido [11,12,20–22]. En todos los casos, el objetivo siempre es mejorar el efecto terapéutico y eliminar los riesgos de sobredosis y efectos adversos. En los últimos años, la investigación en este campo se ha vuelto popular por sus potenciales aplicaciones en el tratamiento de enfermedades tales como el cáncer y la diabetes [23–25].

## **1.2 Técnicas de encapsulación de fármacos**

Las técnicas de encapsulación de fármacos involucran la tecnología y los procedimientos necesarios para recubrir o encapsular el principio activo y formar las respectivas microcápsulas. Existen diversas técnicas para la microencapsulación de fármacos y, en general, se pueden clasificar en tres grupos:

- Procesos físicos o físico-mecánicos [26–28]:
  - Secado por aspersión: Consiste en dispersar el principio activo en la solución del material de recubrimiento y posteriormente nebulizar la mezcla homogénea en una cámara de secado. Mediante el uso de aire caliente el disolvente se evapora produciéndose así las microesferas.
  - Extrusión: El procedimiento inicia con la mezcla del principio activo y el material de recubrimiento, junto con estabilizadores y aglutinantes para formar una pasta húmeda. Posteriormente, la mezcla homogénea se pasa por un extrusor, los filamentos se cortan en longitudes pequeñas e iguales para luego ser redondeadas en forma de pellets. El proceso termina con el secado de las esferas húmedas.
  - Emulsificación: Este procedimiento consiste en la dispersión de un líquido en otro en el cual es inmiscible. Estas emulsiones son generalmente de tipo aceite/agua o agua/aceite; en la fase dispersa se encuentra el principio activo con el material de recubrimiento. Después, las partículas que recibirán el recubrimiento se suspenden en un lecho fluidizado (con corriente de aire hacia arriba), y el material de recubrimiento se nebuliza sobre las partículas. Cuando el material se deposita sobre las partículas, se solidifica por la acción del aire sobre el propio lecho. Se pueden



realizar ciclos aleatorios para que las partículas reciban sucesivas capas delgadas, y/o aplicar diferentes materiales de recubrimiento.

➤ Procesos físico-químicos [26,27]:

- Coacervación simple: La coacervación es un método que se basa en la separación de fases. De modo general, este método inicia con la preparación de un coloide, en cuya fase dispersa se encuentra el principio activo a encapsular mientras que en la fase continua se encuentra el polímero encapsulante y un disolvente. Luego, se induce una separación de fases mediante la adición de una sal, adición de un no-solvente, un cambio de pH o un cambio de temperatura, provocando que el polímero se deposite sobre las partículas de la sustancia a recubrir [8]. Las dos fases formadas se denominan “coarcegado” (pequeñas gotas del polímero con el principio activo encapsulado) y la “solución de equilibrio” (disolvente sin polímero). Posteriormente, el coarcegado se somete a un enfriamiento para endurecer la cubierta de las microesferas y, finalmente son aisladas por centrifugación o filtración.
- Coarcevación compleja: A diferencia de la coacervación simple, la coacervación compleja emplea dos o más coloides macromoleculares de carga opuesta para la formación de las microesferas. El procedimiento es igual al de coacervación simple: primero se prepara una emulsión que contenga el material a encapsular (fase dispersa) y los dos polímeros encapsulantes (fase continua). Mediante un cambio de pH, o la adición de una sal, se inducen las interacciones electrostáticas entre los dos polímeros activos, propiciando la separación de fases. La fase “coarcegada” serán las microesferas con el principio activo encapsulado, y la fase de “equilibrio” constará del disolvente sin los polímeros. Finalmente, se da lugar al endurecimiento de la pared de las microesferas mediante un entrecruzamiento o bajando la temperatura del sistema. Ejemplos de sistemas para coarcevación compleja pueden ser gelatina-goma de acacia; quitosano-alginato o quitosano-carragenina, etc. [29,30].
- Atrapamiento en liposomas: los liposomas son partículas microscópicas hechas principalmente de lípidos y agua. Tienen una estructura única que consta de una bicapa de fosfolípidos que las hacen vehículos adecuados para el encapsulamiento de fármacos [8,26]. De modo general, las microesferas se elaboran preparando una

suspensión de fosfolípidos en un disolvente orgánico, para luego paulatinamente sustituir el disolvente por una solución acuosa, en donde se encuentre el principio activo. Este cambio de disolventes obliga a los fosfolípidos a agruparse atrapando en su interior gran parte del medio acuoso en el que se encuentran.

➤ Procesos químicos [26–28]:

- Polimerización interfacial: Consiste en producir la polimerización de un monómero en la interfase de dos sustancias inmiscibles, formando una membrana que dará lugar a la pared de las microesferas [26]. El proceso consiste en disolver un monómero y el principio activo a encapsular en una solución acuosa y posteriormente iniciar la polimerización añadiendo un iniciador y, si es necesario, un catalizador. Durante la polimerización, una membrana se forma en la superficie de las gotas de agua, encapsulando al principio activo. Finalmente, las microesferas se pueden separar por centrifugación.

Adicionalmente, existen otras técnicas como la polimerización heterogénea, secado por liofilización y la inclusión molecular. La selección de la técnica para encapsular el fármaco depende de varios factores, entre los que se encuentran: el principio activo a encapsular, el tamaño de las microesferas que se desea obtener, costos y, por supuesto, los materiales utilizados para la microencapsulación, entre los que se pueden mencionar a los polímeros naturales, como son el alginato y el quitosano [26–28,31].

### 1.3 Alginato

El alginato o algina es un término comúnmente utilizado para referirse a las sales del ácido algínico, el cual es un polisacárido natural presente en las algas marrones que cumplen la función de darle elasticidad y resistencia a las paredes celulares del alga [32]. Los alginatos se encuentran en forma de sales de magnesio, sodio, estroncio, bario y, principalmente como una sal de calcio, las cuales son insolubles en agua [33].

Los alginatos son copolímeros lineales compuestos de dos tipos de monómeros: el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido- $\alpha$ -L-gulurónico (G). Estos dos monómeros se encuentran estructurados en bloques de homopolímeros (bloques de M y bloques de G) separados por bloques de

heteropolímeros (bloques de MG) (figura 1.1). La proporción de los monómeros M y G, así como la proporción de los bloques M, G, y MG, varían según la especie del alga [33,34].

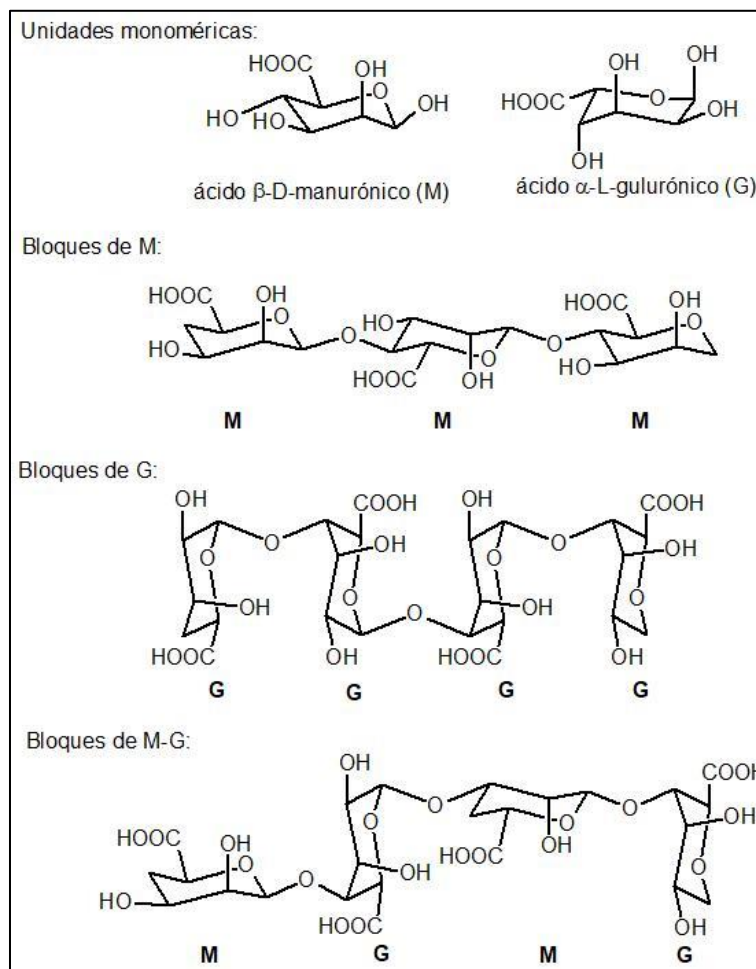


Figura 1.1. Estructura química del alginato.

La propiedad más notable de los alginatos es su capacidad para formar geles mediante una serie de reacciones químicas de intercambio iónico que dan lugar a la formación de enlaces entre las cadenas adyacentes del polímero de alginato [9]. Esta propiedad es aprovechada en la industria alimentaria para su uso como espesante, gelificante y estabilizante en la elaboración de salsas, mayonesas, productos lácteos, etc.; en la industria textil como espesante en pastas para teñir textiles; en biotecnología como inmovilizador de agentes catalíticos; en odontología como base para moldes dentales y; en la industria farmacéutica en la encapsulación de fármacos [9,35–37].

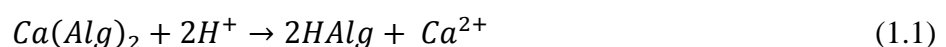
### 1.3.1 Extracción de alginatos a partir de algas pardas

Las algas pardas son un recurso natural muy valioso que pueden ser aprovechadas, en su forma natural o mediante un procesamiento, para la obtención de compuestos químicos como el alginato. Este último es un polisacárido con la propiedad de formar soluciones viscosas, o geles, ampliamente utilizado en las industrias alimentaria, farmacéutica y textil. Las propiedades y el rendimiento de la extracción de alginato dependen del tipo de alga fuente, siendo las principales especies *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Turbinaria* [38].

En los últimos años se ha observado una arribazón atípica de las algas pardas conocidas como sargazo (*Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*) a las costas del Caribe mexicano, lo que se ha convertido en un problema ambiental y económico desde 2011, año en el que empezaron a llegar en grandes volúmenes, y cuya cantidad ha ido creciendo año con año [39]. Al igual que las otras especies de algas, el sargazo tiene el potencial para la producción de alginatos; sin embargo, su empleo en la producción de hidrogeles poliméricos debe ser evaluado.

La metodología para la obtención de alginatos a partir de algas data de 1881, cuando el químico británico E. C. Stanford descubrió que una sustancia viscosa, a la que denominó algina, se formaba al realizarle una digestión con carbonato de calcio a las algas pardas; sin embargo, no fue hasta 1987 cuando McHugh definió dos caminos para la obtención de alginatos: el denominado “proceso del ácido algínico” y el “proceso del cloruro de calcio” [32]. Los procesos de obtención de alginatos son relativamente sencillos y constan de tres etapas principales: pretratamiento, extracción alcalina y precipitación. Las primeras dos etapas son iguales para ambos procesos.

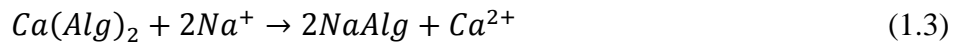
En la primera etapa, las algas recolectadas son pretratadas con formaldehído con el fin de remover compuestos fenólicos; posteriormente son maceradas con ácido clorhídrico con el objetivo de convertir las sales de alginato insolubles (como alginato de calcio) en ácido algínico, mediante la siguiente reacción:



El pretratamiento con formaldehído se puede omitir; sin embargo, se ha demostrado que la omisión de este paso da lugar a alginatos de color oscuro y de menor pureza.

Por otra parte, el paso con ácido clorhídrico es indispensable; la conversión a ácido algínico facilita la posterior extracción alcalina y aumenta la eficiencia del proceso [38].

La segunda etapa consiste en la extracción del alginato en su forma de sal de sodio. Esto se realiza mediante un tratamiento alcalino utilizando una solución de carbonato de sodio o hidróxido de sodio. Como el pretratamiento con ácido clorhídrico no necesariamente logra convertir todas las sales de alginato en ácido algínico, en la extracción alcalina compiten dos tipos de reacciones, las reacciones de neutralización y las reacciones de intercambio iónico:



El resultado de la extracción es una solución viscosa, en donde está disuelto el alginato de sodio; dicha solución debe ser separada de la celulosa y materiales no disueltos de las algas. Las condiciones de extracción como la temperatura y el tiempo de reacción pueden variar, siendo factores para poder controlar la viscosidad de la solución formada [40].

Para la última etapa, la precipitación, se tiene como objetivo el recuperar el alginato de sodio en forma sólida para lo cual se distinguen dos métodos: el método del ácido algínico y el método del cloruro de calcio.

En el primer método, el ácido algínico se precipita directamente agregando una solución de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico a la solución viscosa obtenida del tratamiento alcalino. Esto da lugar a un precipitado gelatinoso que se puede remover por flotación y debe ser deshidratado. La deshidratación es la parte más complicada, y se puede realizar mediante compresión, centrifugación o mezclándolo con alcohol. Por último, el alginato se seca y pulveriza.

En el segundo método, la solución viscosa de alginato se añade a una solución de cloruro de calcio, lo que da lugar a la precipitación del alginato de calcio en forma de fibras, que son fáciles de separar.

Después, estas fibras son tratadas con ácido clorhídrico ocasionando un intercambio de iones  $\text{Ca}^{2+}$  por iones  $\text{H}^+$ , dando lugar a la formación de ácido algínico, el cual también es fibroso e insoluble.

Finalmente, después de una deshidratación por compresión, el ácido algínico es convertido a alginato de sodio mediante una neutralización con carbonato de sodio o hidróxido de sodio, obteniendo una pasta viscosa que es secada, lavada y pulverizada.

En los trabajos de Fertah y cols. [41] se han reportado las condiciones óptimas para la obtención de alginatos, basándose en el proceso de ácido algínico reportado por McHugh [42].

### **1.3.2 Entrecruzamiento de alginato**

Las reacciones de entrecruzamiento en el alginato ocurren entre cationes multivalentes (comúnmente calcio) y las cadenas del polímero, dando lugar a la formación de un hidrogel con la capacidad de absorber grandes cantidades de agua. Específicamente, los cationes interactúan con los bloques G de las cadenas poliméricas, formando puentes comúnmente denominados “caja de huevo” (figura 1.2). Como los bloques G son los únicos que participan en el entrecruzamiento, la rigidez del gel es determinada por la proporción del monómero G del alginato. Otros factores que afectan el grado de entrecruzamiento son el tipo de catión multivalente, su concentración y la concentración del polímero [12].

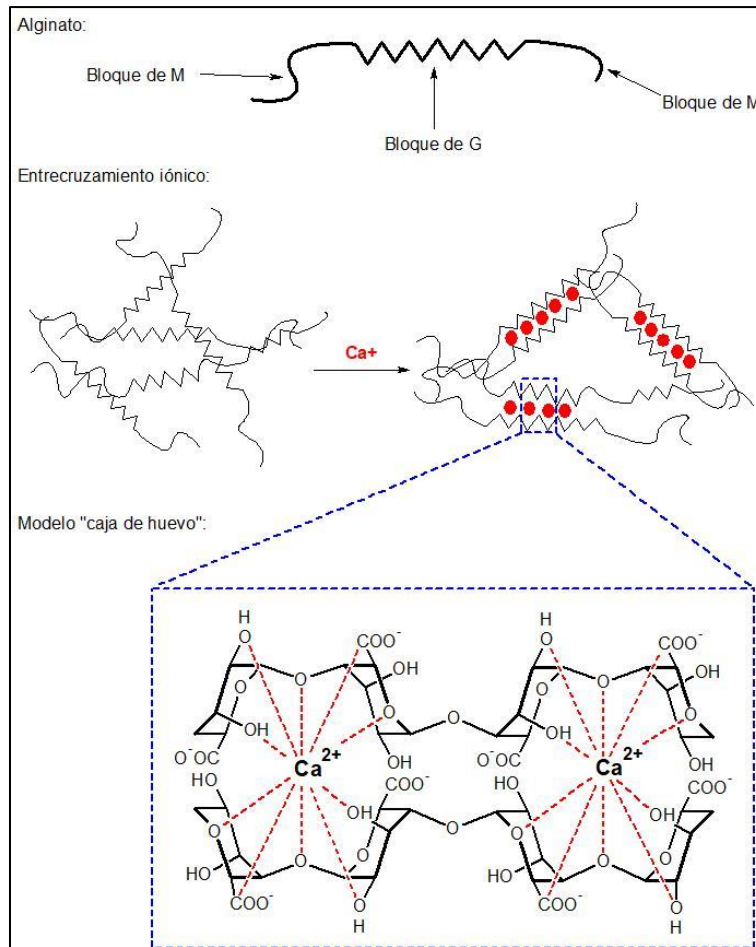


Figura 1.2. Entrecruzamiento iónico del alginato, modelo de "caja de huevo" [43].

Los cationes multivalentes empleados para el proceso de gelificación son comúnmente iones de calcio debido a su naturaleza no tóxica, bajo costo y fácil disponibilidad. Dependiendo de la fuente de difusión de los iones calcio se pueden distinguir dos mecanismos diferentes de gelificación: gelificación externa y gelificación interna.

En la gelificación externa, los iones calcio provienen de una solución externa. Aquí, una solución de alginato de sodio es agregada a una solución que contiene los iones calcio. Normalmente, se utiliza cloruro de calcio como fuente para los iones, aunque también se puede utilizar acetato monohidratado o lactato de calcio [44]. La formación del gel se va dando a medida que los iones calcio se van difundiendo desde la solución externa a la solución de alginato (figura 1.3).

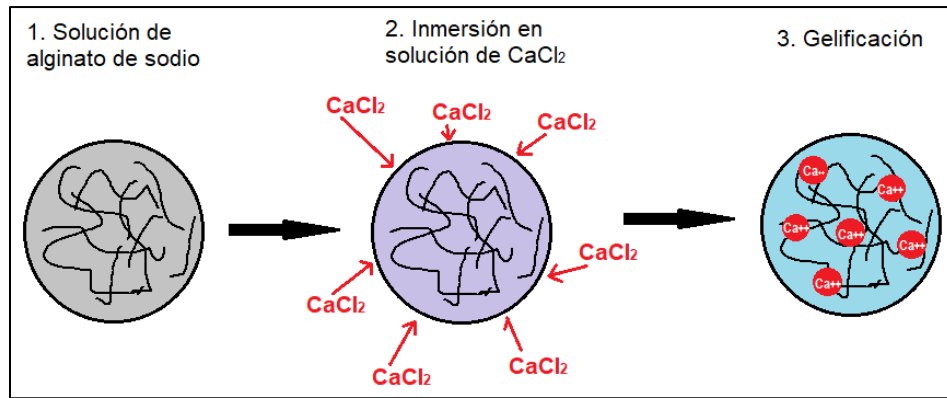


Figura 1.3. Mecanismo de gelificación externa [44].

En cambio, en la gelificación interna, la fuente de los iones calcio se encuentra inmersa en la solución de alginato en forma de una sal que es insoluble a pH neutro, pero soluble a pH ácido. Las sales más utilizadas son el carbonato de calcio y el fosfato tricálcico [44]. La liberación de los iones calcio ocurre cambiando el pH del medio mediante la adición de un ácido orgánico como el ácido acético o el ácido adípico, dando origen a la formación del gel (figura 1.4). La gelificación interna también se puede realizar con sales parcialmente solubles mediante el empleo de secuestrantes, como el sulfato de calcio. El secuestrante, o agente retardante, forma complejos con los iones calcio impidiendo una formación previa del gel. Al añadir el ácido orgánico y cambiando el pH del medio, los iones de calcio no se liberarán hasta que todo el secuestrante haya reaccionado, permitiendo la formación de un gel más homogéneo [38].



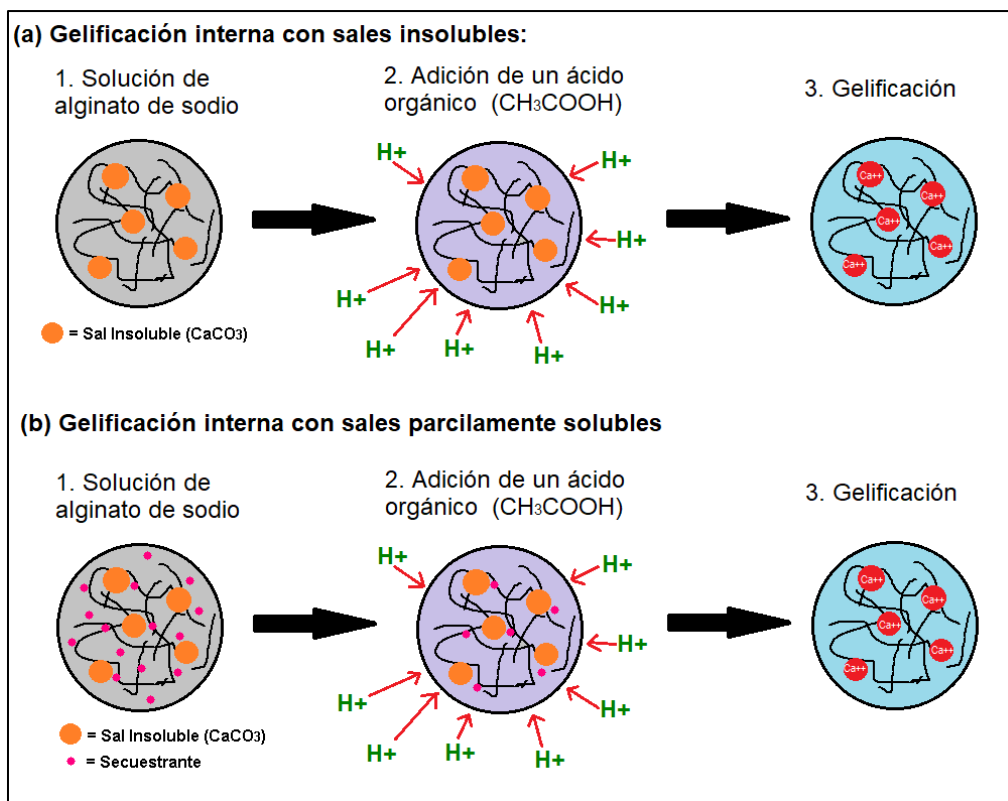


Figura 1.4. Mecanismo de gelificación interna [44].

Los mecanismos de gelificación se han utilizado con distintas técnicas para la encapsulación de diferentes sustancias como por ejemplo: tretinoína (vitamina A ácida y ácido salicílico) [45], dextranos [46], naproxeno [47], antibióticos (enrofloxacina) [23], probióticos [48], entre otros.

## 1.4 Quitosano

El quitosano es un biopolímero presente de manera natural en las paredes celulares de algunas algas verdes y hongos; sin embargo, su principal fuente de obtención es a través de la reacción de la desacetilación de la quitina, otro polímero muy abundante, presente en los caparazones de ciertos crustáceos. Es un copolímero lineal, compuesto por las unidades acetiladas 2-acetamida-2-deoxi-D-glucosa (D), también llamadas N-acetilglucosamina, y las unidades desacetiladas 2-amino-2-deoxi-D-glucosa (A), también llamadas glucosamina, distribuidas de manera aleatoria (figura 1.5).

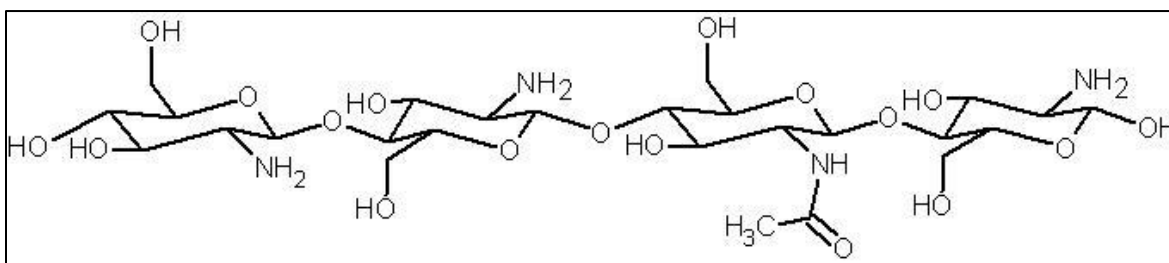


Figura 1.5. Molécula de quitosano (ACD/Chemsketch 2017.2.1).

El proceso de obtención del quitosano a partir de la quitina ocurre a través de una reacción extensiva de desacetilación, donde la quitina es sometida a un medio alcalino muy concentrado y a temperaturas cercanas a 100 °C. La quitina es un polímero compuesto en su mayoría por unidades de N-acetilglucosamina, aunque también posee algunas unidades de glucosamina, por lo que la diferencia entre una molécula de quitina y una molécula de quitosano radica en el grado de desacetilación de la molécula; varios autores coinciden en que el quitosano debe poseer un grado de desacetilación mayor al 50% [49].

Dependiendo de las condiciones específicas de la reacción de desacetilación, la proporción de unidades acetiladas y desacetiladas en la molécula varía. Así, las propiedades del quitosano dependen, entre otras cosas, del grado de desacetilación de la molécula, peso molecular, pH del medio, etc.

Entre las propiedades del quitosano podemos mencionar su solubilidad (que lo diferencia de la quitina), biodegradabilidad, biocompatibilidad, no es tóxico, posee propiedades bacteriostáticas y antifúngicas, capacidad de absorción, formación de geles, etc. Todas estas características se han aprovechado en áreas como la industria alimentaria (como estabilizante, conservante, prebióticos, etc.), la industria farmacéutica (como bacteriostático, anticoagulante, sistemas de liberación de fármacos, películas para piel artificial, etc.), la agricultura (antifúngico, sistemas de liberación de fertilizantes, etc.), cosméticos (gelificante, humectante, tonificante), y en el tratamiento de aguas residuales (floculante, reductor de olores, etc.) [50–53].

#### 1.4.1 Entrecruzamiento del quitosano

La naturaleza catiónica del quitosano le permite establecer interacciones de tipo iónico con agentes entrecruzantes de naturaleza aniónica, formando puentes entre las cadenas adyacentes, dando lugar a la formación de geles con distintas aplicaciones. Reactivos como el glutaraldehído, el glioxal y

el etilenglicol diglicil éter se han utilizado como agentes entrecruzantes para el quitosano; sin embargo, éstos han sido desplazados por su toxicidad [10,54,55]. En su lugar, sustancias no tóxicas y cargadas negativamente como el tripolifosfato de sodio, sulfato de sodio y citrato de sodio pueden interactuar con las moléculas de quitosano para dar lugar a entrecruzamientos de naturaleza iónica [55]. Ejemplos del entrecruzamiento con tripolifosfato de sodio y citrato de sodio se pueden observar en la figura 1.6.

Mediante el control de las condiciones de entrecruzamiento (concentración del agente entrecruzante, tipo de entrecruzante, pH del medio, etc.) se pueden obtener distintas densidades de entrecruzamiento, cristalinidad e hidrofiliicidad del material y así, extender el rango de aplicaciones de estos hidrogeles.

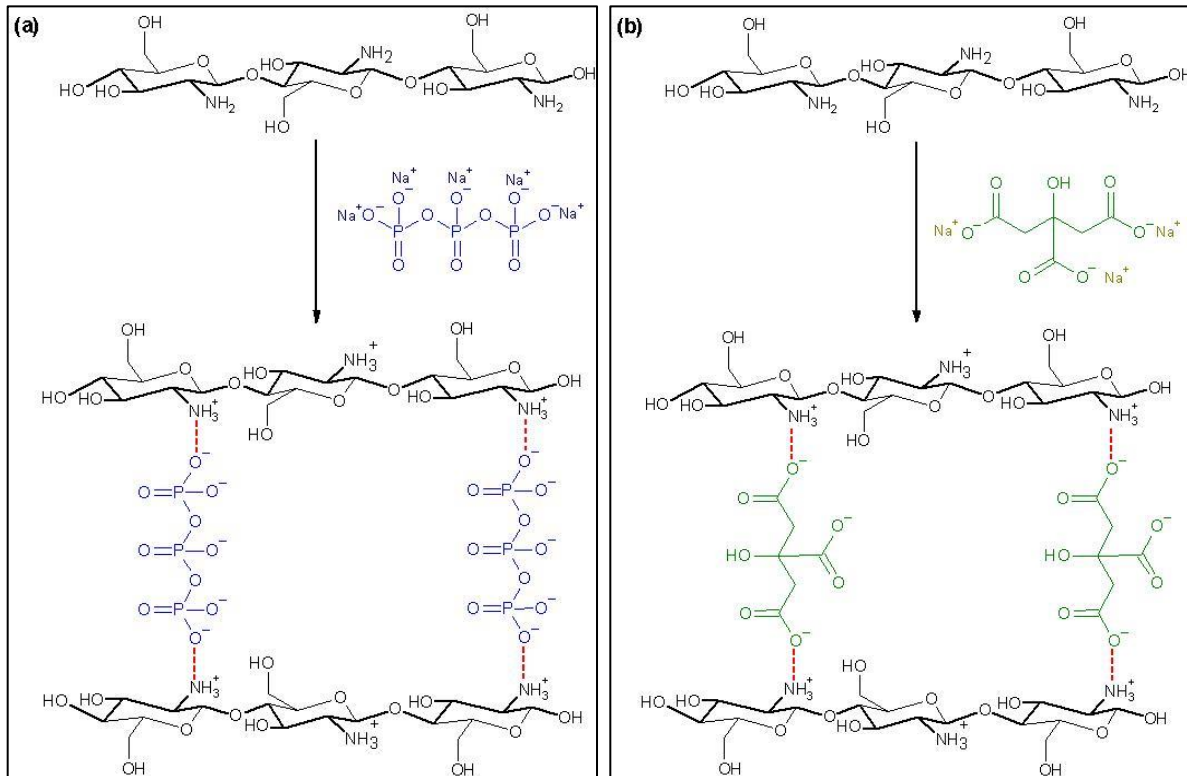


Figura 1.6. Entrecruzamiento iónico del quitosano con (a) tripolifosfato de sodio y (b) citrato de sodio (ACD/Chemsketch 2017.2.1).

## 1.5 Sistemas alginato-quitosano: revisión de la literatura

El alginato y el quitosano son macromoléculas que, al estar en contacto entre sí en un medio acuoso, pueden interactuar para formar complejos electrolíticos debido a que poseen cargas opuestas.

Por esta característica es que ambos polímeros son usados para la elaboración de sistemas de encapsulación [56].

En la literatura se pueden encontrar los trabajos de Ivanovska y cols. quienes mediante la técnica de secado por aspersión elaboraron microesferas de alginato-quitosano para encapsular probióticos. Los resultados mostraron que este sistema tiene potencial para la preservación y posterior liberación focalizada de los probióticos [57]. Otro estudio que utilizó la misma técnica es el de Simonoska y cols., quienes encapsularon budesónida en micropartículas de alginato-quitosano, para luego recubrirlas con el polímero Eudragit® S100. El sistema mostró una liberación sensible al cambio de pH y las micropartículas se mantuvieron estables hasta por 12 meses [58].

En otros casos, además de aprovechar la formación de complejos de polielectrolitos entre estos dos biopolímeros, también se aprovecha su capacidad de formar geles empleando un entrecruzante. Dependiendo de las técnicas empleadas, las microesferas formadas pueden estar compuestas de un núcleo de quitosano y una capa externa de alginato, o viceversa. Entre los estudios que han utilizado al quitosano como núcleo se encuentra el trabajo de Li y cols., quienes encapsularon albúmina de suero bovino en una esfera de quitosano utilizando tripolifosfato como entrecruzante; posteriormente, le añadieron una segunda capa de alginato. Los autores indican que la capa de alginato promueve la prolongación del tiempo de liberación y protege eficazmente a la proteína contra la degradación [59]. Otro estudio es el de Mi y cols., quienes prepararon microesferas de quitosano-alginato mediante el goteo de una solución de quitosano sobre una solución de alginato, reforzando el endurecimiento de la capa externa con genipina, un extracto del fruto de la gardenia, que utilizaron como un entrecruzante natural. Utilizando indometacina como fármaco modelo a encapsular, sus resultados indican que las microesferas muestran una buena compatibilidad celular [60].

Existen trabajos en los que se producen microesferas con un núcleo de alginato y una capa externa de quitosano, como el reportado por Zhang y cols., quienes encapsularon insulina mediante la técnica de emulsificación. El sistema mostró una liberación sensible al cambio de pH [61]. Sarmiento y cols. también encapsularon insulina, primero preparando nanoesferas de alginato entrecruzadas con cloruro de calcio y, posteriormente, añadiendo una segunda capa de quitosano. Sus estudios concluyeron que la encapsulación de insulina en este sistema mejoró la absorción y la bioactividad de la hormona [62]. Li y cols., elaboraron nanopartículas de alginato-quitosano con

un método similar: un núcleo de alginato-CaCl<sub>2</sub> y una segunda capa de quitosano, usando nifepidina como fármaco modelo. El sistema logró demostrar una liberación controlada sensible a cambios de pH [63].

Como se puede notar, los sistemas de alginato-quitosano se han utilizado para encapsular diversos compuestos (proteínas, probióticos, fármacos, etc.). En el caso del 5 fluorouracilo (5FU), se puede citar el trabajo de Nagarwal y cols., quienes encapsularon al 5FU en una nanoesfera de alginato-quitosano, para posteriormente agregar una segunda capa de quitosano. Sus estudios demostraron una eficiencia de encapsulación entre 6-26%, y una liberación sostenida, concluyendo que el sistema tiene potencial para el desarrollo de gotas para los ojos, para el tratamiento del carcinoma escamoso de la conjuntiva [64].

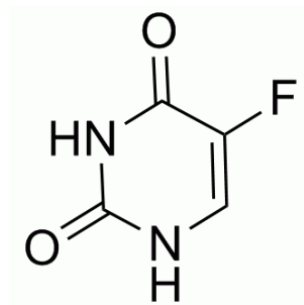
Aunado a los resultados positivos encontrados en la literatura para el sistema alginato-quitosano, se puede mencionar que los sistemas de liberación basados en hidrogeles de alginato y quitosano, formados a partir de entrecruzamientos iónicos, pueden ser activados mediante ultrasonido [13]. Tomando en cuenta esto último, este trabajo se elaboró un sistema bicapa de alginato-quitosano para la encapsulación del fármaco 5-fluorouracilo, aprovechando en conjunto dos capacidades del material observadas en los estudios mencionados: la capacidad de formar complejos polielectrolíticos al interactuar entre sí y, la capacidad de cada uno de formar geles en presencia de un entrecruzante como CaCl<sub>2</sub>, TPF y CTT, para finalmente probar su liberación desencadenada por un estímulo de ultrasonido.

## **1.6 5-Fluorouracilo**

El 5-fluorouracilo (5FU) es un fármaco de quimioterapia anticanceroso que pertenece al grupo de las fluoropirimidinas. Es un tipo de antimetabolito que se administra para el tratamiento de cánceres de mama, colon, recto, estómago y páncreas. Como molécula, es un análogo del uracilo en donde un átomo de flúor sustituye a un átomo de hidrógeno en la posición de carbono 5 (Figura 1.7). Su mecanismo de acción consiste en incorporarse en el ADN y ARN de las células cancerosas, inhibiendo procesos biosintéticos esenciales de las células y ocasionando que pierdan la capacidad de dividirse [65].

Los esquemas de administración del 5FU cambian dependiendo del cáncer a tratar, para lograr las dosis y modos de administración óptimas. La forma más común de administrar el 5FU es mediante

la vía intravenosa, las cuales varían en bolo intravenoso, infusión IV continua o infusión IV intermitente, utilizadas en el cáncer colorrectal, gastrointestinal y cáncer de seno [65–67]. A pesar de ser un fármaco de amplia aplicación para el tratamiento de distintos cánceres, el 5FU posee desventajas como su baja selectividad, una mala distribución en zonas tumorales y una corta vida media que requiere dosis más frecuentes y elevadas para mantener una concentración plasmática adecuada, resultando en efectos adversos para el paciente [68,69]. Por tal motivo, se busca desarrollar nuevas formas y vías de administración que permitan una liberación controlada del fármaco, disminuyendo las desventajas mencionadas. Entre las alternativas que se han estudiado se pueden mencionar el uso de nano y micropartículas [69,70], liposomas [71], arcillas [72], etc. [69].



*Figura 1.7. Molécula de 5-fluorouracilo.*

## **1.7 Ultrasonido**

El ultrasonido está compuesto de ondas sonoras con frecuencias que se encuentran por encima del umbral del oído humano. En el campo de la medicina, el ultrasonido se puede dividir en dos categorías: ultrasonido de diagnóstico y ultrasonido terapéutico [73]. El ultrasonido de diagnóstico utiliza las ondas sonoras como una técnica no invasiva para producir imágenes de los órganos internos del cuerpo u otras estructuras. Por otro lado, el ultrasonido terapéutico no produce imágenes, aunque tiene como objetivo interactuar con los tejidos del cuerpo humano para causar efectos biológicos benéficos. Entre los efectos que puede tener el ultrasonido terapéutico están el de calentar el tejido, mover o empujar el tejido, disolver coágulos o administrar fármacos a sitios específicos del cuerpo. Ambos tipos de ultrasonido trabajan con frecuencias arriba de los 20 kHz, pero en general, el ultrasonido terapéutico trabaja con frecuencias un poco más elevadas, dependiendo de la finalidad del tratamiento [74]. El uso más conocido del ultrasonido de diagnóstico es durante el embarazo, monitoreando el crecimiento y desarrollo del feto mediante las

ecografías obstétricas, aunque también se utilizan para obtener imágenes del corazón, el cerebro, los vasos sanguíneos, etc. Por su parte, el ultrasonido terapéutico se ha utilizado para tratar la artritis reumatoide, dolor musculoesquelético, cicatrización de heridas, etc. [75].

### **1.7.1 El uso del ultrasonido en la liberación de fármacos**

En el caso de la administración de fármacos, el uso del ultrasonido puede darse de distintas maneras. Por un lado, mediante el fenómeno denominado “sonoporación” (el cual consiste en provocar de manera selectiva pequeñas perforaciones en las membranas celulares) se estimula la captación del fármaco por el tejido a tratar [76,77]. Por otra parte, el ultrasonido terapéutico también se puede utilizar para desencadenar la liberación de un principio activo; primero, encapsulando el fármaco deseado y, posteriormente, ocasionando la ruptura de las microcápsulas, utilizando el ultrasonido, en el sitio de interés. El uso combinado de ambos mecanismos también es posible [73,76].

Los efectos del ultrasonido, junto con sus ventajas de ser no invasivo y no ionizante, han sido especialmente aprovechados en los tratamientos contra el cáncer, en donde se desea la muerte celular del tumor sin dañar al tejido sano [78,79]. En la terapia conocida como Ultrasonido Focalizado de Alta Intensidad (HIFU por sus siglas en inglés), se utilizan estas ondas en combinación con fármacos como sustitutos de cirugías para eliminar el tejido tumoral. Otro efecto de la terapia ultrasónica es la hipertermia, en la que se produce un aumento de temperatura en el tejido en tratamiento; también es aprovechado en terapias anticancerígenas por su efecto de disminuir el crecimiento del tumor [73,74].

Todas las ventajas que ofrece la terapia ultrasónica también se han aplicado en el tratamiento para la diabetes, enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, trombosis, glaucoma, etc., trabajando en un intervalo desde 20 kHz hasta 10 MHz [73,76].

### **1.7.2 Ultrasonido terapéutico**

El ultrasonido terapéutico se puede dividir en dos categorías: ultrasonido de baja intensidad, que se encuentra en el intervalo de 20 a 200 kHz, y de alta intensidad que se refiere a intervalos mayores a 200 kHz [80]. En la última década, el ultrasonido se ha combinado con la nanotecnología con el fin de mejorar la eficiencia de liberación de fármacos, e incluso existe un término para ello: la ultrasonoforesis, que se refiere al tratamiento por medio de energía ultrasónica para la introducción de sustancias en el cuerpo. La mayoría de los usos del ultrasonido terapéutico aún se encuentran

en etapas de investigación; por ejemplo, el ultrasonido de baja intensidad se ha estudiado para la curación de fracturas [81], en procedimientos quirúrgicos generales y remoción de tejidos [74], etc. mientras que el ultrasonido de alta intensidad se ha estudiado para el tratamiento de diversos tipos de cáncer [77].

El uso creciente del ultrasonido en la medicina y la aparición de nuevas tecnologías en los micro y nanomateriales hace necesario aumentar la demanda de trabajos de investigación sobre las interacciones del ultrasonido con diversos sistemas poliméricos.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

El grado de entrecruzamiento de la capa de quitosano, en el sistema de liberación de fármacos bicapa alginato-quitosano, y los estímulos de ultrasonido influirán sobre la cinética de liberación del 5-fluorouracilo, siendo menor la liberación a mayor grado de entrecruzamiento, y mayor cuando se somete a un estímulo de ultrasonido.

### **Objetivo general**

- Estudiar la influencia del grado de entrecruzamiento de la capa de quitosano, en un sistema de liberación de fármacos bicapa alginato-quitosano, sobre la cinética de liberación de 5-fluorouracilo activada por ultrasonido.

### **Objetivos específicos**

- Obtención y caracterización de alginatos a partir de algas.
- Estudiar la influencia del contenido del 5FU sobre el tamaño de las ME obtenidas, así como su eficiencia de carga.
- Estudiar la influencia de la concentración del entrecruzante (CTT) sobre el tamaño de las ME bicapa alginato-quitosano, así como la cinética de liberación de 5FU.
- Estudiar el efecto del ultrasonido sobre la cinética de liberación del 5FU desde las microesferas bicapa alginato-quitosano.

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Materiales

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de Macron Fine Chemicals (ácido clorhídrico), J.T. Baker (formaldehído, citrato de sodio), PQM Fermont (ácido acético) y Sigma Aldrich (carbonato de sodio, cloruro de calcio, quitosano, y 5-fluouroacilo).

#### 2.2 Metodología

La metodología del proyecto se puede dividir en tres etapas principales, mostradas en la figura 2.1.

##### 1. Alginato

- **Recolección y caracterización de algas**
- **Obtención y caracterización del alginato**

##### 2. Microesferas

- **Obtención de las ME de alginato y determinación de su morfología.**
  - **sin 5FU**
  - **con 5FU**
- **Obtención de las ME de alginato-quitosano y determinación de su morfología.**
  - **sin 5FU**
  - **con 5FU**

##### 3. Liberación de 5FU

*Figura 2.1. Etapas del trabajo de investigación.*

#### 2.3 Obtención de alginato

##### 2.3.1 Recolección de algas

Las algas cafés se recolectaron en la costa de Puerto Morelos, Quintana Roo, México en mayo de 2019. Posterior a su recolección, las algas se lavaron con abundante agua para eliminar restos de arena, microorganismos, etc., y se secaron al sol durante tres días. El material seco se trituró y tamizó utilizando tamices de malla No. 40, 50 y 60. Posteriormente, el cernido se caracterizó mediante un análisis proximal (humedad, grasa, fibra, cenizas, carbohidratos y proteína) en

colaboración con la Facultad de Ingeniería Química de la UADY. El cernido se utilizó para la posterior extracción de alginato, detallado a continuación.

### 2.3.2 Extracción de alginato

La obtención del alginato se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Fertah y cols. [41] con algunas modificaciones. Las algas previamente lavadas, secadas, trituradas y tamizadas (detallado en la sección 2.3.1) se sometieron a un blanqueo preliminar con una solución de NaClO al 0.5% (v/v) durante 1 h, y posterior lavado hasta pH neutro. Luego, las algas se sometieron a un pretratamiento con una solución de formaldehído al 2% durante 24 h y, después, las algas se filtraron y lavaron con abundante agua destilada. Seguidamente, las algas se añadieron a una solución de HCl 0.2 M y permanecieron en tratamiento durante 24 h para luego ser filtradas y lavadas con abundante agua desionizada. Posteriormente, se realizó una extracción alcalina con una solución de carbonato de sodio al 3%, durante 3 h a 60 °C. Después de la extracción, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 4200 rpm, se recuperaron los sobrenadantes y se realizó una precipitación utilizando el mismo volumen de etanol. El precipitado se lavó con etanol y se secó a 60 °C en un horno de vacío, obteniéndose un sólido blanco, el cual se molió en un mortero hasta obtener un polvo fino. En todo el proceso se utilizó una relación algas:solución de 1:25 (g/mL) y agitación constante. Un diagrama del proceso de extracción se puede ver en la figura 2.2.

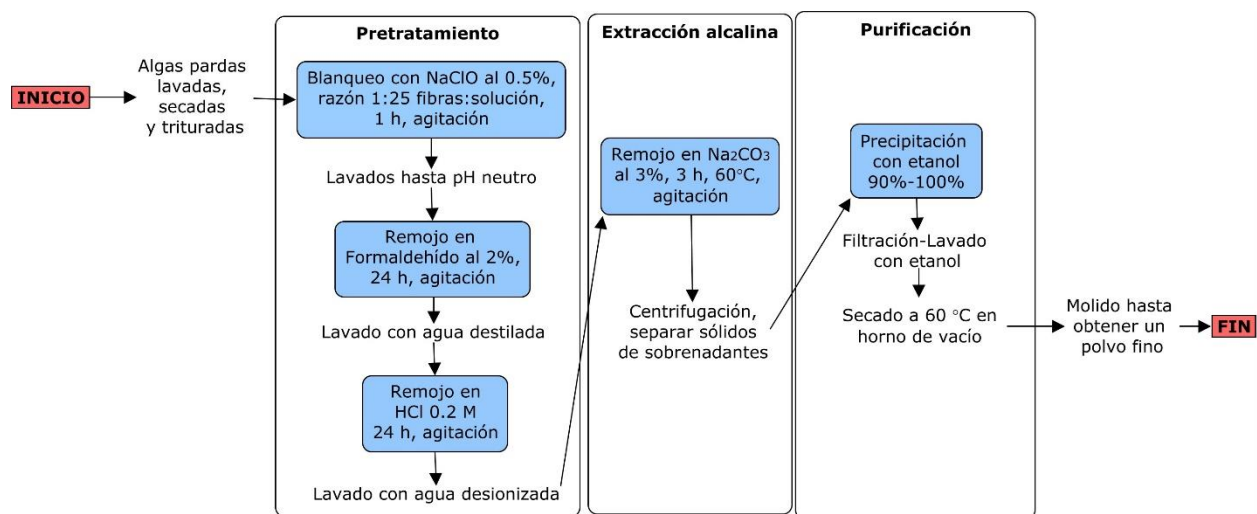


Figura 2.2. Metodología para la extracción de alginato.

## **2.4 Elaboración de microesferas**

### **2.4.1 Preparación de microesferas de alginato con y sin 5FU.**

Las microesferas se prepararon empleando el mecanismo de gelificación iónica externa [28,44]. Se utilizaron 15 mL de una solución de alginato al 2% p/v y se nebulizaron sobre 90 mL de una solución de cloruro de calcio al 3% p/v, con ayuda de un flujo constante de nitrógeno con 200 kPa de presión. Las microesferas se mantuvieron en la solución de CaCl<sub>2</sub> durante una hora, con agitación constante. Después, las microesferas se centrifugaron a 2800 rpm durante 10 minutos, se recuperaron y lavaron con agua desionizada para finalmente ser liofilizadas durante cinco días. Las microesferas obtenidas se observaron mediante SEM y microscopia óptica. Para las microesferas de alginato cargadas con 5FU, se prepararon 15 mL de una solución de alginato al 2% p/v y se añadieron 300 mg del fármaco 5FU (relación 1:1, alginato:5FU). La solución se mezcló hasta formar una solución homogénea y se nebulizó siguiendo las mismas indicaciones de las microesferas sin fármaco. Para la determinación de la cantidad de 5FU encapsulado, se recuperaron los sobrenadantes y se siguió el procedimiento detallado en la sección 2.5. La representación esquemática de la elaboración de microesferas se encuentra en la figura 2.3.

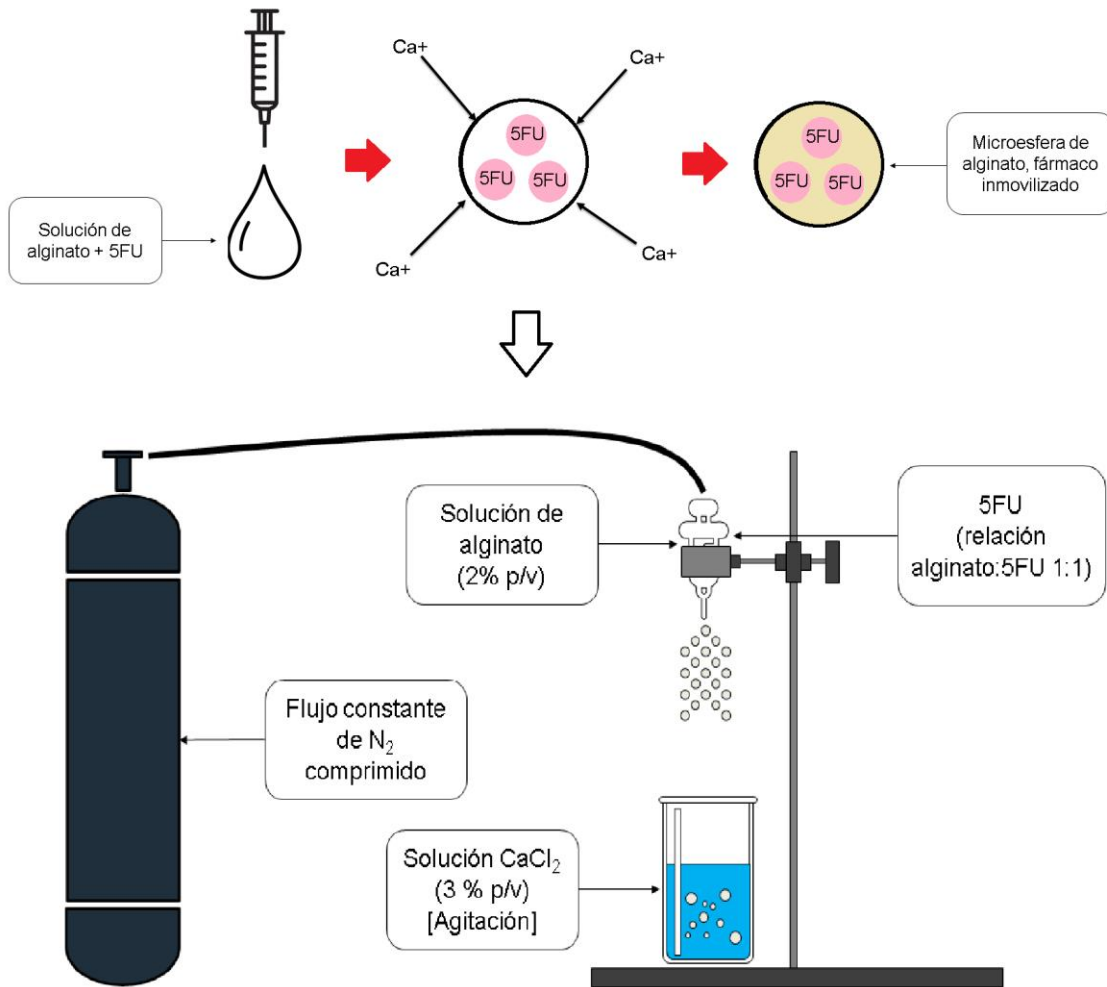


Figura 2.3. Procedimiento para la elaboración de microesferas de alginato.

#### 2.4.2 Elaboración de microesferas alginato-quitosano con y sin 5FU.

Las microesferas de alginato, con y sin 5FU, obtenidas en la sección anterior, se añadieron a una solución de quitosano al 0.5% p/v en ácido acético al 1% v/v. Después de mantenerse en agitación durante una hora, las microesferas se centrifugaron, se recuperaron, lavaron y añadieron a una solución en agitación de citrato de sodio (1% y 3% p/v). Después de una hora, las microesferas se centrifugaron, recuperaron, lavaron y liofilizaron durante cinco días. Una representación del procedimiento se puede ver en la figura 2.4.

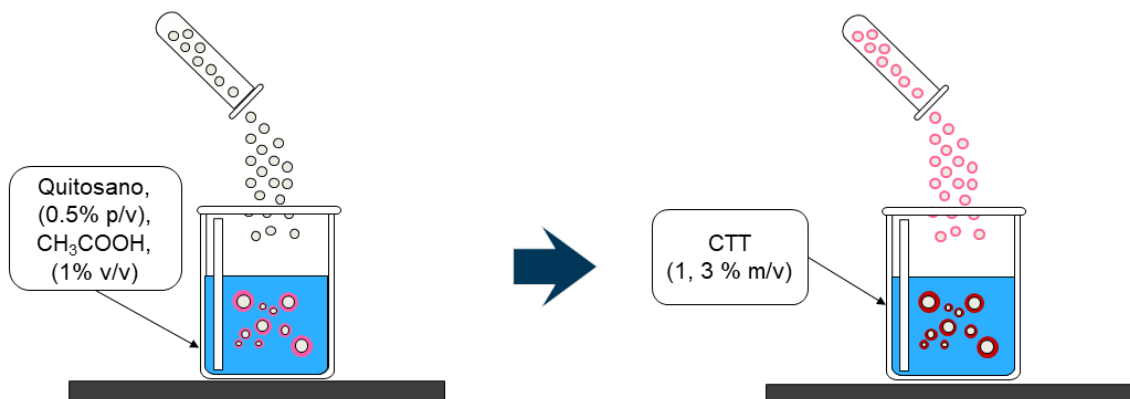


Figura 2.4. Procedimiento para la elaboración de microesferas alginato-quitosano.

## 2.5 Estudio de la liberación del 5FU

### 2.5.1 Determinación de 5FU encapsulado.

Para la determinación de la cantidad de 5FU encapsulado, previamente se realizó una curva de calibración para el fármaco. Para esto, se preparó una solución madre con 2 mg de 5FU diluidos en 40 mL de búfer fosfato salino (PBS) ( $\text{pH} = 7.4$ ). A partir de la solución madre ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) se preparó una solución con una concentración de  $20 \mu\text{g/mL}$  y se registró el espectro de absorción de 200 a 500 nm en un espectrofotómetro UV-Vis marca A&E Lab modelo AE-UV1608, para obtener la longitud de onda máxima de absorción del 5FU en el búfer fosfato salino (figura 2.5). Se observaron dos picos de absorción a  $\lambda = 208$  y  $\lambda = 264$  nm. Para las determinaciones de 5FU, en este trabajo se utilizó el pico de absorción a  $\lambda = 264$  nm, como se ha reportado previamente por Cojocarú [82], Nagarwal [64] y Wang [83].

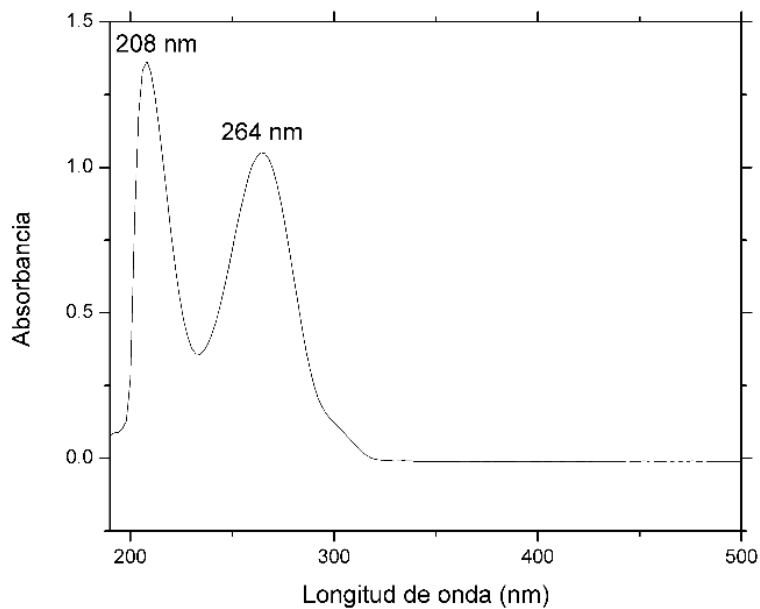


Figura 2.5. Espectro UV-vis de una solución 5FU/PBS.

De la solución madre se prepararon diluciones que contenían 0.5, 1, 4, 8, 12, 16, 20, 24 y 25.5  $\mu\text{g/mL}$  de 5FU/PBS y se determinaron sus respectivas absorbancias. Una solución de PBS sin 5FU se utilizó como blanco. Los valores obtenidos se graficaron para construir una curva de calibración mostrada en la figura 2.6, con un valor de correlación de  $R^2 = 0.9970$ .

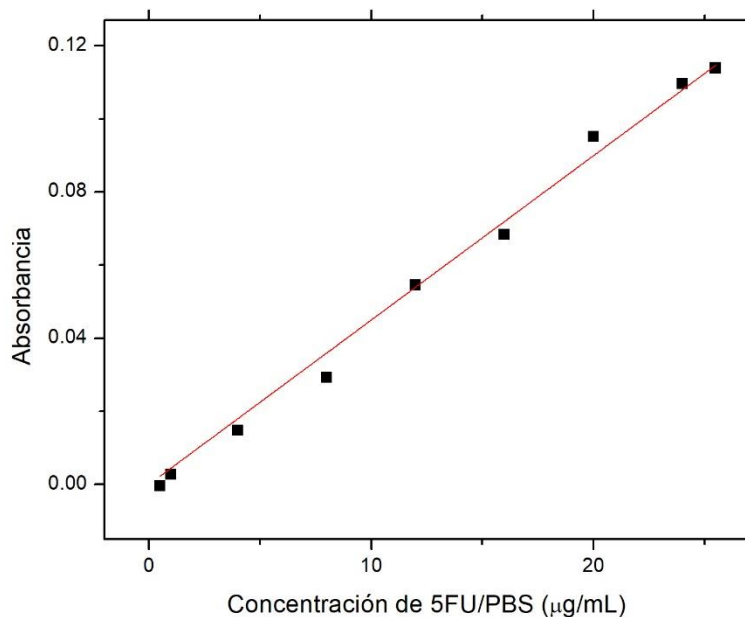


Figura 2.6. Curva de calibración del 5-fluorouracilo.

Después de centrifugar las microesferas en el procedimiento descrito en la sección 2.4.2, se recuperaron los sobrenadantes y se analizaron por espectroscopía UV-Vis para determinar la cantidad de fármaco no encapsulado, empleando la curva de calibración previamente obtenida. Mediante la diferencia entre el fármaco total cargado y el fármaco contenido en los sobrenadantes, se calculó la cantidad de 5FU contenido en las microesferas.

### **2.5.2 Determinación de la liberación del 5-fluorouracilo.**

500 mg (peso húmedo) de las microesferas de alginato y alginato-quitosano previamente cargadas con 5FU se colocaron en 15 mL de una solución de búfer fosfato salino (PBS), a pH 7.4 y  $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y se sometieron a estímulos de ultrasonido de 40 kHz, en un baño ultrasónico marca BRANSON modelo 2800, durante 1 minuto. Los primeros tres estímulos se realizaron cada 10 minutos, y los siguientes cada 30 minutos, con una duración total de liberación de tres horas. Después de cada estímulo de ultrasonido, se tomaron muestras de 4 mL reemplazando cada alícuota con el mismo volumen de un medio de disolución fresco para mantener la condición de perfecta solubilidad del principio activo (“sink conditions”, por su nombre en inglés [84]). Las alícuotas se analizaron por espectroscopía UV-Vis para determinar la cantidad de fármaco liberado.

## **2.6 Caracterización del alginato y microesferas.**

### **2.6.1 Análisis proximal**

Los análisis proximales fueron realizados en la Facultad de Ingeniería Química, UADY. Para la realización de los análisis se empleó la metodología de Weende. Se obtuvieron el contenido de humedad, proteína cruda (nitrógeno total), fibra cruda, lípidos crudos, ceniza y extracto libre de nitrógeno, éste último siendo una medida indirecta de los carbohidratos. Una descripción completa de los procedimientos utilizados se puede encontrar en Osborne y Voogt (1978), MAFF (1982) y AOAC (1984) [85–87].

#### **2.6.1.1 Humedad**

Se tomaron alrededor de 5-10 g de la muestra de sargazo previamente molida, se colocaron en un horno a  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 h y después se dejaron enfriar en un desecador. Finalmente, la muestra se pesó y el contenido de humedad se calculó utilizando la siguiente ecuación:



$$\text{Contenido de humedad (\%)} = 100 \cdot \frac{(B - A) - (C - A)}{(B - A)} \quad (2.1)$$

Donde A es el peso de la charolilla seca y limpia, B es el peso de la charolilla con la muestra húmeda, y C el peso de la charolilla con la muestra seca, todo expresado en gramos.

### 2.6.1.2 Proteína cruda

El contenido de proteína cruda se calculó de manera indirecta mediante la cantidad de nitrógeno en la muestra. Para calcular la cantidad de nitrógeno se utilizó el método simple propuesto por Chow y cols. [88]. Se pesó 1 g de muestra y se colocó en un matraz Kjeldahl; se agregó 10 g de sulfato de potasio, 0.7 g de óxido de mercurio y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se colocó el matraz en un digestor con un ángulo inclinado y se calentó a ebullición hasta que la solución se tornó clara, y posteriormente se calentó por media hora más. Luego, durante el enfriamiento de la muestra se adicionó poco a poco 90 mL de agua desionizada. Cuando la muestra estuvo completamente fría, se agregaron 25 mL de solución de sulfato de sodio, y se mezcló. Se añadió una perla de ebullición y 80 mL de solución de hidróxido de sodio al 40%. Después, el matraz se conectó a una unidad de destilación, se calentó y colectó 50 mL del destilado conteniendo el amonio en 50 mL de solución indicadora. Al terminar la destilación, se removió el matraz, se enjuagó la punta del condensador y se tituló con una solución estándar de ácido clorhídrico. Los cálculos para la cantidad de nitrógeno y proteína cruda en la muestra se realizaron como se muestra a continuación:

$$\text{Nitrógeno en la muestra (\%)} = 100 \cdot \left( \frac{A \cdot B}{C} \cdot 0.014 \right) \quad (2.2)$$

$$\text{Proteína cruda (\%)} = \text{Nitrógeno de la muestra} \cdot 6.25 \quad (2.3)$$

Donde A es el ácido clorhídrico usado en la titulación (mL), B es la normalidad del ácido estándar y C el peso de la muestra (g).

### 2.6.1.3 Lípidos crudos

En un dedal se pesaron aproximadamente 5 g de muestra seca y se colocó en una unidad de extracción soxhlet. El matraz se colocó en el extractor con éter petróleo a 2/3 del volumen total. La

extracción se llevó a cabo con 10 reflujos por hora, durante 6 horas. Al término de la extracción, el éter se evaporó utilizando un rotavapor. Finalmente, el matraz se colocó en un horno a 105 °C durante hora y media, se dejó enfriar en un desecador y se pesó. La ecuación utilizada para la determinación de lípidos crudos se muestra a continuación:

$$\text{Contenido de lípidos crudos (\%)} = 100 \cdot \frac{B - A}{C} \quad (2.4)$$

Donde A es el peso del matraz limpio y seco (g), B es el peso de matraz con grasa (g) y C es el peso de la muestra (g).

#### **2.6.1.4 Fibra cruda**

Se pesaron aproximadamente 2 g de muestra desengrasada y seca, se colocó en un matraz y se adicionó 200 mL de una solución de ácido sulfúrico 0.255 N en ebullición. Después, se colocó el condensador y la muestra se llevó a ebullición en un minuto, y se dejó hervir exactamente 30 min. Posteriormente, la muestra se filtró con ayuda de un embudo Buchner y papel filtro Whatman No. 541. El residuo del matraz se transfirió a una solución de NaOH en ebullición (0.313 N, 200 mL) y se dejó hervir por 30 min. Posteriormente, el residuo se lavó con agua hirviendo, luego con una solución de HCl al 1% v/v y nuevamente con agua hirviendo, para terminar con tres lavados con éter petróleo. Finalmente, el residuo se colocó en un crisol y se llevó a la mufla a 550°C por tres horas, se dejó enfriar en un desecador, se pesó y se calculó el contenido de fibra cruda con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de fibra cruda (\%)} = 100 \cdot \frac{A - B}{C} \quad (2.5)$$

Donde A es el peso del crisol con el residuo seco (g), B es el peso del crisol con la ceniza (g) y C es el peso de la muestra (g).

#### **2.6.1.5 Ceniza**

En un crisol de porcelana previamente calcinado y llevado a peso constante se colocó 5 g de muestra seca. El crisol con la muestra se colocó en una mufla a 550 °C y se calcinó durante 12 horas. Luego, se dejó enfriar en un desecador y se pesó. El contenido de ceniza se calculó como se muestra a continuación:

$$\text{Contenido de ceniza (\%)} = 100 \cdot \frac{A - B}{C} \quad (2.6)$$

Donde A es el peso del crisol con la muestra, B es el peso del crisol con ceniza y C el peso de la muestra, todo medido en gramos.

#### **2.6.1.6 Elementos libres de nitrógeno (ELN)**

Los elementos libres de nitrógeno se componen de todos los nutrientes no evaluados con los métodos señalados anteriormente. Están conformados mayormente por carbohidratos, por lo que se consideran una medida indirecta de éstos. Se obtiene como la resultante de restarle a 100 todos los porcentajes calculados para cada nutriente:

$$\text{Extracto Libre de Nitrógeno (\%)} = 100 - (A + B + C + D + E) \quad (2.7)$$

Donde:

A = Contenido de humedad (%)

B = Contenido de proteína cruda (%)

C = Contenido de lípidos crudos (%)

D = Contenido de fibra cruda (%)

E = Contenido de ceniza (%)

#### **2.6.2 Determinación de metales pesados.**

Para la determinación de metales pesados se realizó un análisis elemental siguiendo el procedimiento descrito por Alzate y cols. [89]. Brevemente, se realizó una digestión a 0.5 g de la muestra de sargazo en un vial de teflón de 75 mL, utilizando 7 mL de HNO<sub>3</sub> al 69%, 1.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.5 mL de HF (40-45%) y 2 mL de agua desionizada. Para la cuantificación de los metales pesados se utilizó espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, Perkin Elmer Optima 8000, Waltham, MA, USA). Se estableció una curva de calibración para cada

analito por triplicado. Estos análisis fueron realizados por la Unidad de Ciencias del Agua (UCIA) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

### **2.6.3 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)**

Se prepararon pastillas utilizando 2 mg de alginato de sodio y 200 mg de KBr. Se utilizó un equipo Thermo Scientific Nicolet 8700 para la obtención de los espectros infrarrojo. Los datos de las muestras se obtuvieron en un intervalo de número de onda de 4000-650  $\text{cm}^{-1}$ , con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$  y un promedio de 50 barridos.

### **2.6.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Para los análisis de RMN, las muestras de alginato se prepararon siguiendo el método ASTM F 2259 [90]. Primero, las muestras se sometieron a una hidrólisis ácida; para esto se prepararon 100 mL de una solución de alginato al 0.1 % p/v, se ajustó su pH a 5.6 utilizando HCl 1 M y se calentó a 100 °C durante 1 h. Después, el pH se ajustó a 3.8 usando HCl 1 M y se calentó nuevamente a 100 °C por 30 min. Posteriormente, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le ajustó el pH a 7.5 utilizando NaOH 1 M. Las muestras se liofilizaron para posteriormente ser disueltas en 2 mL de D<sub>2</sub>O (99.9%) y liofilizadas de nuevo. Después, 12 mg de la muestra de alginato se disolvieron en 1 mL de D<sub>2</sub>O (99.9%). Por último, se añadió 0.7 mL de la solución de alginato y 20  $\mu\text{L}$  del ácido trietilentetramino hexacético (TTHA) 0.3 M a un tubo para RMN. El espectro se obtuvo a 25 °C, con 32 escaneos y un tiempo de relajación de 1 s utilizando un espectrómetro marca VARIANT/ALIGENT de 600 MHz y un campo magnético de 14.1 T.

### **2.6.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

Para los análisis SEM se utilizó un microscopio JEOL JSM 6360 LV, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Las muestras fueron recubiertas con oro y se usó cinta conductora adhesiva de carbón para cubrir los portamuestras.

### **2.6.6 Viscosidad intrínseca y masa molar.**

Se utilizó un viscosímetro Cannon-Ubbelohde No. 50 ( $K=0.004393 \text{ mm}^2/\text{s}^2$ ) empleando una solución de NaCl al 0.1 M como disolvente. Se elaboró una solución madre de 0.3 g/dL para preparar soluciones con concentraciones de 0.02 a 0.3 g/dL. Los tiempos de fluencia se midieron por triplicado. Para el control de la temperatura se utilizó un baño de agua a 25 °C.

La viscosidad intrínseca del alginato se calculó mediante el método de Huggins y el método de Kraemer, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Viscosidad relativa } [\eta_{rel}] = \frac{t}{t_0} \quad (2.8)$$

$$\text{Viscosidad específica } [\eta_{sp}] = \eta_{rel} - 1 \quad (2.9)$$

$$\text{Viscosidad reducida } [\eta_{red}] = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (2.10)$$

$$\text{Viscosidad inherente } [\eta_{inh}] = \frac{\ln(\eta_{rel})}{C} \quad (2.11)$$

$$\text{Método de Huggins } \rightarrow [\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{red}) \quad (2.12)$$

$$\text{Método de Kraemer } \rightarrow [\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} (\eta_{inh}) \quad (2.13)$$

Donde  $t$  es el tiempo en que fluye un volumen determinado de la solución en el viscosímetro,  $t_0$  es el tiempo que fluye el disolvente en el viscosímetro y  $C$  es la concentración de la solución.

Una vez calculada la viscosidad intrínseca, la masa molar promedio se calculó usando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$\eta = K * M_v^a \quad (2.14)$$

Donde  $\eta$  está en dL/g,  $M_v$  está en kDa,  $K$  y  $a$  son constantes empíricas que dependen de las características del sistema, como la naturaleza del polímero, disolvente y temperatura.

### 2.6.7 Reología

El comportamiento reológico de soluciones de alginato se obtuvo mediante los perfiles reológicos (tasa de corte vs viscosidad) empleando un Reómetro AR 2000 de TA Instruments, con un sistema de control de temperatura Peltier a 25 °C. Se prepararon soluciones de 0.5, 1, 2, 3 y 4 % (p/v) y se utilizó la geometría de cono-plato con un ángulo de 2° y diámetro de 40 mm. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Obtención del alginato

##### 3.1.1 Identificación de las algas y análisis proximales

La identificación de las algas recolectadas se realizó a través de una revisión de la literatura y mediante las características físicas de las mismas. Según los estudios de los últimos 6 años, el problema creciente de la llegada de sargazo a la costa del caribe mexicano se atribuye a un aumento de la afluencia del denominado sargazo pelágico (especies de algas que flotan libremente sobre el océano atlántico), el cual se conforma principalmente de dos especies: *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans* [91,92]. Estas especies se describen como algas de tallo largo, con hojas pequeñas y delgadas, y vesículas rellenas de aire que les permite mantenerse a flote, características que coinciden con las muestras de algas recolectadas. La identificación de las especies se confirma con registros y fotografías del Laboratorio de la Costa del Golfo, de la Universidad del Sur de Mississippi [93], la base de datos sobre algas *AlgaeBase* [94,95] y la Red de observaciones Naturalista [96,97]. La figura 3.1 muestra una comparación entre el alga recolectada (izquierda) y la mezcla identificada como *Sargassum fluitans/Sargassum natans* (derecha).



Figura 3.1. Muestra de algas pardas después de secar (izquierda); fotografía de una muestra de *Sargassum* tomada de ©Deborah Barber en [www.naturalista.com](http://www.naturalista.com) (derecha).

En la tabla 3.1 se muestran los resultados de los análisis proximales de las muestras secas de *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*, después de haber sido tamizadas (se analizó el cernido del tamizado).

Tabla 3.1 Análisis proximales para la mezcla de *Sargassum natans* y *Sargassum fluitans*.

<b>Componente</b>	<b>[%] p/p</b>
<b>Humedad</b>	15.9 ± 0.2
<b>Componente (base seca)</b>	<b>[%] p/p</b>
<b>Cenizas</b>	19.1 ± 0.3
<b>Grasa</b>	0.9 ± 0.1
<b>Fibra</b>	14.1 ± 0.5
<b>Proteína</b>	5.3 ± 0.3
<b>Elementos Libres de Nitrógeno (ELN)</b>	60.6

Los resultados obtenidos en este estudio son muy similares a los reportados por otros autores. El contenido de ceniza de la muestra de *Sargassum* (*S. natans* y *S. fluitans*) fue menor comparado con el 27.1 % de Tamayo y cols. y mayor que el 15.4 % de Pérez y cols. [98,99]. El contenido de cenizas en las algas varía dependiendo de las condiciones hidrológicas y del tipo de alga, además de la cantidad de sales minerales que se adhieren a la superficie de las algas [98]. De acuerdo con Balboa y cols., el contenido de ceniza de las algas presenta sus máximos valores entre junio y octubre, y sus mínimas de marzo a mayo, y reportó una variación de 13.2-30.5 % para la especie de *Sargassum muticum* [100]. En este estudio, la recolección de algas se realizó en el mes de mayo y el valor se encuentra dentro del intervalo reportado por Balboa.

Para el caso de grasa, Pérez y cols. reportan un contenido de 0.4 % para *Sargassum sp*; Tamayo y cols. reportan 0.5 % para *Sargassum sp*; y Oyesiku y cols. obtuvieron 2.5 % grasa para *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans* [98,99,101]. El contenido de grasa fue el más bajo de todos los componentes; sin embargo, su importancia radica en que no todos los materiales crudos poseen lípidos, además de su valor nutricional [100]. En el caso de fibra, Pérez y cols. reportan un contenido de 7.15 % para *Sargassum sp*; Tamayo y cols. reportan 12.50 % para *Sargassum sp*; y Oyesiku y cols. obtuvieron 7.15 % de fibra para *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans*.

El contenido de proteína es similar al encontrado por Wong y cols. para la especie *Sargassum hemiphyllum* [102]. Wong también reportó un 11.3 % de proteína para la especie *S. henslowianum* y 7.56 % para *S. patens*. Tamayo encontró 6.9 % de proteína y Pérez y cols. obtuvieron 6.50 %, ambos para *Sargassum sp.* El contenido de proteína es importante por su valor nutricional con funciones estructurales y pueden variar según la especie, la zona geográfica, la estación o las condiciones ambientales, encontrándose reportes desde 5 % hasta 15 % [100]. Por último, los ELN son una medida indirecta de los carbohidratos y el valor más alto obtenido en este estudio. Otros estudios han reportado niveles de 55.88 %, 51.43 % y 57.30 % para distintas especies de *Sargassum* [98,99,101]. Una biomasa con altos niveles de carbohidratos tiene potencial para ser utilizadas en la producción comercial de monosacáridos y como sustratos para la producción de bioetanol [98].

En general, en el caso de las algas pardas, estudios muestran que son bajas en proteínas (6-11% para especies de *Sargassum*) pero altas en carbohidratos [103], datos que coinciden con los resultados obtenidos. El rendimiento de la extracción de alginato se calculó con base al peso seco del alga, según la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento [\%]} = \frac{\text{Peso seco alginato (g)}}{\text{Peso seco alga (g)}} \times 100 \quad (3.1)$$

En promedio, el rendimiento obtenido en la extracción del alginato de sodio a partir de algas pardas fue de 44.4%. Estos resultados son mayores que los obtenidos por otros autores para las mismas especies de algas. Iriyanti y cols. reportan un rendimiento de 22.42% para *Sargassum sp.*; Mohammed y cols. obtuvieron de 15-16 % para *Sargassum natans* y, Davis y cols. un 24.5% para *Sargassum fluitans* [104–106]. Un estudio en donde se obtuvieron altos rendimientos es el de Fertah y cols. con 51.8% y 44.01%, pero trabajando con la especie *Moroccan Laminaria* [41]. Fertah estudió el efecto del tamaño de las partículas de algas después de haber sido molidas y tamizadas sobre el rendimiento en el proceso de extracción del alginato, obteniendo el mayor rendimiento cuando el tamaño de las partículas fue menor de 1 mm. En este trabajo, la extracción se realizó con un tamaño de partícula de alga menor a 0.25 mm. Los altos rendimientos obtenidos colocan al sargazo mexicano como un producto potencial para la extracción y comercialización de alginato.



Con el fin de reducir las posibles impurezas del alginato extraído, se optó por realizar una segunda precipitación con etanol a las muestras obtenidas. La pureza del alginato es importante sobre todo al hablar de aplicaciones alimentarias y biomédicas. La presencia de impurezas, como polifenoles y proteínas, puede causar un efecto adverso al cuerpo humano, o bien, disminuir la biocompatibilidad del mismo [107]. Existen diversos procedimientos para aumentar la pureza del alginato, siendo la reprecipitación con etanol uno de los más económicos y prácticos [108].

### 3.1.2 Determinación de metales pesados

Como polímero proveniente de una fuente natural, los alginatos pueden contener contaminantes como los metales pesados, que pueden afectar su uso seguro en la alimentación y en la medicina. Por tanto, se realizó un análisis de metales pesados a la muestra extraída de alginato, cuyos resultados se muestran en la tabla 3.2.

*Tabla 3.2. Concentración de metales pesados en la muestra de alginato (<sup>1</sup>LDM corresponde a Limit Detection Method, la concentración mínima detectada por el método analítico).*

<b>Parámetro</b>	<b>Concentración [mg/kg]</b>
Arsénico	<LDM <sup>1</sup>
Boro	<LDM
Hierro	25.5
Zinc	757
Manganeso	<LDM
Cadmio	<LDM
Plomo	<LDM
Aluminio	595
Níquel	2.4
Cobre	3.1

En los análisis no se detectó contenido de arsénico, boro, manganeso, cadmio y plomo. Se detectaron muy pequeñas cantidades de cobre y níquel, y mayores concentraciones de Zinc y Aluminio. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) junto con organizaciones como El Consejo Internacional para la Armonización de

los Requisitos Técnicos para los Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) y la Convención Farmacopea de los Estados Unidos (USPC) elaboraron una guía para los límites permitidos de impurezas para productos farmacéuticos [109] en los que destacan el cadmio y el plomo. El arsénico, el cadmio y el plomo son los metales pesados más preocupantes en aplicaciones alimentarias y biomédicas debido a su toxicidad al cuerpo humano, por tanto, el alginato obtenido en este estudio no requiere un método de purificación adicional para su uso seguro en la liberación de fármacos, en cuanto a estos elementos.

### 3.1.3 Reología de las suspensiones de alginato

El conocimiento del comportamiento reológico de estas soluciones es importante para su aplicación en la industria, sobre todo cuando se consideran técnicas de encapsulación como la aspersion. Estudios han mostrado que el comportamiento reológico de los materiales encapsulantes influye en el tamaño y microestructura de las partículas obtenidas [110]. Por tanto, se realizaron las curvas de flujo de las soluciones de alginato en concentraciones de 0.5 al 4% p/v, las cuales se muestran en la figura 3.2.

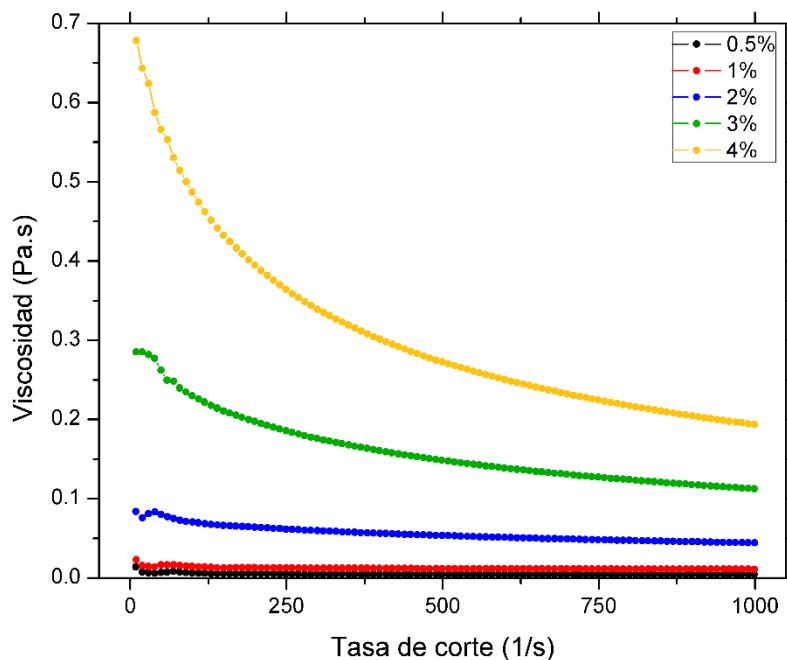


Figura 3.2. Curvas de flujo de soluciones de alginato obtenido de *Sargassum natans* & *Sargassum fluitans*.

Las soluciones de alginato muestran un comportamiento newtoniano cuando el polisacárido se encuentra a bajas concentraciones (0.5, 1 y 2 % p/v) aunque este comportamiento cambia a uno no

newtoniano de tipo pseudoplástico a concentraciones mayores de alginato (3 y 4% p/v). La viscosidad de las soluciones varía de 0.14 Pa·s para la concentración más baja y aumenta hasta a 0.67 Pa·s para la concentración más alta. Gómez y cols. mencionan que la precipitación directa de alginato con etanol produce un alginato con la capacidad de producir soluciones más viscosas, debido a que se evita la degradación de las macromoléculas como ocurre en la precipitación ácida [108]. De acuerdo con Prüsse y cols., viscosidades de 3% y superiores dificultan el procesamiento de la solución para la realización de esferas de alginato [111]. Por otra parte, una baja concentración de alginato también puede afectar la eficiencia de encapsulación, debido al poco polímero disponible para gelificación y retención del fármaco [112,113]. Entonces, de acuerdo con el comportamiento observado y para fines de esta investigación, se eligió una concentración de 2% de alginato para la realización de microesferas.

### **3.1.4 Espectroscopía Infrarroja con Transformadas de Fourier (FTIR).**

En la figura 3.3 se comparan los espectros de FTIR de diferentes muestras de alginato: alginato comercial (Sigma Aldrich), alginato crudo recién extraído (denominado alginato extraído), y finalmente, alginato purificado mediante una segunda etapa de precipitación con etanol (denominado reprecipitado).

El alginato extraído presenta señales a  $3474\text{ cm}^{-1}$  y  $3072\text{ cm}^{-1}$ , la primera se puede asociar a vibraciones de tensión de los grupos O-H, y la segunda a vibraciones de tensión tanto de enlaces N-H como de enlaces C-H de compuestos aromáticos [114–116]. Las bandas a  $1700\text{ cm}^{-1}$  y  $1468\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a las vibraciones de tensión de los grupos C=O pertenecientes a los residuos de ácido gulurónico y ácido manurónico presentes en el alginato; y cuyo desplazamiento varía si se encuentra en forma de ácido algínico (más cerca de  $1700\text{ cm}^{-1}$  y  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) o en forma de sal, como alginato de sodio (más cerca de  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $1400\text{ cm}^{-1}$ ) [117,118]. Adicionalmente, se observan dos fuertes señales a  $850\text{ cm}^{-1}$  y a  $594\text{ cm}^{-1}$ . Estas señales que no corresponden al alginato se pueden atribuir a la presencia de compuestos nitrogenados, como proteínas [116,119], restos de pigmentos como las fucoxantinas [120,121] y polisacáridos como los fucoidanos [122]. Los alginatos, por su naturaleza misma, pueden contener diferentes impurezas como pigmentos, proteínas, polifenoles, fucoidanos, saponinas, terpenoides, etc., encontrándose algunos de ellos incluso en pequeñas cantidades en alginatos comerciales [119].

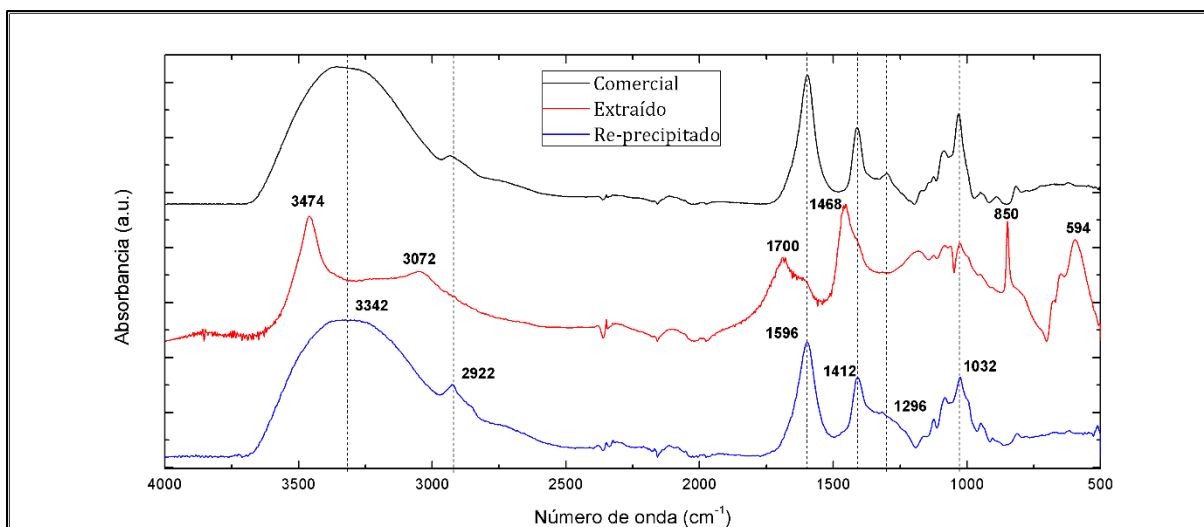


Figura 3.3. Espectros FTIR de diferentes muestras de alginato.

Por otra parte, las señales del alginato reprecipitado coincide con la muestra de alginato comercial, indicando que este paso es importante en el nivel de purificación del alginato. Esto coincide con el estudio de Gómez y cols. cuyo trabajo demostró que, en la ruta de obtención de alginato por medio de la precipitación con etanol, dos etapas de precipitación son suficientes para obtener un producto con un rendimiento y pureza aceptables [108]. Entre las señales encontradas para el alginato reprecipitado se encuentran las siguientes; en la región de 3600-2800  $\text{cm}^{-1}$  se encuentran las vibraciones de enlaces O-H y C-H; la primera banda centrada en 3342  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a la vibración de tensión de los grupos hidroxilo y la señal débil a 2922  $\text{cm}^{-1}$  se puede asociar a las vibraciones de tensión de los enlaces C-H, respectivamente [114,123,124]. Las dos bandas que aparecen en la zona entre 1700-1400  $\text{cm}^{-1}$  son características de los grupos carboxilatos de los alginatos [117]. La banda a 1596  $\text{cm}^{-1}$  se puede atribuir a la vibración de tensión asimétrica de un grupo carbonilo (C=O), perteneciente al ion carboxilato, y la banda a 1412  $\text{cm}^{-1}$  se puede relacionar con la vibración de tensión simétrica del mismo ion carboxilato, ambas desplazadas por la interacción con el ion sodio [114,117,118]. Por último, en la región de 1300-600  $\text{cm}^{-1}$ , denominada la zona de “huella digital”, la banda a 1296  $\text{cm}^{-1}$  se asocia a vibraciones de tensión de enlaces C-O y la banda a 1032  $\text{cm}^{-1}$  se relaciona a las vibraciones de tensión C-O (y C-C) del anillo de piranosa [125].

La capacidad del alginato para formar geles fuertes depende de la estructura de bloques de la molécula, específicamente de la cantidad de bloques G presentes en la cadena. Por tanto, la relación

de bloques G y bloques M del polímero es un indicativo de la naturaleza del gel que se puede formar. Una forma de estimar la razón M/G es analizando los espectros FTIR siguiendo la metodología propuesta por Mackie [126], Filippov y Khon [127], y más recientemente por Sakugawa y cols. [128]. Los autores sugieren que la razón M/G de los alginatos se puede estimar mediante la relación de absorbancias de ciertos números de onda ( $A_{808}/A_{787}$ ,  $A_{1320}/A_{1290}$ ,  $A_{1125}/A_{1030}$  y  $A_{1030}/A_{1080}$ ), con un margen de error entre 3-10%. La ventaja de emplear la espectroscopia FTIR radica en ser un método rápido y no destructivo para las muestras.

La razón M/G se calculó a partir del cociente de las absorbancias correspondientes a los números de onda antes mencionadas. Los resultados se muestran en la tabla 3.3.

*Tabla 3.3. Razón M/G del alginato de sodio obtenido.*

[126]	[127]		[128]
$A_{808}/A_{787}$	$A_{1320}/A_{1290}$	$A_{1125}/A_{1030}$	$A_{1030}/A_{1080}$
<b>1.002</b>	<b>1.003</b>	<b>1.004</b>	<b>1.005</b>

Como se puede apreciar, en todos los casos la razón M/G da valores ligeramente superiores a 1, independientemente de las bandas que se utilicen para calcular este parámetro. En este sentido, se tiene que los alginatos con una razón M/G pequeña (M/G menor a 1) son ricos en unidades gularónicas (bloques G) y tiene la capacidad de formar geles fuertes pero frágiles, y son aptos para la encapsulación de células y sustancias activas en la industria biomédica y ambiental; mientras que los alginatos ricos en unidades manurónicas (M/G mayor a 1) forman geles débiles pero flexibles, con potencial aplicación para el desarrollo de productos en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética [129].

### **3.1.5 Resonancia Magnética Nuclear**

La composición de la estructura de bloques y la razón M/G del alginato extraído se determinó utilizando la técnica de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H-RMN}$ ). Las frecuencias de las monadas ( $F_G$  y  $F_M$ ) y las diadas ( $F_{GG}$ ,  $F_{MM}$ ,  $F_{MG}$  y  $F_{GM}$ ) se calcularon comparando las áreas de las señales características de la zona entre 4.3 y 5.5 ppm, según las ecuaciones propuestas por Grasdalen y cols. [130]:

$$F_G = \frac{A_A}{A_B + A_C} \quad (3.2)$$

$$F_M = 1 - F_G \quad (3.3)$$

$$M/G = \frac{F_M}{F_G} = \frac{1 - F_G}{F_G} \quad (3.4)$$

$$F_{GG} + F_{GM} = F_G \quad (3.5)$$

$$F_{MM} + F_{MG} = F_M \quad (3.6)$$

Donde  $A_A$ ,  $A_B$  y  $A_C$  son las intensidades de las señales que aparecen en la zona entre 4.3 y 5.5 ppm, que corresponden a los protones enlazados a los carbonos 1 y 5, de las unidades manurónicas y gulurónicas, que se encuentran más desprotegidos por su cercanía al grupo carboxílico y al enlace glicosídico, respectivamente. Estas señales se pueden ver en el espectro RMN del alginato extraído presentado en la figura 3.4. La señal a 5.07 ppm se asocia al protón anomérico (es decir, el protón ligado al carbono 1) del ácido gulurónico, la señal a 4.67 ppm al protón anomérico del ácido manurónico y la señal a 4.49 ppm al protón H5 (es decir, el protón ligado al carbono 5) del ácido gulurónico.

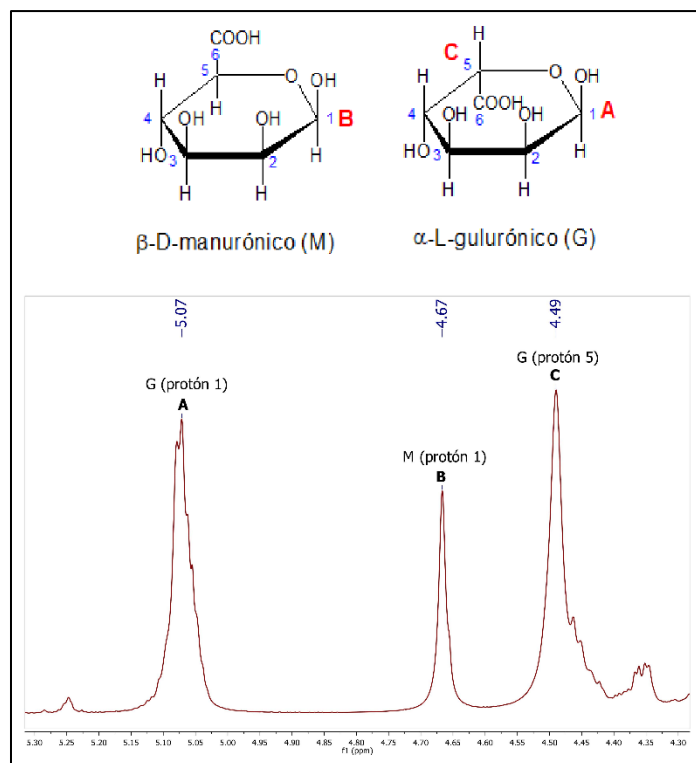


Figura 3.4. Espectro  $1H$  RMN del alginato extraído.

El espectro se analizó utilizando la herramienta de deconvolución del software MestReNova y los resultados se muestran en la tabla 3.4. La razón M/G de los alginatos varía según la especie de alga y está muy relacionado con la capacidad de formación de geles de los mismos. Un alginato con una razón M/G menor a 1 forma geles fuertes y rígidos, con potencial aplicación en encapsulación celular, áreas biomédicas y ambientales, mientras que los alginatos con una razón M/G mayor a uno pueden formar geles más flexibles con posible aplicación en productos farmacéuticos, alimenticios y cosméticos [105,129]. En este estudio, se encontró que el alginato extraído de las algas *Sargassum fluitans* y *Sargassum natans* tiene una razón M/G = 0.84, es decir, consta de una composición de 54.4% de ácidos gulurónicos y 45.6% de ácidos manurónicos, valores que son comparables con lo reportado por otros estudios [131,132]. Este resultado tiene una diferencia del 16% comparado con la razón M/G obtenida por FTIR. Hay que recordar que la técnica de RMN es más confiable y exacta para este tipo de cálculos, y el FTIR puede ser una alternativa rápida y no destructiva para estimar el valor M/G de la muestra.

Tabla 3.4. Composición química del alginato extraído.

Monadas		Díadas		Razón M/G
F <sub>G</sub>	0.544	F <sub>GG</sub>	0.492	<b>0.84</b>
F <sub>M</sub>	0.456	F <sub>MM</sub>	0.404	
		F <sub>GM</sub>	0.052	
		F <sub>MG</sub>	0.052	

Adicionalmente, la abundancia de bloques homopoliméricos se puede calcular con la ecuación de Grasdalen y cols.[130], con el parámetro:

$$\eta = \frac{F_{MG}}{F_G * F_M} \quad (3.7)$$

Valores de  $\eta$  menores a 1 se asocian con una distribución de bloques, y valores de  $\eta$  mayores a uno se asocian con una distribución alternada o al azar. En este estudio se obtuvo un valor de  $\eta$  de 0.21, sugiriendo que las cadenas se encuentran mayormente en una distribución de bloques. Esto correlaciona perfectamente con el valor de las diadas F<sub>GG</sub> y F<sub>MM</sub>.

Alternativamente, la estructura molecular del alginato se estudió mediante <sup>13</sup>C-RMN; en la figura 3.5 se muestran los espectros <sup>13</sup>C-RMN del alginato extraído y los desplazamientos atribuibles a las unidades manurónicas y gulurónicas de la cadena molecular del alginato se muestran en la tabla 3.5. Se pueden identificar tres grupos de señales, uno entre 60 a 80 ppm, el segundo alrededor de 100 ppm y el tercero alrededor de 175 ppm. Estos desplazamientos se asemejan a los identificados en otros estudios [124,125,128,133,134]. Los carbonos C1 (99.9 y 100.7 ppm) se refieren a los carbonos anoméricos de los enlaces glicosídicos, y los carbonos C6 (175.1 y 175.3 ppm) se refieren a los carbonos de los ácidos carboxílicos, los cuales se encuentran a campo bajo debido a sus enlaces a átomos de oxígeno. Los carbonos C4 (77.7 y 79.9 ppm) también forman parte de los enlaces glicosídicos de la molécula, pero al estar unidos sólo a un oxígeno, sus señales no se encuentran tan desplazadas a campo medio como los carbonos C1. El resto de las señales (64.8-75.7 ppm) corresponden a los demás carbonos del anillo glucosídico. Adicionalmente, el pico a 170.6 ppm se atribuye a la presencia de TTHA al momento de realizar los análisis de resonancia.



El TTHA es un quelante que previene que trazas de iones calcio interactúen con la molécula de alginato y afecten el análisis de resonancia. Los resultados de  $^{13}\text{C}$ -RMN confirman la estructura encontrada en los análisis de  $^1\text{H}$ -RMN y FTIR antes mencionados.

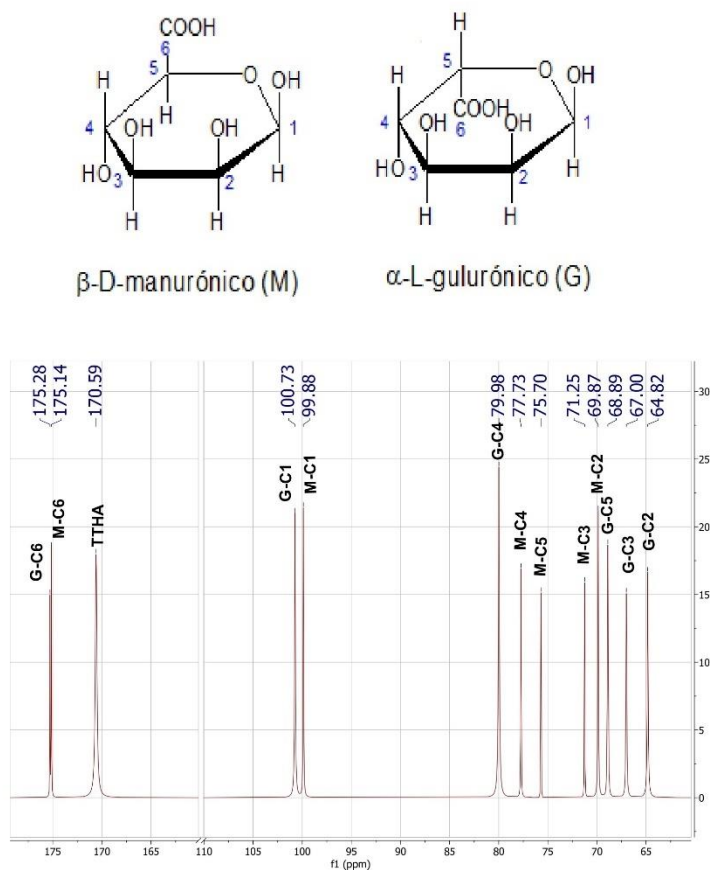


Figura 3.5. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del alginato extraído.

Tabla 3.5. Desplazamientos químicos del espectro RMN- $^{13}\text{C}$  del alginato extraído [124,125,134].

	Desplazamientos asociados al ácido manurónico (M)	Desplazamientos asociados al ácido gulurónico (G)
C1	99.9	100.7
C2	69.9	64.8
C3	71.3	67.0
C4	77.7	79.9
C5	75.7	68.9
C6	175.1	175.3

### 3.1.6 Viscosidad intrínseca y masa molar

La viscosidad intrínseca del alginato se determinó usando el método de Huggins (ecuación 3.8) y el método de Kraemer (ecuación 3.9), los cuales también se pueden expresar de la siguiente manera:

$$\text{Ecuación de Huggins} \rightarrow \frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + K_H[\eta]^2 c \quad (3.8)$$

$$\text{Ecuación de Kraemer} \rightarrow \frac{\ln(\eta_{red})}{C} = [\eta] - K_K[\eta]^2 c \quad (3.9)$$

Una forma clásica para resolver estas ecuaciones es graficando distintas concentraciones de las soluciones de alginato vs. las viscosidades reducidas (Huggins) e inherentes (Kraemer) de dichas soluciones, y extrapolar el valor de la viscosidad intrínseca al valor de la concentración cero. La figura 3.6 muestra las gráficas de Huggins y Kraemer con sus respectivos valores de correlación. Mediante la ecuación de Huggins, el valor de la viscosidad intrínseca se determinó en 3.511 dL/g, y mediante el método de Kraemer en 3.556 dL/g. Debido a que el método de Huggins presentó un mayor valor de correlación, se tomó este valor de viscosidad intrínseca para calcular la masa molar promedio.

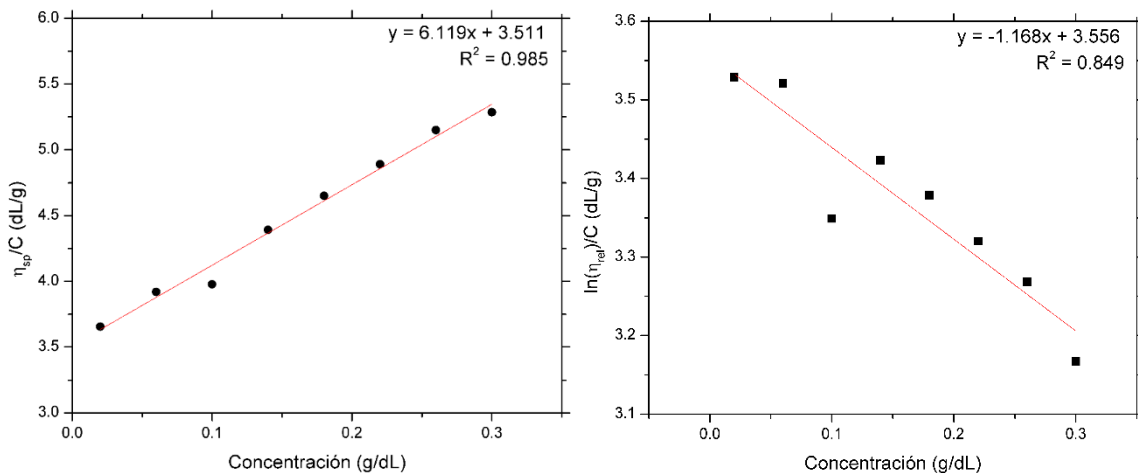


Figura 3.6. Gráfica de Huggins (izq.) y gráfica de Kraemer (der.) para la determinación de la viscosidad del alginato extraído.

La masa molar promedio de las muestras de alginato se calcularon a través de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada. (ecuación 2.14). Ramsackal y cols. [135] realizaron un estudio en donde determinaron los valores empíricos de  $K$  y  $a$  para alginatos extraídos de la especie *Sargassum natans*, con una correlación de 0.97, quedando la ecuación:

$$\eta = 0.000144 * M_v^{1.7} \quad (3.10)$$

Así, la masa molar de la muestra de alginato se calculó en 380.74 kDa, o bien,  $3.81 \times 10^5$  g/mol. En la tabla 3.6 se muestran las viscosidades y masas molares de diversos alginatos obtenidos de distintos tipos de algas pertenecientes a la especie *Sargassum*.

Tabla 3.6. Viscosidad intrínseca y masas molares de alginatos de diversas fuentes.

Alga fuente de alginato	Viscosidad intrínseca (dL/g)	Masa molar promedio $M_w \times 10^{-5}$ (g/mol)	Referencias
<i>Sargassum vulgare</i>	4.1 - 6.9	1.94 - 3.30	[131]
<i>Sargassum cristaefolium</i>	0.626 - 4.387	0.287 - 2.08	[136]
<i>Sargassum baccularia</i>	2.6	1.23	[137]
<i>Sargassum binderi</i>	9.5	4.55	[137]
<i>Sargassum siliquosom</i>	8.4	4.04	[137]
<i>Sargassum muticum</i>	3.8	0.34	[138]
<i>Sargassum natans</i>	2.59	3.45	[135]
<i>Sargassum fluitans &amp; Sargassum natans</i>	3.51	3.81	Este estudio

Las viscosidades reportadas para distintas especies de *Sargassum* van desde 0.63 hasta 9.5 dL/g y masas molares que van desde 0.29 hasta  $4.55 \times 10^5$  g/mol. Los valores obtenidos en este estudio ( $3.511$  dL/g y  $3.81 \times 10^5$  g/mol) se encuentran dentro del rango reportado.

Entre los factores que influyen en el valor de la masa molar del alginato son la temperatura y el tiempo de extracción: una temperatura de extracción muy alta lleva a la ruptura de las cadenas moleculares del alginato, disminuyendo la masa molar del mismo; sin embargo, los métodos de extracción fríos o a temperatura ambiente suelen tener bajos rendimientos [106,137]. Por otra parte, en las extracciones a altas temperaturas, un mayor tiempo de extracción puede llevar a un aumento de viscosidad debido a que se permite que las cadenas de mayor tamaño se disuelvan en el medio;

no obstante, tiempos muy prolongados conlleva a una disminución de la masa molar por efecto de la ruptura de los enlaces debido a la temperatura [131]. En los estudios en donde se obtuvieron masas molares de alrededor de  $3 \times 10^5$  g/mol (incluyendo este trabajo), las temperaturas extracción usadas fueron de 50-60°C y los tiempos de 3-5 h.

Por otro lado, los alginatos con mayor fracción de unidades gulurónicas tienden a poseer una mayor viscosidad debido a la rigidez de estos bloques, y viceversa, los alginatos con mayor fracción de unidades manurónicas tienden a poseer una menor viscosidad, por predominar la parte flexible de la misma [139]. En los análisis de RMN se determinó que el alginato extraído contenía ligeramente mayores fracciones  $F_G$  y  $F_{GG}$ , que se pueden asociar con los valores de masa molar encontrados.

### **3.2 Microesferas de alginato.**

#### **3.2.1 Rendimiento de la producción de microesferas**

Se elaboraron las microesferas de alginato mediante la nebulización de una solución de alginato al 2% empleando nitrógeno comprimido.

El rendimiento de la elaboración de microesferas se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Microesferas obtenidas después de liofilizar (g)}}{\text{Material total utilizado (g)}} \times 100 \quad (3.11)$$

En promedio, el rendimiento para las microesferas sin fármaco fue de 8.46% y para las microesferas con fármaco fue de 7.01%. Unos de los factores importantes a considerar en la producción de microesferas por esta técnica es la altura entre la descarga de la nebulización y la superficie de la solución receptora; en este caso se empleó una separación de 6.5 cm. Con estas condiciones se obtuvieron microesferas las cuales tienen tendencia a aglomerarse durante los procesos de separación (centrifugación) y que fácilmente lograron almacenarse en suspensión acuosa, en refrigeración. En general, es habitual encontrar rendimientos bajos en métodos de encapsulación por aspersion, debido a que las micropartículas se pierden durante el proceso de nebulización [58,140]. En este caso, por la distancia utilizada entre la fuente de dispersión y la solución de  $\text{CaCl}_2$  (6.5 cm), se evitó que muchas partículas cayeran fuera del recipiente en donde se encontraba la solución; sin embargo, muchas de estas microgotas quedaban atrapadas en las paredes del recipiente formando una película que finalmente debía ser retirada, siendo ésta la

principal problemática en cuanto al rendimiento obtenido. Por otra parte, y en menor medida, podemos suponer que el exceso de cloruro de calcio utilizado (comparado con la cantidad de alginato) contribuye a disminuir el porcentaje del rendimiento. Un exceso de cloruro de calcio es necesario para garantizar la gelificación iónica del alginato, aunque es evidente que deben hacerse estudios adicionales para encontrar la concentración óptima de este reactivo para la producción de microesferas bajo los parámetros utilizados.

### 3.2.2 Morfología

La morfología de las microesferas se observó mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. En el primer caso, las muestras fueron colocadas en un portaobjetos y fueron observadas utilizando una magnificación x10 en modo de transmitancia. En la figura 3.7 se muestran fotografías de las microesferas tomadas en el microscopio óptico, con y sin 5FU.

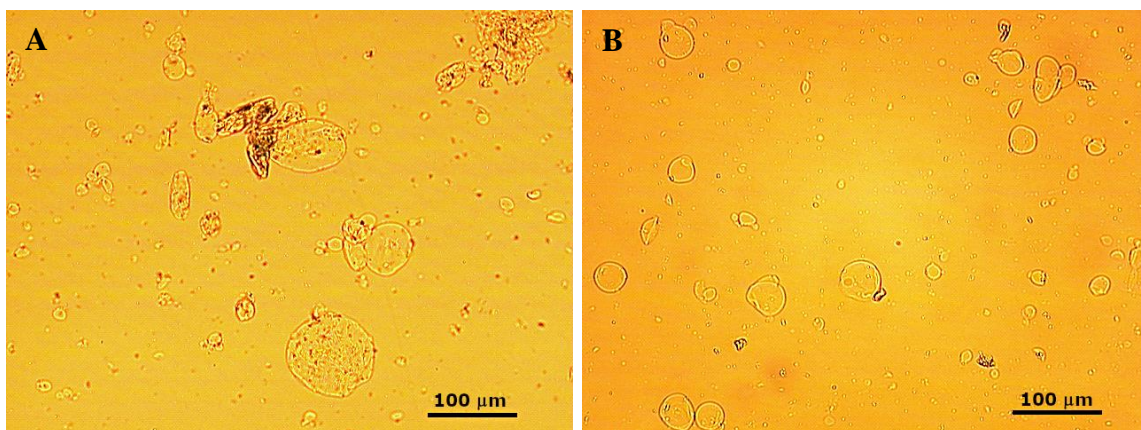
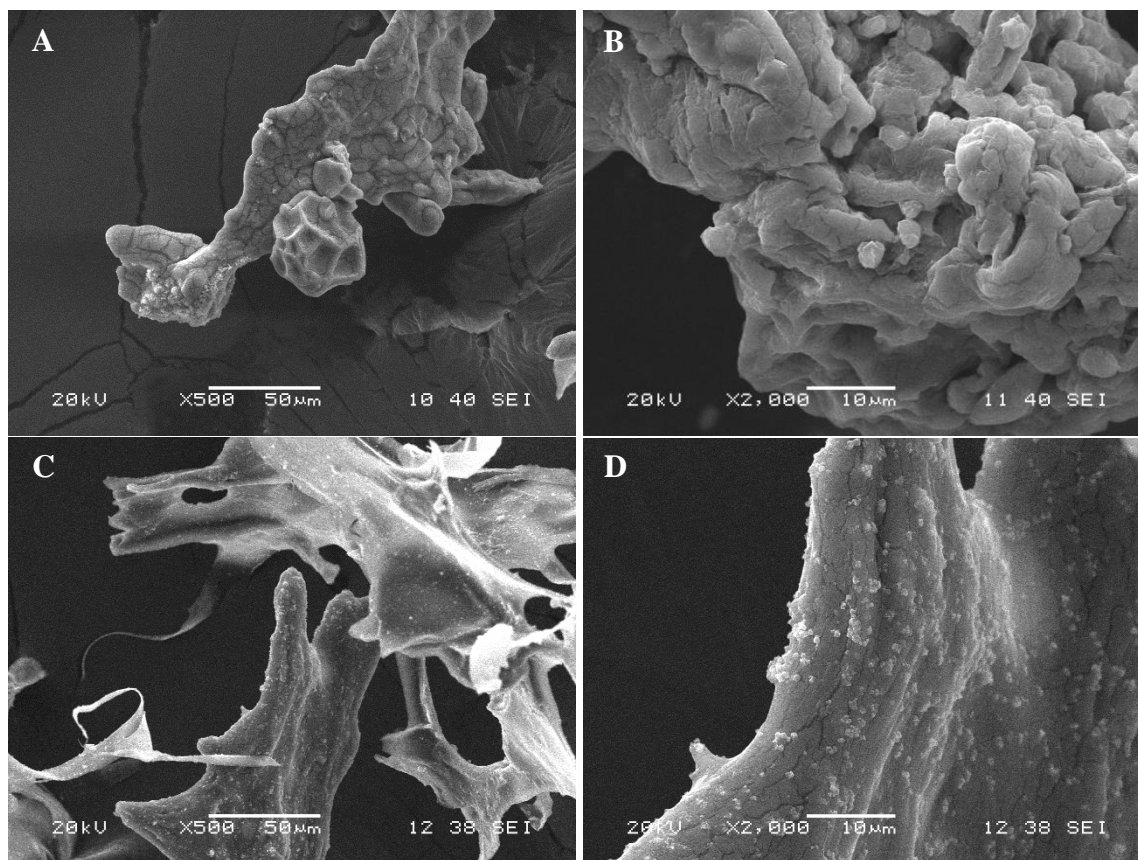


Figura 3.7. Imágenes captadas con el microscopio óptico de microesferas de alginato sin 5FU (A) y con 5FU (B).

Se puede observar que las micropartículas obtenidas son en su mayoría esféricas, aunque algunas muestran una morfología irregular, y con una tendencia a aglomerarse durante el proceso de elaboración. Algunas microesferas muestran partículas adheridas (puntos oscuros) que se atribuyen al cloruro de calcio en exceso que no reaccionó. Utilizando el software ImageJ, se calculó el diámetro de las microesferas de alginato sin 5FU en  $120 \pm 80 \mu\text{m}$  ( $n=160$ ) y de las microesferas de alginato con 5FU en  $88 \pm 41 \mu\text{m}$  ( $n=170$ ). La disminución del diámetro promedio se puede atribuir a la presencia del mismo fármaco; el 5FU (figura 1.7) posee grupos N-H y un flúor en su estructura, que pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos carboxilos e hidroxilos del alginato (figura 1.1), solvatando mejor la molécula de alginato, mejorando su solubilidad y disminuyendo su

viscosidad, lo que facilita la formación de partículas más pequeñas en el proceso de nebulización. La diferencia de diámetros también pudo ser evidente en las suspensiones de las microesferas, siendo las cargadas con fármacos aquellas que tardaban mucho más en precipitar, comparadas con las microesferas sin fármaco. Si bien no se ha estudiado el efecto del 5FU en la forma y tamaño de microesferas de alginato, Patel y cols., al igual que Smrdel y cols. estudiaron los efectos de otros medicamentos en la elaboración de microesferas de geles de alginato, encontrando que la razón fármaco:alginato, así como el grado de cristalinidad del fármaco, pueden afectar la morfología y tamaño de las esferas obtenidas [141,142].

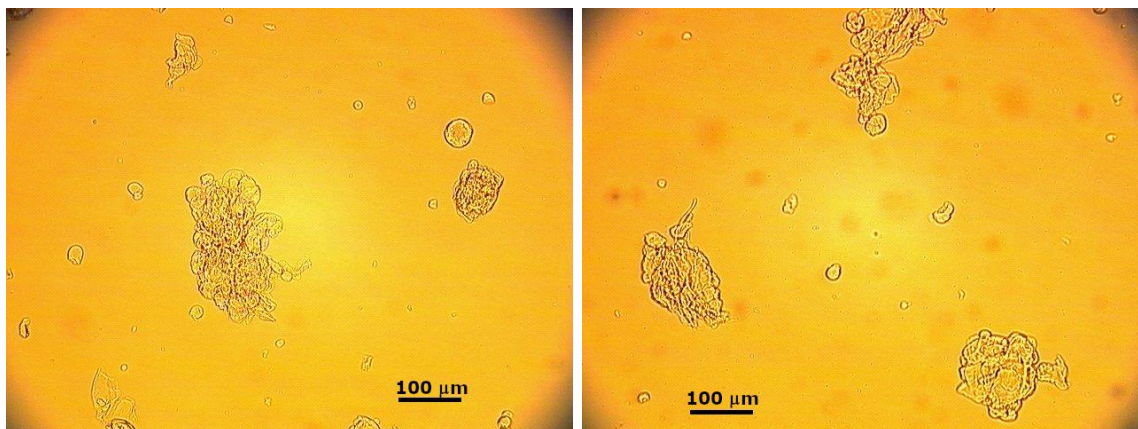
La figura 3.8 muestra las imágenes SEM de las micropartículas de alginato con y sin fármaco después de liofilizar. Debido a la pérdida de agua por la liofilización y a la tendencia a la aglomeración, las microesferas se muestran colapsadas, con una superficie porosa que es característica de los geles de alginato [40,143]. En el caso de los geles cargados con 5FU, un acercamiento muestra una superficie más lisa y con la presencia de pequeños cristales asociados al fármaco añadido [15].



*Figura 3.8. Imágenes SEM de las micropartículas de alginato después de liofilizar; sin 5FU (A y B) y con 5FU (C y D).*

Con el fin de evitar la liberación del fármaco de manera prematura, se adicionó una capa externa de quitosano a las microesferas de alginato. El alginato y el quitosano, por la naturaleza iónica de sus moléculas, pueden interactuar entre sí en medios acuosos formando complejos; sin embargo, es este estudio se decidió reforzar el entrecruzamiento de la capa externa de quitosano mediante la adición de un entrecruzante, el citrato de sodio (CTT), estudiando dos concentraciones para el CTT (1% y 3% p/v).

Como prueba preliminar, se recubrieron microesferas de alginato con una capa de quitosano sin ningún tipo de entrecruzante. Las esferas obtenidas se pueden encontrar en la figura 3.9. Se observa evidentemente que las esferas resultantes tienen una superficie mucho más rugosa, en comparación con las esferas de sólo alginato, característica que se asocia a los geles formados por el quitosano. Se distingue además que, debido a la tendencia a la aglomeración de las microesferas, el quitosano tiende a recubrir a varias esferas juntas a la vez.



*Figura 3.9. Microesferas de alginato recubiertas de quitosano.*

La figura 3.10 muestra fotografías de las microesferas alginato-quitosano entrecruzado con diferentes concentraciones de citrato de sodio. Las superficies de las esferas se observan menos rugosas comparadas con las microesferas anteriores, las cuales no fueron tratadas con algún entrecruzante. Esto coincide con lo encontrado por otros autores, que reportan que la presencia de un entrecruzante como el tripolifosfato de sodio (y en este caso, citrato de sodio) suaviza la superficie de los geles de quitosano, debido al entrecruzamiento [7].

En las microesferas marcadas con los números 1,3 y 4 se observa cómo la capa de quitosano rodea perfectamente a la partícula de alginato, formando una esfera bicapa. Sin embargo, en algunas otras, como las señaladas con los números 2 y 5, la capa externa de quitosano no rodea de forma uniforme a la partícula de alginato, haciendo que la partícula de alginato no se encuentre en el centro de la esfera. La figura 3.10 (D) es una magnificación 50x de una microesfera bicapa entrecruzada con una concentración de CTT al 3% p/v. En ella se observa una diferencia en la densidad de la capa externa de quitosano, siendo más gruesa en el área cercana al alginato (señalada con una flecha), y más uniforme en el resto de la esfera. Estudios anteriores han demostrado que el quitosano es capaz de penetrar en esferas de alginato, gracias a las interacciones entre los grupos amino del quitosano y los grupos carboxilo del alginato, formando complejos, y mejorando la retención de fármacos [61,144]. La zona gruesa que rodea a la esfera de alginato es evidencia de esta primera formación de complejos, y en la parte más externa de la esfera predomina el entrecruzamiento del quitosano con el citrato de sodio.



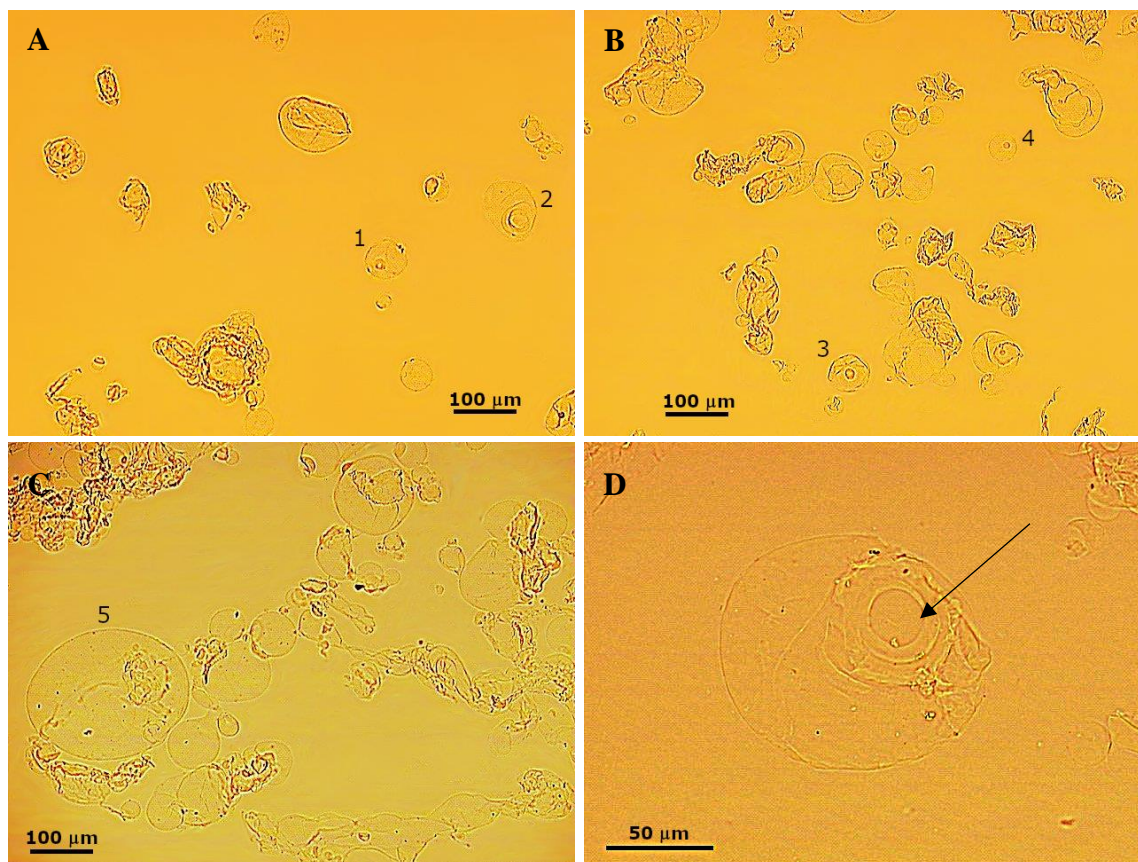
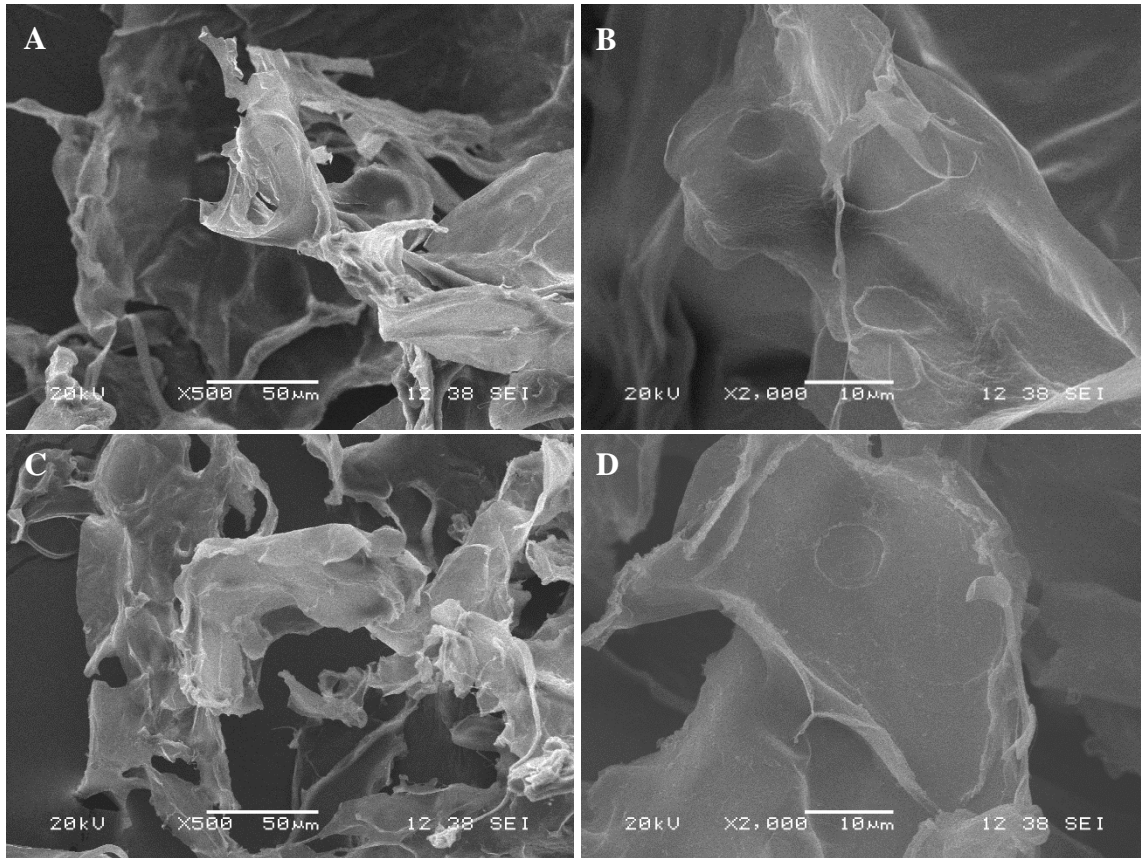


Figura 3.10. Imágenes captadas con el microscopio óptico de las microesferas de alginato-quitosano entrecruzado con CTT al 1% p/v (A y B) y CTT al 3% p/v (C y D).

De igual manera, se calculó el diámetro de las microesferas bicapa alginato-quitosano entrecruzadas con CTT al 1% p/v en  $127 \pm 46 \mu\text{m}$ , y de las microesferas de alginato-quitosano entrecruzadas con CTT al 3% p/v en  $161 \pm 71 \mu\text{m}$ . Ambos tipos de esferas aumentaron su diámetro con respecto a las esferas de sólo alginato, debido a la presencia de la capa externa de quitosano. La capa de quitosano entrecruzada a mayor concentración presentó un diámetro promedio mayor, comparada con la de menor concentración. La alta concentración del entrecruzante aumenta la cantidad de iones citrato enlazados entre la molécula de quitosano, incrementando el grosor de la microesfera.

La figura 3.11 muestran imágenes SEM de las microesferas entrecruzadas con CTT, al 1 y 3%. Al igual que las microesferas anteriores, éstas también se muestran colapsadas por el proceso de liofilización.



*Figura 3.11. Imágenes SEM de las micropartículas de alginato-quitosano entrecruzado con CTT al 1% p/v (A y B) y al 3% p/v (C y D) después de liofilizar, en magnificación 500x (A y C) y 2000x (B y D).*

Por último, la figura 3.12 muestra a las microesferas bicapa cargadas con 5FU. En la figura 3.12A se observa el caso de dos microesferas que están rodeadas por una capa de quitosano (ver estructura señalada por la flecha). Lo anterior es debido a que las ME presentan una tendencia a la aglomeración. El diámetro de estas ME se calculó en  $122 \pm 49 \mu\text{m}$ , para esferas tratadas con 1% p/v de CTT, y en  $144 \pm 70 \mu\text{m}$  para la concentración de 3% p/v, mostrando nuevamente la tendencia a un mayor diámetro con una mayor concentración de CTT.

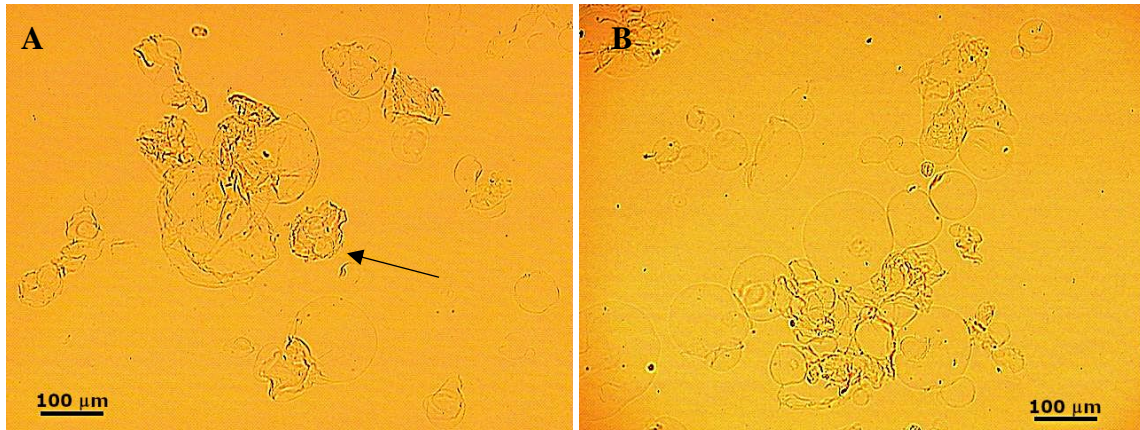


Figura 3.12. Imágenes captadas con el microscopio óptico (10 x) de las microesferas de alginato-quitosano entrecruzado con CTT al 1% (A) y CTT al 3% (B) cargadas con 5FU.

### 3.3 Estudio de la liberación del 5FU

#### 3.3.1 Determinación del 5FU encapsulado

La eficiencia de encapsulación (EE) se define como la cantidad de fármaco que fue cargado, en comparación con la cantidad total inicial utilizada, mientras que la capacidad de carga del fármaco (CCF) se define como la cantidad de fármaco cargada por unidad de masa de micropartícula. Estos parámetros son indicadores importantes en la microencapsulación de fármacos que ayudan a evaluar el éxito de este. La EE y la CCF se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 & \text{Eficiencia de Encapsulación (EE)} \\
 & = \frac{\text{Cantidad total de 5FU} - \text{Cantidad de 5FU en sobrenadantes}}{\text{Cantidad total de 5FU}} \quad (3.12)
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 & \text{Capacidad de Carga de Fármaco (CCF)} \\
 & = \frac{\text{Cantidad total de 5FU} - \text{Cantidad de 5FU en sobrenadantes}}{\text{Peso de microesferas después de liofilizar.}} \quad (3.13)
 \end{aligned}$$

La cantidad total de fármaco en las ME, se calculó mediante la diferencia del 5FU presente en los sobrenadantes. Para esto, durante la elaboración de las microesferas cargadas con fármaco (detallado en la sección 2.4.2), se recuperaron los sobrenadantes después de la centrifugación y una

muestra de éstos se leyeron en el espectrómetro UV-Vis. La curva de calibración utilizada para calcular la concentración de 5FU se puede encontrar en la sección 2.5. Finalmente, las microesferas se liofilizaron y pesaron para seguir con el cálculo.

En promedio, los valores de EE y CCF se calcularon en 25.4% y 44.3% respectivamente, evaluando tres lotes de encapsulación. Estos valores son mayores a los obtenidos por Nagarwal y cols. [64] para el mismo tipo de fármaco, pero menores comparados con ME preparadas mediante otras metodologías y/o con otros principios activos. Existen muchas variables que influyen en la eficiencia de encapsulación y en la capacidad de carga de fármaco; entre éstas se encuentran: la cantidad de polímero (alginato) utilizado, la cantidad de entrecruzante utilizado ( $\text{CaCl}_2$ ) y la cantidad de fármaco cargado. Un exceso de fármaco puede disminuir la eficiencia de encapsulación debido a que la cantidad de alginato disponible para encapsularlo no sería suficiente [15]. También hay que tomar en cuenta el tiempo que pasan las micropartículas en la solución de cloruro de calcio y la cantidad de  $\text{CaCl}_2$  utilizado; si bien es necesario un cierto tiempo para que los iones de calcio interaccionen con las moléculas de alginato para dar lugar al entrecruzamiento iónico, tiempos muy prolongados pueden llevar a la difusión del fármaco del polímero al medio por el gradiente de concentración [45]. Sin embargo, esto se podría controlar con una concentración alta de  $\text{CaCl}_2$  al disminuir la solubilidad del fármaco en la solución [45,145]. En el caso específico de este estudio, se utilizó una cantidad de fármaco igual a la cantidad de alginato utilizado (300 mg) y las microesferas permanecieron una hora en agitación en la solución de  $\text{CaCl}_2$ , cuya concentración era del 3%.

### **3.3.2 Pruebas de liberación con y sin ultrasonido.**

En la figura 3.13 se muestran los perfiles de liberación del 5FU obtenidos a partir de las distintas microesferas poliméricas con y sin tratamiento de ultrasonido. Para las microesferas monocapa sin ultrasonido, el fármaco se libera en un 58.7% en los primeros 10 minutos, aumentando gradualmente hasta llegar a 81.1% a las tres horas de liberación sin necesidad de un estímulo externo. Esta liberación gradual se atribuye a un intercambio de iones entre el gel polimérico y el medio de liberación (PBS), el cual es una solución que contiene iones de sodio, potasio y cloruro. Los iones de sodio y potasio se pueden intercambiar con los iones calcio presentes en el gel, rompiendo el entrecruzamiento del polímero temporalmente, y permitiendo la liberación del fármaco. Esta capacidad de intercambio de iones en los geles de alginato ha sido demostrada por

Chen y Wang en 2001, y aprovechada para la remoción de metales pesados [146]. En contraste, cuando las microesferas son sometidas a un estímulo de ultrasonido, es evidente que el perfil de liberación cambia a una de estilo pulsátil. En los primeros 10 minutos, la liberación cambia de 60.7% a 81.6%, y de 81.1% a 92.3% a las tres horas de liberación. En este caso, además del intercambio de iones, el ultrasonido desencadena la ruptura de los enlaces iónicos del gel, permitiendo que el fármaco se libere más rápidamente. Huebsch y cols. y Kwok y cols. mostraron que este tipo de ruptura es reversible, es decir, que una vez que el estímulo de ultrasonido cesa, los enlaces iónicos se vuelven a formar, regenerándose el gel y reteniendo el fármaco hasta la siguiente estimulo [13,147].

En cuanto a las microesferas bicapa, la presencia de una capa externa a las microesferas conformada con quitosano y reforzada con citrato de sodio disminuye la liberación del fármaco. Sin estímulos de US, en los primeros 10 minutos, la liberación del fármaco es de 21.3% para esferas tratadas con CTT al 1% p/v, y de 15.7% para esferas tratadas con CTT al 3% p/v. A las tres horas de liberación, las ME tratadas con CTT al 1% p/v alcanzaron una liberación del 68.2% y las ME tratadas con CTT al 3% p/v alcanzaron 62.0%, valores menores a los alcanzados en ME elaboradas de solo alginato. Se observó anteriormente que las microesferas entrecruzadas con una mayor concentración de CTT presentaron mayor diámetro, debido a una capa externa de quitosano más gruesa. Esto hace que se requiera un mayor tiempo para liberar la misma cantidad de fármaco, disminuyendo el porcentaje de liberación, indicando una mejora en la retención del fármaco y, por tanto, en el tiempo en que éste puede ser almacenado. En cuanto a los estímulos de US, el efecto es similar a las esferas sin capa externa: a los 10 minutos, la liberación aumentó de 21.7% a 44.4% para las esferas con CTT al 1% p/v, y de 14.0% a 32.8% para las esferas con CTT al 3% p/v. A las tres horas de liberación, el porcentaje de fármaco alcanzado por las ME con CTT al 1% p/v fue de 68.2 % y por las ME con CTT al 3% el porcentaje fue de 62.0%. En general, en las tres horas de liberación, el uso del US durante ciertos intervalos de tiempo indujo una liberación pulsátil del fármaco generando un perfil de liberación escalonada. Esto se explica por la naturaleza iónica del entrecruzamiento de los geles poliméricos (los enlaces de tipo iónico son más débiles que los enlaces de tipo covalente y pueden ser rotos por el efecto del ultrasonido, permitiendo que el fármaco se libere rápidamente).

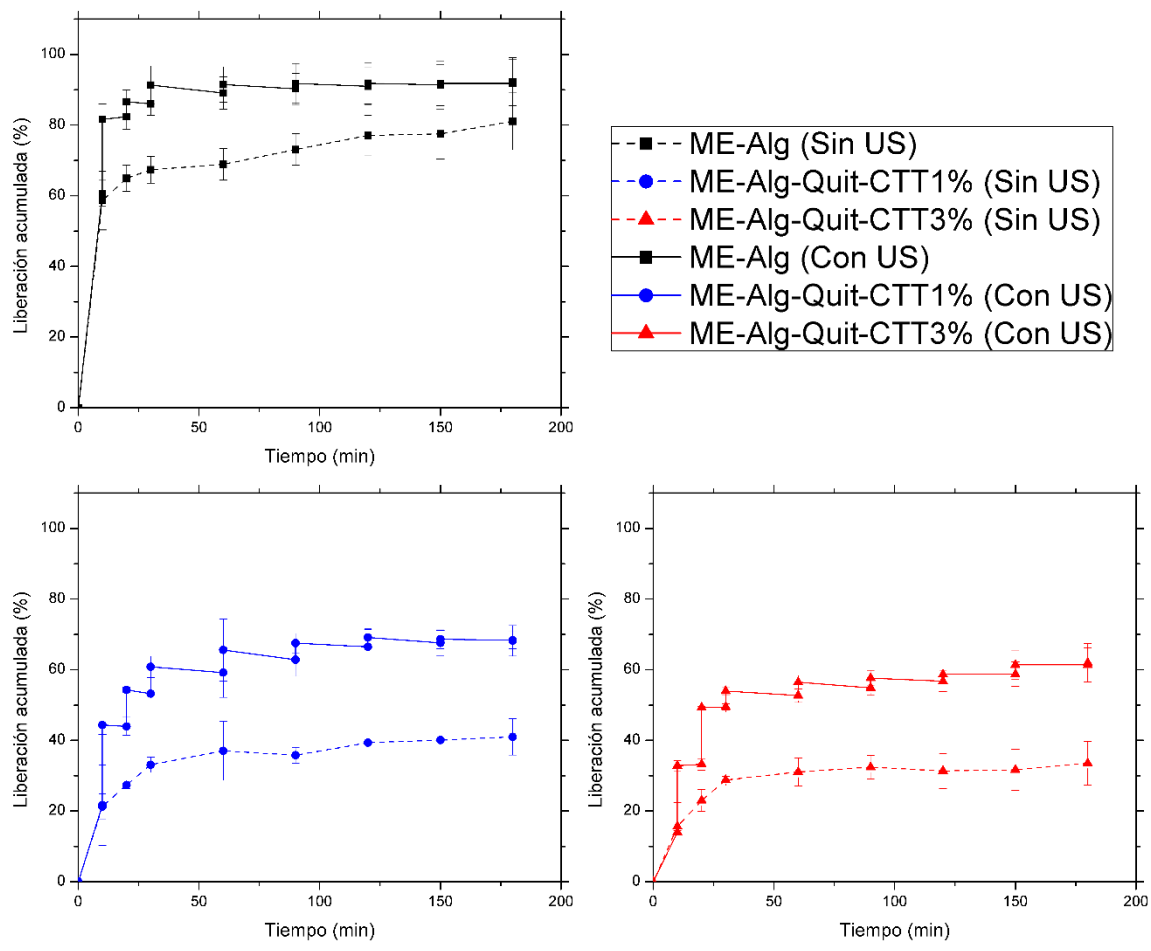


Figura 3.13. Perfiles de liberación de 5FU individuales a partir de ME, con y sin US.

## CONCLUSIONES

En conclusión, en este trabajo se logró la extracción exitosa de alginato a partir de algas pardas provenientes del caribe mexicano, con un rendimiento que colocan al sargazo mexicano como un producto potencial para la producción de alginato. La caracterización del alginato mostró una masa molar de  $3.81 \times 10^5$  g/mol y una composición química de 54.4% de unidades gulurónicas y 45.6% unidades manurónicas en la cadena molecular, distribuidas mayormente en estructura de bloques, haciendo al polímero un material capaz de generar geles con potencial aplicación en encapsulación celular, áreas biomédicas y ambientales.

Con el alginato extraído se logró la elaboración de microesferas cargadas con 5FU con una Eficiencia de Encapsulación de 25.4% y una Capacidad de Carga de Fármaco de 44.3%. El estudio de la morfología mostró que la presencia del fármaco en la solución de alginato disminuye el diámetro promedio de las microesferas, y la adición de citrato de sodio influye en el espesor de la capa externa de quitosano, aumentando con una mayor concentración del entrecruzante. Las pruebas de liberación mostraron una reducción en la liberación del fármaco con la presencia de una segunda capa de quitosano, y un aumento de la liberación del 5FU con la presencia de un estímulo de ultrasonido, demostrando que es posible elaborar sistemas de liberación controlada por estímulos externos, con la elección adecuada del binomio polímeros-fármaco, para su aplicación en tratamientos contra el cáncer.

## **RECOMENDACIONES**

Con base en los resultados obtenidos, y con el fin de una mejora continua del proyecto, se recomienda lo siguiente:

- Optimizar el procedimiento para la extracción de alginato, para el ahorro de recursos (agua, alcohol) y reactivos.
- Optimizar la técnica de elaboración de microesferas, para aumentar el rendimiento de producción.
- Ahondar en los estudios de liberación con estímulos de ultrasonido, variando el tiempo y la potencia del ultrasonido.



## REFERENCIAS

- [1] D. Nikjoo, A.Z. Arogoz. Dual responsive polymeric bionanocomposite gel beads for controlled drug release systems, *J. Appl. Polym. Sci.* *134*, 1–12, 2017.
- [2] J. Wu, Z. Zhang, J. Gu, W. Zhou, X. Liang, G. Zhou, C.C. Han, S. Xu, Y. Liu. Mechanism of a long-term controlled drug release system based on simple blended electrospun fibers, *J. Control. Release.* *320*, 337–346, 2020.
- [3] S. Maghsoudi, B.T. Shahraki, N. Rabiee, Y. Fatahi, R. Dinarvand, M. Tavakolizadeh, S. Ahmadi, M. Rabiee, M. Bagherzadeh, A. Pourjavadi, H. Farhadnejad, M. Tahriri, T.J. Webster, L. Tayebi. Burgeoning polymer nano blends for improved controlled drug release: A review, *Int. J. Nanomedicine.* *15*, 4363–4392, 2020.
- [4] J.A. Claudio-Rizo, L.F. Cano Salazar, T.E. Flores-Guia, D.A. Cabrera-Munguia. Estructuras metal-orgánicas (MOFs) nanoestructuradas para la liberación controlada de fármacos, *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencias y Nanotecnología.* *14*, 1e–29e, 2020.
- [5] M. Kanamala, W.R. Wilson, M. Yang, B.D. Palmer, Z. Wu. Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review, *Biomaterials.* *85*, 152–167, 2016.
- [6] M. Sheikhpour, L. Barani, A. Kasaeian. Biomimetics in drug delivery systems: A critical review, *J. Control. Release.* *253*, 97–109, 2017.
- [7] K.G.H. Desai, H.J. Park. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying, *J. Microencapsul.* *22*, 179–192, 2005.
- [8] V. Saez, J. Ramón Hernández, C. Peniche. Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas, *Biotechnol. Apl.* *24*, 98–107, 2007.
- [9] G.C. Avendaño-Romero, A. López-Malo, E. Palou. Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos, *Temas Sel. Ing. Aliment.* *7*, 87–96, 2013.
- [10] J. Berger, M. Reist, J.M. Mayer, O. Felt, N.A. Peppas, R. Gurny. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *Eu. J. Pharm Biopharm.* *57*, 19–34, 2004.
- [11] P. Bawa, V. Pillay, Y.E. Choonara, L.C. du Toit. Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery, *Biomedical Materials.* *4*, 1–15, 2009.
- [12] A. Kikuchi, T. Okano. Pulsatile drug release control using hydrogels, *Adv. Drug Deliv. Rev.* *54*, 53–77, 2002.
- [13] N. Huebsch, C.J. Kearney, X. Zhao, J. Kim, C.A. Cezar, Z. Suo, D.J. Mooney. Ultrasound-triggered disruption and self-healing of reversibly cross-linked hydrogels for drug delivery and enhanced chemotherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 9762–9767, 2014.

- [14] T. Emi, K. Michaud, E. Orton, G. Santilli, C. Linh, M. O'Connell, F. Issa, S. Kennedy. Ultrasonic Generation of Pulsatile and Sequential Therapeutic Delivery Profiles from Calcium-Crosslinked Alginate Hydrogels, *Molecules*. 24, 1048-1065, 2019.
- [15] Z. Rahman, K. Kohli, R.K. Khar, M. Ali, N.A. Charoo, A.A.A. Shamsheer. Characterization of 5-fluorouracil Microspheres for Colonic Delivery, *AAPS PharmSciTech*. 7, 1–9, 2006.
- [16] J.J. Lee, J.H. Beumer, E. Chu. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 78, 447–464, 2016.
- [17] K.K. Jain, *Drug Delivery System*, Humana Press, New York, 2014, 21–25.
- [18] Y. Perrie, T. Rade, *FASTtrack Pharmaceuticals: Drug Delivery and Targeting*, Pharmaceutical Press, 2012, 1–24.
- [19] V. Sáez<sup>1</sup>, E. Hernáez<sup>1</sup>, L.S. Angulo<sup>2</sup>. Sistemas De Liberación Controlada De Medicamentos, *Rev. Iberoam. Polímeros*. 3, 1–20, 2002.
- [20] S. Ahmed, K. Alhareth, N. Mignet. Advancement in Nanogel formulations provides controlled drug release, *Int. J. Pharm.* 584, 119435, 2020.
- [21] X.Z. Shu, K.J. Zhu, W. Song. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release, *Int. J. Pharm.* 212, 19–28, 2001.
- [22] S.-H. Hu, T.-Y. Liu, D.-M. Liu, S.-Y. Chen. Controlled Pulsatile Drug Release from a Ferrogel by a High-Frequency Magnetic Field, *Macromolecules*. 40, 6786–6788, 2007
- [23] M.L. Cacicedo, Encapsulación y liberación controlada de Enrofloxacin utilizando matrices biopoliméricas, Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de la Plata, Argentina, 2011.
- [24] S. Singh, M. Koland. Formulation and Evaluation of Pulsatile Drug Delivery Systems of Glipizide for the Management of Type-II Diabetes Mellitus, *J. Drug Deliv. Ther.* 6, 11–18, 2016.
- [25] R.V. Kalaydina, K. Bajwa, B. Qorri, A. Decarlo, M.R. Szewczuk. Recent advances in “smart” delivery systems for extended drug release in cancer therapy, *Int. J. Nanomedicine*. 13, 4727–4745, 2018.
- [26] M.J. Martín Villena, M.E. Morales Hernández, V. Gallardo Lara, M.A. Ruiz Martínez. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos, *Ars Pharm.* 50, 43–50, 2009.
- [27] C. de J. Hernández-Torres, A. Ilina, J.M. Ventura-Sobrevilla, R.E. Belmares-Cerda, J.C. Contreras-Esquivel, G. Michelena Álvarez, J.L. Martínez-Hernández. La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria, *ICIDCA. Sobre Los Deriv. La Caña Azúcar*. 50, 12–19, 2016.
- [28] R. Parra. Microencapsulación de Alimentos, *Rev. Fac. Nac. Agro.* 63, 5669–5684, 2010.

- [29] V.R. Sinha, A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal, S. Dhawan. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.* 274, 1–33, 2004.
- [30] R. Hernández Nava, M.T.J. Munguía. Coacervación compleja: una alternativa como método de microencapsulación, *Temas Sel. Ing. Alimen.* 11, 22–28, 2018.
- [31] E. Murano. Use of natural polysaccharides in the microencapsulation techniques, *J. Appl. Ichthyol.* 14, 245–249, 1998.
- [32] D.J. McHugh. A guide to the seaweed industry, *FAO. Fish. Tech. Pap.* 441, 39-49, 2003.
- [33] K.I. Draget. Alginates, en *Handbook of Hydrocolloids*, P. O. Phillips, P. A. Williams, Eds.; Woodhead Publishing, 2020, 805–829.
- [34] A.M. Stephen, G.O. Phillips, P.A. Williams. *Food Polysaccharides and Their Applications*, CRC Press, 2006, 289-334.
- [35] J.L. Ayarza León. Los alginatos: 20000 usos de las algas submarinas, *Rev. Quim. PUCP.*, 28, 19–23, 2014.
- [36] A. Hurtado, R. Selgas, Á. Serrano Aroca. El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales, *Nereis. Interdiscip. Ibero-American J. Methods, Mode. Simulation.* 12, 137–149, 2020.
- [37] R.G. Puscaselu, A. Lobiuc, M. Dimian, M. Covasa. Alginate: From food industry to biomedical applications and management of metabolic disorders, *Polymers.* 12, 1–30, 2020.
- [38] D.J. McHugh. Production, Properties and Utilization of Products from Commercial Seaweeds, *FAO. Fish. Tech. Pap.* 288, 58–115, 1987.
- [39] C. León. El sargazo a escena, *Salud Pública Mex.* 61, 701–703, 2019.
- [40] J. Ayarza, Y. Coello, J. Nakamatsu. SEM–EDS study of ionically cross-linked alginate and alginic acid bead formation, *Int. J. Polym. Anal. Character.* 22, 1–10, 2017.
- [41] M. Fertah, A. Belfkira, E. montassir Dahmane, M. Taourirte, F. Brouillette. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed, *Arab. J. Chem.* 10, S3707–S3714, 2017.
- [42] D.J. McHugh, G. Hernández-Carmona, D.L. Arvizu-Higuera, Y.E. Rodríguez-Montesinos. Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera* 3. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid, *J. Appl. Phycol.* 13, 471–479, 2001.
- [43] H.P.S. Abdul Khalil, Y.Y. Tye, C.K. Saurabh, C.P. Leh, T.K. Lai, E.W.N. Chong, M.R. Nurul Fazita, J.M. Hafiidz, A. Banerjee, M.I. Syakir. Biodegradable polymer films from seaweed polysaccharides: A review on cellulose as a reinforcement material, *Express Polym. Lett.* 11, 244–265, 2017.

- [44] B. Lupo Pasin, C. González Azón, A. Maestro Garriga. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones., *Rev. Venez. Cienc. y Tecnol. Aliment.* 3, 130–151, 2012.
- [45] A.C. Rodríguez-Llimos, D. Chiappetta, M.E. Széliga, A. Fernández, C. Bregni. Micropartículas de alginato conteniendo paracetamol, *Ars Pharm.* 44, 333–342, 2003.
- [46] A. Kikuchi, M. Kawabuchi, M. Sugihara, Y. Sakurai, T. Okano. Pulsed dextran release from calcium-alginate gel beads, *J. Control. Release.* 47, 21–29, 1997.
- [47] L.E. Ramírez Márquez, E. Hernández Baltazar, Fabricación de micropartículas de alginato para la liberación de naproxen, en 4° Encuentro de Jóvenes Investigadores CONACYT. (memorias), Acapulco, Guerrero, 2016, 1-11.
- [48] M. de A. Etchepare, J.S. Barin, A.J. Cichoski, E. Jacob.Lopes, R. Wagner, L.L. Martin Fries, C.R. de Menezes. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate, *Cienc. Rural St. María.* 45, 1319–1326, 2015.
- [49] A.T. Rodríguez-Pedroso, M.A. Ramírez-Arrebato, D. Rivero-González, E. Bosquez-Molina, L.L. Barrera-Necha, S. Bautista-Baños. Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos, *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 15, 307–317, 2009.
- [50] C.L. Velásquez. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos, *Rev. Iberoam. Polímeros.* 4, 91–109, 2003.
- [51] M. Yadav, P. Goswami, K. Paritosh, M. Kumar, N. Pareek, V. Vivekanand. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials, *Bioresour. Bioprocess.* 6, 1–20, 2019.
- [52] F.M. Goycoolea, C. Remuñán-López, M.J. Alonso, Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano, en Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Madrid, 2009, 103–131.
- [53] Z. Mármol, G. Páez, M. Rincón, K. Araujo, C. Aiello. Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones, *Rev. Tecnocientífica URU.* 1, 53–58, 2011.
- [54] F.S. Tenório, T.L. do Amaral Montanheiro, A.M.I. dos Santos, M. dos Santos Silva, A.P. Lemes, D.B. Tada. Chitosan hydrogel covalently crosslinked by gold nanoparticle: Eliminating the use of toxic crosslinkers, *J. Appl. Polym. Sci.* 138, 1–13, 2021.
- [55] R.D. Bhumkar, V.B. Pokharkar. Studies on effect of pH on cross-linking of Chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note, *AAPS PharmSciTech.* 7, 2–7, 2006.
- [56] G. Conzatti, D. Faucon, M. Castel, F. Ayadi, A. Tourrette, S. Cavalie. Alginate/chitosan polyelectrolyte complexes: A comparative study of the influence of the drying step on physicochemical properties., *Carbohydr. Polym.* 172, 142–151, 2019.
- [57] T.P. Ivanovska, L. Petruševska Tozi, M.D. Kostoska, N. Geškovski, A. Grozdanov, C. Stain, T. Stafilov, K. Mladenovska. Microencapsulation of Lactobacillus casei in Chitosan-Ca-

- Alginate microparticles using spray-drying method, *Maced. J. Chem. Chem. Eng.* 31, 115–123, 2012.
- [58] M. Simonoska Crcarevska, M. Glavas Dodov, K. Goracinova. Chitosan coated Ca-alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 565–578, 2008.
- [59] X. Li, X. Kong, S. Shi, X. Zheng, G. Guo, Y. Wei, Z. Qian. Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery, *BMC Biotechnol.* 8, 1–11, 2008.
- [60] F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu. Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent, *Carbohydr. Polym.* 48, 61–72, 2002.
- [61] Y. Zhang, W. Wei, P. Lv, L. Wang, G. Ma. Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77, 11–19, 2011.
- [62] B. Sarmiento, A. Ribeiro, F. Veiga, P. Sampaio, R. Neufeld, D. Ferreira. Alginate/chitosan nanoparticles are effective for oral insulin delivery, *Pharm. Res.* 24, 2198–2206, 2007.
- [63] P. Li, Y.N. Dai, J.P. Zhang, A.Q. Wang, Q. Wei. Chitosan-Alginate Nanoparticles as a Novel Drug Delivery System for Nifedipine, *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 221–228, 2008.
- [64] R.C. Nagarwal, R. Kumar, J.K. Pandit. Chitosan coated sodium alginate-chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye, *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 678–685, 2012.
- [65] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston. 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer.* 3, 330–338, 2003.
- [66] K.L. Maughan, M.A. Lutterbie, P.S. Ham. Treatment of breast cancer, *Am. Fam. Physician.* 81, 1339–1346, 2010.
- [67] J. Beumer, E. Chu, C. Allegra, Y. Tanigawara, G. Milano, R. Diasio, T.W. Kim, R.H. Mathijssen, L. Zhang, D. Arnold, K. Muneoka, N. Boku, M. Joerger. Recommendations for 5-Fluorouracil Therapy, *Clin. Pharmacol. Ther.* 105, 598–613, 2020.
- [68] J.A. Matus-Santos, J.L. Aguilar-Ponce, F.U. Lara-Medina, Á. Herrera-Gómez, A. Meneces-García, M. López-Gamboa. Revisión del monitoreo farmacocinético del 5-fluorouracilo como herramienta para incrementar eficacia y seguridad, *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 54, 354–362, 2016.
- [69] P. Álvarez, J.A. Marchal, H. Boulaiz, E. Carrillo, C. Vélez, F. Rodríguez-Serrano, C. Melguizo, J. Prados, R. Madeddu, A. Aranega. 5-Fluorouracil derivatives: a patent review, *Expert Opin. Ther. Pat.* 22, 107–123, 2012.
- [70] A.C. de Mattos, C. Altmeyer, T.T. Tominaga, N.M. Khalil, R.M. Mainardes. Polymeric nanoparticles for oral delivery of 5-fluorouracil: Formulation optimization, cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study, *Eur. J. Pharm. Sci.* 84, 83–91, 2016.

- [71] E. Moghimipour, F.A. Dorkoosh, M. Rezaei, Z. Ramezani, M. Amini, M. Kouchak, K.A. Angali, S. Handali. Folic Acid-Modified Liposomal Drug Delivery Strategy for Tumor Targeting of 5-Fluorouracil, *Eur. J. Pharm. Sci.* 114,166–174, 2018.
- [72] F.H. Lin, Y.H. Lee, C.H. Jian, J.M. Wong, M.J. Shieh, C.Y. Wang. A study of purified montmorillonite intercalated with 5-fluorouracil as drug carrier, *Biomaterials.* 23, 1981–1987., 2002.
- [73] NIBIB. Ultrasonido, *National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering.* 2016. Disponible en <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/ultrasound>. (Accedido 11 diciembre, 2019).
- [74] D.L. Miller, N.B. Smith, M.R. Bailey, G.J. Czarnota, K. Hynynen, I.R.S. Makin. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations, *J. Ultrasound Med.* 31, 623–634, 2012.
- [75] M. Almirón. Breve reseña sobre el ultrasonido terapéutico, *Med. Clínica y Soc.* 3, 62–67, 2019.
- [76] S. Mitragotri. Healing sound: The use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 255–260, 2005.
- [77] Tharkar, R. Varanasi, W.S.F. Wong, C.T. Jin, W. Chrzanowski. Nano-Enhanced Drug Delivery and Therapeutic Ultrasound for Cancer Treatment and Beyond, *Front. Bioeng. Biotech.* 7, 2019.
- [78] Y.H. Hsiao, S.J. Kuo, H. der Tsai, M.C. Chou, G.P. Yeh. Clinical application of high-intensity focused ultrasound in cancer therapy, *J. Cancer.* 7, 225–231, 2016.
- [79] A.K.W. Wood, C.M. Sehgal. A review of low-intensity ultrasound for cancer therapy, *Ultrasound Med. Biol.* 41, 905–928, 2015.
- [80] X. Li, Z. Wang, H. Xia. Ultrasound Reversible Response Nanocarrier Based on Sodium Alginate Modified Mesoporous Silica Nanoparticles, *Front. Chem.* 7, 1–11, 2019.
- [81] C. Rubin, M. Bolander, J.P. Ryaby, M. Hadjiargyrou. The use of low-intensity ultrasound to accelerate the healing of fractures, *J. Bone Jt. Surg.* 83, 259–270, 2001.
- [82] I.C. Cojocar, L. Ochiuz, A. Spac, G. Popa, L. Palade, I. Popovici. The validation of the UV spectrophotometric method for the assay of 5 fluorouracil, *Farmacia.* 60, 379–385, 2012.
- [83] D. S. Wang, J. G. Li, H. P. Li, F. Q. Tang. Preparation and drug releasing property of magnetic chitosan-5-fluorouracil nano-particles, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* 19, 1232–1236, 2009.
- [84] Argos Pharma. Sink conditions: ¿cómo evitar el anglicismo “condiciones sink”? 2017. Disponible en: <http://www.argos-tsp.com/es/investigacion-terminologica/argos-pharma/investigacion-terminologica/sink-conditions-como-evitar-el-anglicismo-condiciones-sink.html>. (Accedido 5 octubre 2021).

- [85] D.R. Osborne, P.I. Voogt, *The Analysis of Nutrients in Foods*, Academic Press Inc., Oval Road, Londres, 1978.
- [86] Ministry of Agriculture, Food and Fisheries (MAFF), The feeding stuffs (Sampling and Analysis) Regulations, en Bulletin No. 114, Agriculture, Londres, 1982.
- [87] Association of Official Analytical Chemists (AOAC), en *Official Methods of Analysis*, Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 1984, 1094.
- [88] K.W. Chow, G.L. Rumsey, P.W. Woldroup, Linear programming in fish diet formulation, en *Fish Feed Technology, Lectures Presented at the FAO/UNDP Training Course*, Washington, 1980, 395.
- [89] L. Alzate-Gaviria, J. Domínguez-Maldonado, R. Chablé-Villacís, E. Olguin-Maciel, R.M. Leal-Bautista, G. Canché-Escamilla, A. Caballero-Vázquez, C. Hernández-Zepeda, F.A. Barredo-Pool, R. Tapia-Tussell. Presence of polyphenols complex aromatic “Lignin” in *Sargassum* Spp. From Mexican Caribbean, *J. Mar. Sci. Eng.* 9, 1–10, 2021.
- [90] ASTM, F. Standard test method for determining the chemical composition and sequence in alginate by proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectroscopy, *West Conshohocken, PA: ASTM International*, 2012.
- [91] R.E. Rodríguez-Martínez, B. Van Tussenbroek, E. Jordán-Dahlgren. *Afluencia masiva de sargazo pelágico a la costa del Caribe Mexicano (2014-2015)*, en *Florecimientos Algales Nocivos En México*. CICESE, Ensenada, Baja California, México, 2016, 352–365.
- [92] J. Gower, S. King. The distribution of pelagic *Sargassum* observed with OLCI, *Int. J. Remote Sens.* 41, 5669–5679, 2020.
- [93] Gulf Coast Research Laboratory. *Sargassum Identification Guide*, *The University of Southern Mississippi. Gulf Coast Research Laboratory*, 2020. Disponible en <https://gcr.l.usm.edu/sargassum/sargassum.identification.guide.php> (Accedido mayo 28, 2020).
- [94] M.D. Guiry, G.M. Guiry. *Sargassum natans* (Linnaeus) Gaillon 1828, *AlgaBase*. 2020. Disponible en [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=826](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=826) (Accedido mayo 28, 2020).
- [95] M.D. Guiry, G.M. Guiry. *Sargassum fluitans* (Børgesen) Børgesen 1914, *AlgaBase*. 2020. Disponible en [http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=825](http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=825) (Accedido mayo 28, 2020).
- [96] Naturalista. *Sargazo Nadador I Sargassum natans*, *CONABIO*. 2020. Disponible en <https://www.naturalista.mx/taxa/134104-Sargassum-natans> (Accedido mayo 28, 2020).
- [97] Naturalista. *Sargazo Flotante III Sargassum fluitans*, *CONABIO*. 2020. Disponible en <https://www.naturalista.mx/taxa/134103-Sargassum-fluitans> (Accedido mayo 28, 2020).

- [98] J.P. Tamayo, E.J. Del Rosario. Chemical Analysis and Utilization of Sargassum sp. as substrate for ethanol production, *Iran. J. Energy Environ.* 5, 202–208, 2014.
- [99] C.M.T. Pérez, I.G. Pajares, V.A. Alcántara, J.F. Simbahan. Bacterial laminarinase for application in ethanol production from brown algae Sargassum sp. using halotolerant yeast, *Biofuel Res. J.* 5, 792–797, 2018.
- [100] E.M. Balboa, C. Gallego-Fábrega, A. Moure, H. Domínguez. Study of the seasonal variation on proximate composition of oven-dried Sargassum muticum biomass collected in Vigo Ria, Spain, *J. Appl. Phycol.* 28, 1943–1953, 2016.
- [101] O.O. Oyesiku, A. Egunyomi. Identification and chemical studies of pelagic masses of Sargassum natans (Linnaeus) Gaillon and S. fluitans (Borgessen) Borgesen (brown algae), found offshore in Ondo State, Nigeria, *African J. Biotechnol.* 13, 1188–1193, 2014.
- [102] K. Wong, P.C. Cheung. Influence of drying treatment on three Sargassum species: 1. Proximate composition, amino acid profile and some physico-chemical properties, *J. Appl. Phycol.* 13, 43–50, 2001.
- [103] H.P.S. Makkar, G. Tran, V. Heuzé, S. Giger-Reverdin, M. Lessire, F. Lebas, P. Ankers. Seaweeds for livestock diets: A review, *Anim. Feed Sci. Technol.* 212, 1–17, 2016.
- [104] T. Iriyanti, A. Wahid Wahab, R. Bahar. Potential Na-Alginate extract from brown algae sargassum sp. of the mango maturation process, *Jurnal Akta Kimia Indonesia (Indo. Chim. Acta)*. 11, 17–27, 2019.
- [105] A. Mohammed, R. Bissoon, E. Bajnath, K. Mohammed, T. Lee, M. Bissram, N. John, N.K. Jalsa, K. Lee, K. Ward. Multistage extraction and purification of waste Sargassum natans to produce sodium alginate: An optimization approach, *Carbohydr. Polym.* 198, 109–118, 2018.
- [106] T.A. Davis, M. Ramirez, A. Mucci, B. Larsen. Extraction, isolation and cadmium binding of alginate from Sargassum spp., *J. Appl. Phycol.* 16, 275–284, 2004.
- [107] M.L. Torres, J.M. Fernandez, F.G. Dellatorre, A.M. Cortizo, T.G. Oberti. Purification of alginate improves its biocompatibility and eliminates cytotoxicity in matrix for bone tissue engineering, *Algal Res.* 40, 101499, 2019.
- [108] C.G. Gómez, M. v. Pérez Lambrecht, J.E. Lozano, M. Rinaudo, M.A. Villar. Influence of the extraction-purification conditions on final properties of alginates obtained from brown algae (*Macrocystis pyrifera*), *Int. J. Biol. Macromol.* 44, 365–371, 2009.
- [109] United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 38-NF 33), Elemental Impurities Updates, 2016. Disponible en <https://www.usp.org/chemical-medicines/elemental-impurities-updates> (Accedido junio 24, 2021).
- [110] Y. Xie, A. Wang, Q. Lu, M. Hui. The effects of rheological properties of wall materials on morphology and particle size distribution of microcapsule, *Czech J. Food Sci.* 28, 433–439, 2010.



- [111] U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewińska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi, V. Nedovic, D. Poncelet, S. Siebenhaar, L. Tobler, A. Tosi, A. Vikartovská, K.D. Vorlop. Comparison of different technologies for alginate beads production, *Chem. Pap.* 62, 364–374, 2008.
- [112] M.K. Das, P.C. Senapati. Evaluation of furosemide-loaded alginate microspheres prepared by ionotropic external gelation technique, *Acta Pol. Pharm.* 64, 253–262, 2007.
- [113] F. Baghbani, F. Moztaezadeh, J.A. Mohandesi, F. Yazdian, M. Mokhtari-Dizaji, S. Hamed. Formulation design, preparation and characterization of multifunctional alginate stabilized nanodroplets, *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 550–558, 2016.
- [114] R.M. Silverstein, F.X. Webster, D.J. Kiemle. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, Jhon Wiley & Sons, Nueva York, 2015, 72-108.
- [115] B.D. Mistry. *A Handbook of Spectroscopic Data*, Oxford Book Company, Jaipur, India, 2009, 26-63.
- [116] E. Pretsch, P. Bühlmann, M. Badertscher. *Structure Determination of Organic Compounds*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania, 2013, 49-242.
- [117] N. Rhein-Knudsen, M.T. Ale, F. Ajallouei, A.S. Meyer. Characterization of alginates from Ghanaian brown seaweeds: *Sargassum* spp. and *Padina* spp., *Food Hydrocoll.* 71, 236–244, 2017.
- [118] E. Gómez-Ordóñez, P. Rupérez. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds, *Food Hydrocoll.* 25, 1514–1520, 2011.
- [119] S.K. Tam, J. Dusseault, S. Polizu, M. Ménard, J.P. Hallé, L. Yahia. Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation, *Biomaterials.* 27, 1296–1305, 2006.
- [120] H. Kartikaningsih, E.D. Mufti, A.E. Nurhanief, Fucoxanthin from brown seaweed *Sargassum cristaeifolium* tea in acid pH, en AIP Conference Proceedings 1844, Java Oriental, Indonesia, 2017, 0300091-0300099.
- [121] W.H. Yip, S.J. Lim, W.A.W. Mustapha, M.Y. Maskat, M. Said. Characterisation and stability of pigments extracted from *Sargassum binderi* obtained from Semporna, Sabah, *Sains Malays.* 43, 1345–1354, 2014.
- [122] E. Saepudin, E. Sinurat, I.A. Suryabrata. Depigmentation and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder, en IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 299, Java Oriental, Indonesia, 2018, 012027.
- [123] M. Fertah, *Isolation and Characterization of Alginate from Seaweed*, en *Seaweed Polysaccharides: Isolation, Biological and Biomedical Applications*, J. Venkatesan, S. Anil, S. Kim, Eds.; Elsevier Inc., 2017, 11–26.

- [124] G. Sivagnanavelmurugan, M., Radhakrishnan, S., Palavesam, A., Arul, V., Immanuel. Characterization of alginic acid extracted from *Sargassum wightii* and determination of its anti-viral activity of shrimp *Penaeus monodon* post larvae against white spot syndrome virus, *Int. J. Curr. Res. Life Sci.* 07, 1863–1872, 2018.
- [125] D. Leal, B. Matsuhira, M. Rossi, F. Caruso. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds, *Carbohydr. Res.* 343, 308–316, 2008.
- [126] W. Mackie. Semi-quantitative estimation of the composition of alginates by infra-red spectroscopy., *Carbohydr. Polym.* 20, 413–415, 1971.
- [127] M.P. Filippov, R. Kohn. Determination of composition of alginates by infrared spectroscopic method, *Chem. Zvesti.* 28, 817–819, 1974.
- [128] K. Sakugawa, A. Ikeda, A. Takemura, H. Ono. Simplified method for estimation of composition of alginates by FTIR, *J. Appl. Polym. Sci.* 93, 1372–1377, 2004.
- [129] J.I. Murillo-Álvarez, G. Hernández-Carmona. Monomer composition and sequence of sodium alginate extracted at pilot plant scale from three commercially important seaweeds from Mexico, *J. Appl. Phycol.* 19, 545–548, 2007.
- [130] H. Grasdalen. Study of the Composition and Sequence of Uronate residues in Alginate, *Carbohydr. Res.* 68, 23–31, 1979.
- [131] M.R. Torres, A.P.A. Sousa, A.T. Silva Filho, D.F. Melo, J.P.A. Feitosa, C.M. de Paula, M.G.S. Lima. Extraction and physicochemical characterization of *Sargassum vulgare* alginate from Brazil, *Carbohydr. Res.* 342, 2067–2074, 2007.
- [132] A. Mazumder, S.L. Holdt, D. De Francisci, M. Alvarado-Morales, H.N. Mishra, I. Angelidaki. Extraction of Alginate from *Sargassum muticum*: Process Optimization and Study of its Functional Activities, *J. Appl. Phycol.* 28, 3625–3634, 2016.
- [133] T. Tripathy, R.P. Singh. Characterization of polyacrylamide-grafted sodium alginate: A novel polymeric flocculant, *J. Appl. Polym. Sci.* 81, 3296–3308, 2001.
- [134] N. Işiklan, F. Kurşun, M. Inal. Graft copolymerization of itaconic acid onto sodium alginate using benzoyl peroxide, *Carbohydr. Polym.* 79, 665–672, 2010.
- [135] K.N. Ramsackal, K. Ward, J. V. Smith, Determination of intrinsic viscosities and Mark-Houwink-Sakurada constants for sodium alginates, en Caribbean Science and Innovation Meeting 2019, Le Gosier, Francia, 2019, hal-02899128.
- [136] S. Sugiono, M. Masruri, T. Estiasih, S.B. Widjanarko. Optimization of extrusion-assisted extraction parameters and characterization of alginate from brown algae (*Sargassum cristaeifolium*), *J. Food Sci. Technol.* 56, 3687–3696, 2019.
- [137] S.Y. Chee, P. K. Wong, C. L. Wong. Extraction and characterisation of alginate from brown seaweeds (Fucales, Phaeophyceae) collected from Port Dickson, Peninsular Malaysia, *J. Appl. Phycol.* 23, 191–196, 2011.

- [138] D.A. Mohamed, A.A. Hassan, M.T. Ibrahim, M.M. Helmy. Extraction and Characterization of Sodium Alginates Extracted from *Sargassum muticum* and *Turbinaria conoides*, *Int. J. Innov. Sci. Eng, Technol.* 8, 64–75, 2021.
- [139] F.A. Johnson, D.Q.M. Craig, A.D. Mercer. Characterization of the block structure and molecular weight of sodium alginates, *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 639–643, 1997.
- [140] E.H. Endo, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, B.P.D. Filho. Activity of spray-dried microparticles containing pomegranate peel extract against *Candida albicans*, *Molecules.* 17, 10094–10107, 2012.
- [141] Y.L. Patel, P. Sher, A.P. Pawar. The effect of drug concentration and curing time on processing and properties of calcium alginate beads containing metronidazole by response surface methodology, *AAPS PharmSciTech*, 7, E24–E30, 2006.
- [142] P. Smrdel, M. Bogataj, F. Podlogar, O. Planinšek, N. Zajc, M. Mazaj, V. Kaučič, A. Mrhar. Characterization of calcium alginate beads containing structurally similar drugs, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 32, 623–633, 2006.
- [143] H. Daemi, M. Barikani. Synthesis and characterization of calcium alginate nanoparticles, sodium homopolymannuronate salt and its calcium nanoparticles, *Sci. Iran.* 19, 2023–2028, 2012.
- [144] L. Deladino, P.S. Anbinder, A.S. Navarro, M.N. Martino. Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*, *Carbohydr. Polym.* 71, 126–134, 2008.
- [145] H. Patel, A. Nagle, R. Murthy. Characterization of calcium alginate beads of 5-fluorouracil for colon delivery, *Asian J. Pharm.* 2, 241, 2008.
- [146] P.J. Chen, L. Wang. Characterization of a Ca-alginate based ion-exchange resin and its application in lead, copper, and zinc removal, *Sep. Sci. Technol.* 36, 3617–3637, 2001.
- [147] K.K. Kwok, M.J. Groves, D.J. Burgess. Production of 5-15 mm Diameter Alginate-Polylysine Microcapsules by an Air-Atomization Technique, *Pharm. Res.* 8, 341–344, 1991.