



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**DESARROLLO DE SCAFFOLDS DE
POLIHIDROXIALCANOATO MEDIANTE LIOFILIZACIÓN,
BIOFUNCIONALIZADOS QUÍMICAMENTE PARA SU
POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE TEJIDOS**

Autor(es)

Liliana María Arroyave Muñoz

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Departamento de Ingeniería de Materiales

Medellín, Colombia

2020



Desarrollo de scaffolds de Polihidroxialcanoato mediante liofilización, biofuncionalizados químicamente para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos

Liliana María Arroyave Muñoz

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ingeniería de Materiales

Asesores (a):

Claudia Patricia Ossa Orozco, Ingeniera Mecánica

Línea de Investigación:

Biopolímeros

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biomateriales (BIOMAT)

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería, Departamento de Ingeniería de Materiales

Medellín, Colombia

2020.

**Desarrollo de scaffolds de
Polihidroxicanoato mediante liofilización,
biofuncionalizados químicamente para su
potencial aplicación en ingeniería de tejidos**

Liliana Maria Arroyave Muñoz

Trabajo de grado para optar por el título de

Magister en Ingeniería de Materiales

Asesora

Claudia Patricia Ossa Orozco

Docente Investigador del Programa de Bioingeniería

Grupo de Investigación en Biomateriales

PhD en Ingeniería Metalúrgica y de Materiales

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Medellín

2020

DEDICATORIA

A Dios por haberme ayudado a llegar hasta aquí, por la salud, la paciencia y la perseverancia que me permitieron finalizar este proyecto de vida.

A mi esposo por su increíble paciencia, por fines de semana enteros y noches de sacrificio, y por su constante compañía.

A mi familia, mis padres que siempre me apoyaron y me animaron sin importar cuanto tardara en cumplir mis sueños, a mi hermana que siempre estuvo presta para ayudarme a resolver algunas dudas que aparecían en el camino.

A mi tutora por su gran apoyo y motivación, más que una tutora siempre ha sido una amiga incondicional en todo este proceso.

A los profesores, estudiantes y monitores del grupo de Investigación Biomat que siempre estuvieron disponibles para escuchar y aconsejar, no solo en la parte académica sino también en la emocional.

A profesores y grupos de investigación de las facultades de Ingeniería, Ciencias Exactas y Medicina por los ensayos, explicaciones, consejos y orientación en la realización de este trabajo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a todos ellos, mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción.....	13
2. Planteamiento del problema.....	15
3. Objetivos.....	16
4. Marco teórico.....	17
4.1. Biomaterial.....	17
4.2. Introducción a la ingeniería de tejidos.....	19
4.2.1. Polímeros en la ingeniería de tejidos.....	20
4.2.1.1. Polímeros naturales.....	21
4.2.1.1.1. Polihidroxialcanoatos.....	23
4.3. Scaffolds.....	27
4.3.1. Técnicas de fabricación de scaffolds.....	28
4.4. Biofuncionalización de polímeros.....	31
4.4.1. Tipos de funcionalización de pha.....	32
4.5. Estado del arte de scaffolds de pha biofuncionalizados.....	36
4.6. Scaffolds de PHA y otros polímeros.....	40
4.7. Sustitutos de cartílago articular.....	41
4.7.5. Tipos de reemplazos.....	43
5. Metodología.....	46
5.1. Paso 1: caracterización de PHA.....	46
5.2. Paso 2: fabricación de scaffolds.....	47
5.3. Paso 3: caracterización de los scaffolds sin biofuncionalizar.....	49
5.4. Paso 4: biofuncionalización de los scaffolds.....	53
5.5. Paso 5: ensayos biológicos.....	53
5.6. Paso 6: validación estadística.....	55
6. Resultados y análisis.....	56
6.1. Caracterización de PHA.....	56
6.1.1. Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	56
6.1.2. Espectroscopia de energía dispersiva (EDS).....	57
6.1.3. Difracción de rayos x (DRX).....	57

6.1.4.	Infrarrojo con transformada de fourier (FTIR).....	58
6.1.5.	Peso molecular (PM)	61
6.1.6.	Análisis termogravimétrico (TGA).....	63
6.1.7.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	64
6.2.	Caracterización de los scaffolds sin biofuncionalizar	65
6.2.1.	Pruebas morfológicas	66
6.5.	Pruebas biológicas	95
6.6.	Cromatografía de gases	96
6.7.	Propuesta para la eliminación de diclorometano.....	97
6.8.	Prueba de citotoxicidad cualitativa	97
7.	Conclusiones	100
8.	Agradecimientos	102
9.	Referencias bibliográficas	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de algunos polímeros utilizados en la ingeniería de tejidos y su aplicación.	21
Tabla 2. Propiedades mecánicas de varios tipos de PHA comparadas con las propiedades mecánicas de otros polímeros. Modificado de [66].	27
Tabla 3. Algunas investigaciones publicadas al inicio de la década de los 90's donde se evidencia la relación entre las propiedades del PHA y el sustrato y bacteria utilizadas en la producción del mismo.	37
Tabla 4. Tipos de cartílago humano y sus principales características [126].	42
Tabla 5. Porcentajes de los reactivos utilizados en la fabricación de los scaffolds.	49
Tabla 6. Rango de bandas presentes teóricamente en los polímeros estudiados y en la muestra.	59
Tabla 7. Bandas presentes en el espectro FTIR del polímero.	60
Tabla 8. Resultados de medición de tiempo y determinación de viscosidades para una muestra de PHA.	61
Tabla 9. Resultados de viscosidad específica y viscosidad reducida.	61
Tabla 10. Datos obtenidos de tamaño de poro en los scaffolds, dado en μm	66
Tabla 11. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes al tamaño de poro. .	69
Tabla 12. Tabla ANOVA de los datos de tamaño de poro.	70
Tabla 13. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de tamaño de poro.	70
Tabla 14. Datos obtenidos de porcentaje de porosidad en los scaffolds.	71
Tabla 15. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes al porcentaje de porosidad.	72
Tabla 16. Tabla ANOVA de los datos de porcentaje de porosidad.	73
Tabla 17. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de porosidad.	73
Tabla 18. Datos obtenidos de resistencia máxima a la compresión en los scaffolds.	74
Tabla 19. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes a la resistencia máxima a la compresión.	76
Tabla 20. Tabla ANOVA de los datos de resistencia máxima a la compresión.	77
Tabla 21. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de resistencia máxima a la compresión.	77
Tabla 22. Datos obtenidos de módulo elástico en los scaffolds (MPa).	78
Tabla 23. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes al módulo de elasticidad.	80
Tabla 24. Tabla ANOVA de los datos de módulo de elasticidad.	80
Tabla 25. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de módulo de elasticidad.	80
Tabla 26. Datos obtenidos de degradación hidrolítica en los scaffolds.	82
Tabla 27. Prueba de normalidad para los datos de degradación.	84
Tabla 28. Tabla ANOVA de los datos de degradación.	84
Tabla 29. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de degradación hidrolítica.	85
Tabla 30. Prueba no paramétrica de Wilcoxon para los residuales de degradación.	85
Tabla 31. Datos obtenidos de absorción en los scaffolds.	86

Tabla 32. Pruebas de normalidad para los datos de absorción.....	87
Tabla 33. Tabla ANOVA de los datos de absorción.....	87
Tabla 34. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de absorción.	88
Tabla 35. Comparación de los datos obtenidos con la literatura en los ensayos morfológicos.....	89
Tabla 36. Comparación de los datos obtenidos con la literatura en los ensayos mecánicos.	90
Tabla 37. Comparación de los datos obtenidos con la literatura en los ensayos de estabilidad.....	90

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Generaciones de los biomateriales. Modificación de [17].	18
Fig. 2. Esquema básico de la estrategia más típica de la Ingeniería de Tejidos. Modificado de [35].	20
Fig. 3. Polímeros naturales. Modificado de [54].	22
Fig. 4. Células bacterianas con gránulos de PHA de diferente tamaño y cantidad. Tomado de [58].	23
Fig. 5. Estructura general de los polihidroxialcanoatos. Tomado de [57].	24
Fig. 6. Ejemplos de polihidroxialcanoatos. Arriba: polihidroxitirato. Al centro: copolímero polihidroxitirato-hidroxi valerato (Biopol). Abajo: PHA hipotético que ilustra diversos monómeros encontrados en bacterias. Tomado de [56].	25
Fig. 7. Esquema de fabricación de cuerpos porosos de hidroxiapatita usando corales y/o esponjas marinas. Tomado de [61].	29
Fig. 8. Esquema de fabricación de cuerpos porosos de hidroxiapatita usando la técnica de bloques con porosidad inducida. Tomado de [61].	29
Fig. 9. Ensamble básico del sistema de electrohilado. Tomado de [64].	30
Fig. 10. Esquema básico del sistema de liofilización. Autoría propia.	30
Fig. 11. Ruta metabólica de la producción de PHA, donde se observan reacciones metabólicas, sustrato y productos en las líneas continuas y metabolitos en las líneas discontinuas, implicados en la producción de PHA de cultivos mixtos. Modificado de [91].	32
Fig. 12. Representación esquemática de la propuesta de biofuncionalización de Masaeli et al. donde se observa la unión covalente de biomoléculas en la superficie de scaffolds de nanofibras de polihidroxitirato y polihidroxitirato-valerato. Modificado de [87].	33
Fig. 13. Posible reacción fotoquímica propuesta por Kessler et al. en la modificación superficial de polihidroxitirato con ultravioleta. Modificado de [88].	34
Fig. 14. Esquema del funcionamiento de una antorcha de plasma atmosférico. Tomado de [93].	35
Fig. 15. Abstract de la investigación publicada por Carpine et al. donde se observa el efecto de varias modificaciones genéticas hechas sobre la cepa <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 en la producción de PHB. Modificado de [95].	35
Fig. 16. Condrocitos inmersos en su matriz extracelular. Tomado de [120].	41
Fig. 17. Representación de los 6 pasos de la metodología. Autoría propia.	46
Fig. 18. Diagrama de flujo de la fabricación de scaffolds de PHA. Autoría propia.	49
Fig. 19. Diagrama de flujo de la caracterización de los scaffolds. Autoría propia.	49
Fig. 20. a) Representación gráfica del principio de Arquímedes, b) Método de Arquímedes realizado con etanol en vez de agua. Autoría propia.	50
Fig. 21. Fotografías del ensayo de compresión organizadas en orden temporal de izquierda a derecha. Autoría propia.	51
Fig. 22. Ejemplo de la obtención del módulo elástico en las curvas de compresión. Autoría propia.	51
Fig. 23. Fotografías secuenciales de la prueba de degradación hidrolítica, a) Obtención del volumen adecuado de la muestra para la prueba, b) La muestra una vez pesada se expone a SBF, c) La prueba se realiza en una incubadora a 37 °C, d) Finalmente se liofilizan las muestras para realizar el segundo y último pesaje. Autoría propia.	52

Fig. 24. Fotografías secuenciales de la prueba de absorción, a) La muestra se pesa en seco antes de iniciar la prueba, b) La muestra se somete a un ambiente húmedo c) por 24 h, d) El exceso de agua es retirado con un paño una vez ha pasado el tiempo establecido y e) Las muestras son pesadas nuevamente. Autoría propia.	52
Fig. 25: Reacciones presentes en la biofuncionalización de discos de los scaffolds de PHA. Modificado de Masaeli [87]......	53
Fig. 26. Esquema de la metodología de la prueba de citotoxicidad. Autoría propia.	54
Fig. 27. Micrografía SEM de una muestra de PHA.	56
Fig. 28. Espectro EDS de una muestra de PHA.	57
Fig. 29. Espectro DRX de una muestra de PHA.	58
Fig. 30. Estructura química y grupos funcionales para el PHA y el PLA. Autoría propia.....	58
Fig. 31. Espectro FTIR de una muestra de PHA.....	59
Fig. 32. Gráfico de viscosidad inherente (azul) y viscosidad reducida (rojo) vs concentración, para PHA.	62
Fig. 33. Termograma de TGA de una muestra de PHA.....	63
Fig. 34. Espectro DSC de una muestra de PHA.....	64
Fig. 35. Espectro de resonancia magnética nuclear de las muestras de PHA con ¹ H.	65
Fig. 36. Micrografías SEM a) y b) 5 % de PHA, corte lateral y transversal respectivamente, c) y d) 7,5 % de PHA, corte lateral y transversal respectivamente, y e) y f) 10 % de PHA, corte lateral y transversal respectivamente. ...	67
Fig. 37. Promedio y desviación estándar del valor de redondez de poro, donde las líneas azules corresponde a PHA 7.5 %, las verdes a PHA 10 % y las naranjas a PHA 12.5 %, los marcadores redondos corresponden a agua 60 %, los triangulares a agua 75 % y los cuadrados a agua 90 %, finalmente la gráfica está dividida en corte longitudinal y transversal del scaffold.....	67
Fig. 38. Gráfico de densidad de los diámetros de poro, donde se visualiza la distribución del tamaño de poro en cada tratamiento.	68
Fig. 39. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de diámetro de poro.....	68
Fig. 40. Normalidad de los datos de diámetro de poro, a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.	69
Fig. 41. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de porcentaje de porosidad.	71
Fig. 42. Normalidad de los datos de porcentaje de porosidad, a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.....	72
Fig. 43. Líneas de tendencia de la curva esfuerzo vs deformación más representativa de cada formulación, donde la forma da cuenta del porcentaje de agua y el color del porcentaje de PHA.	75
Fig. 44. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de resistencia máxima a la compresión.	75
Fig. 45. Normalidad de los datos de resistencia máxima a la compresión a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles	76
Fig. 46. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de módulo de elasticidad.	79
Fig. 47. Normalidad de los datos de módulo de elasticidad a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.	79
Fig. 48. Gráficos de medias de porcentaje de degradación, a) en el tiempo con respecto al factor PHA, b) en el tiempo con respecto al factor agua y c) del factor agua con respecto al factor PHA.	82

Fig. 49. Efecto de los factores en la variable respuesta de degradación de las unidades experimentales de forma individual con respecto al tiempo.....	83
Fig. 50. Normalidad de los datos de degradación a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.	83
Fig. 51. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de absorción.	86
Fig. 52. Normalidad de los datos de absorción a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.	87
Fig. 53. Esquema de la elección del scaffold con las mejores propiedades para su aplicación en ingeniería de tejidos de cartílago articular. Autoría propia.	91
Fig. 54. Esquema metodológico de la biofuncionalización de los scaffolds de PHA. Autoría propia.	92
Fig. 55. Espectro FTIR de a) material polimérico, b) scaffold sin lavar, c) scaffold lavado con etanol y d) scaffold esterilizado con óxido de etileno.	93
Fig. 56. Espectro FTIR de los scaffolds tratados con diferentes concentraciones de NaOH, a) a 0.03125 N, b) 0.0625 N, c) 0.125 N y d) 0.25 N.....	94
Fig. 57. Espectro FTIR de un scaffold c) biofuncionalizado y c) biofuncionalizado y esterilizado. Para comprar s trazan también los espectros de a) un scaffold de PHA y b) un scaffold sometido a un tratamiento de NaOH al 0.25 N.....	94
Fig. 58. Porcentaje de viabilidad celular de scaffolds de PHA.	95
Fig. 59. Fotografías de viabilidad celular: a) pellet de PHA, b) scaffold sin biofuncionalizar y c) scaffold biofuncionalizado. Las flechas azules marcan células vivas, las rojas marcan células muertas y las verdes marcan desechos de los scaffolds. Cortesía: Lenka Toro.	95
Fig. 60. Cromatografía de gases del polímero sin procesar, del scaffold de PHA y de una muestra control con	97
Fig. 61. Fotografías después de 24 h de exposición de fibroblastos humanos a a) medio de cultivo, b) 25 % de extracto y c) 100 % de extracto de scaffold de PHA. Cortesía: Lenka Toro.	98

LISTA DE ECUACIONES

Ec. 1. Ecuación de porcentaje de porosidad donde $\pi r^2 h$ es el volumen del scaffold y la relación Peso polímero/densidad de polímero, es el volumen que ocupa el polímero contenido en el scaffold.	50
Ec. 2. Ecuación para calcular la pérdida de masa en la prueba de degradación.....	52
Ec. 3. Ecuación para calcular el incremento de en el peso de los scaffolds en la prueba de absorción.	52
Ec. 4. Fórmula para determinar la viscosidad inherente, donde C corresponde a la concentración a la cual se realizó el análisis para cada muestra en mL/g.	62
Ec. 5: Fórmula para determinar la viscosidad reducida, donde C corresponde a la concentración a la cual se realizó el análisis para cada muestra en mL/g.	62
Ec. 6: Fórmula para determinar el peso molecular de la muestra, donde α y K son constantes Mark-Houwink y para este procedimiento son 0,756 y 0,0151 mL/g respectivamente [145].	62

RESUMEN

Las lesiones óseas y cartilagosas, bien sean provocadas por un trauma o una enfermedad, disminuyen la calidad de vida del paciente ya que afecta su desempeño social, laboral y educativo. Actualmente el desarrollo de implantes, tratamientos o intervenciones quirúrgicas para hacer frente a estas lesiones no cumplen a cabalidad la función propia del tejido afectado, es por ello que la Ingeniería de Tejidos (IT) surgió como una propuesta de regeneración del tejido más que el reemplazo del mismo y puede ser un tratamiento eficaz para el tratamiento de estas lesiones óseas. Este proyecto pretende el desarrollo de un scaffold polimérico que permita la reconstrucción del tejido, al mismo tiempo que se degrada; para ello se fabricaron scaffolds mediante la técnica de liofilización utilizando polihidroxialcanoato (PHA) como polímero, ya que es natural y degradable, además se implementó una técnica de biofuncionalización química para mejorar la interacción polímero-tejido y garantizar la estimulación del tejido circundante. Para caracterizar los scaffolds obtenidos se realizaron pruebas con Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) (para la composición química), SEM (para la morfología), pruebas de estabilidad, ensayos mecánicos (para la resistencia mecánica) y evaluación biológica.

El mejor scaffold obtenido para la aplicación de reemplazo de cartílago articular fue el tratamiento 10 % de PHA y 75 % de agua, la decisión fue tomada, descartando los tratamientos que no cumplieron con los requerimientos del scaffold para su aplicación, como son poros interconectados, resistencia mecánica adecuada para cumplir los requerimientos mecánicos del tejido cartilaginoso y velocidad de degradación comparable con casos prometedores de la literatura. Los tratamientos fueron descartados así: morfológicamente todos los tratamientos estuvieron en un rango adecuado, mecánicamente los tratamientos exhibieron valores bajos y se descartaron aquellos que no cumplieron con los requisitos de los scaffold sintéticos que reporta la literatura, estos incluyeron los tres tratamientos de 7.5 % de PHA y el tratamiento 10 % de PHA y 90 % de agua, finalmente, en las pruebas de estabilidad, el tratamiento que más cerca estuvo de la velocidad de degradación de los scaffolds sintéticos según la literatura fue 10 % de PHA y 75 % de agua. A pesar que la evaluación de la citotoxicidad de los scaffolds no presentó resultados adecuados, se considera necesario continuar investigando en procesos de purificación del material para eliminar trazas de solvente, que generen el efecto tóxico del scaffold.

Palabras clave: Biofuncionalización, Implantes, Ingeniería de tejidos, Polihidroxialcanoato, Polímero, Regeneración, Scaffolds, Tejido cartilaginoso, Tejido óseo

ABSTRACT

Bone and cartilage lesions, (result of trauma or disease), affect the quality of life of people, and interfere with their social, work and education life. Currently the solutions for these lesions are no satisfactory. The tissue engineering (TE) works in the tissue regeneration and works little in tissue replacement. The project aims is to develop a polymeric scaffold for tissue reconstruction while the scaffold is degraded. Freezer-Drying will be used for scaffold construction with a natural and degradable polymer calls it polyhydroxyalkanoate. The scaffold were biofunctionalization with chemical techniques for improve the polymer-tissue interaction and there stimulation of the host tissue. FTIR test, SEM, stability test, mechanical test and biological test, were used for characterize the scaffold proprieties.

10 % PHA and 75 % water treatment was the best scaffold in the experimental process; the choice obeyed the scaffolds characteristics such as cartilage graft, as interconnected porous, mechanical strength suitable to replacement cartilaginous tissue and degradation rate similar to literature cases. The choice was the next: morphologic characteristics were adequate, mechanical behavior was lower, three treatments of 7.5% PHA and the treatment 10% PHA and 90% water were discarded because they didn't meet the requirements of the synthetic scaffold reported by the literature. Finally 10 % PHA and 75 % water treatment was closest to the degradation rate of synthetic scaffolds according to the literature, in the stability test.

The cytotoxicity test of the scaffolds didn't present adequate results, but is necessary to continue investigating purification process of the material to eliminate traces of toxic solvent.

Keywords: Biofunctionalization, Bone tissue, Cartilage, Grafts, Polyhydroxyalkanoate, Polymer, Regeneration, Scaffolds, Tissue Engineering.

1. INTRODUCCIÓN

Según el DANE, para 2018 en Colombia existía un total de población con alteraciones en funciones o estructuras corporales de 1'404.108 personas, es decir, un 2.6 % de la población, para estas personas, su condición implica aislamiento social, laboral o educativo; lo cual deteriora su calidad de vida [1].

Estas alteraciones en funciones o estructural corporales, pueden deberse a la pérdida o lesión de un tejido que disminuye la capacidad funcional del cuerpo para realizar sus actividades cotidianas, en el caso del tejido cartilaginoso articular estas lesiones pueden ser causadas por agentes internos como procesos inflamatorios, degenerativos y factores genéticos, o procesos externos como la edad, el aumento de peso y traumatismos. El tejido cartilaginoso no posee la capacidad de restaurarse tras la lesión, debido a que no posee irrigación sanguínea, por ello ante un daño pequeño se pueden utilizar condrocitos autólogos inyectados, pero ante un daño significativo funcional, producto de lesiones traumáticas o degenerativas es necesaria la utilización de un implante [2].

Una alternativa para recuperar la funcionalidad del cartílago tras una lesión es la microfractura, la cual consiste en perforar la superficie subcondral para que las células mesenquimatosas lleguen a la lesión y formen una nueva matriz cartilaginosa, sin embargo, no es posible controlar la estructura de este nuevo tejido, ni su composición y propiedades mecánicas, entre otros [3].

Otro tipo de cirugía practicada para la reparación de cartílago articular, consiste en obtener autoinjertos y aloinjertos de cartílago, estos se obtienen aislando periostio y se introducen a presión en agujeros creados en la zona de la lesión para reproducir el tejido, sin embargo, dificultades como la disponibilidad, compatibilidad y morbilidad inducida en el paciente, han hecho de este procedimiento una solución poco práctica [3]. Otra técnica utilizada es el implante de condrocitos autólogos, pero además de las dificultades encontradas a la hora de fijar el injerto, esta técnica resulta muy costosa [3], [4].

El uso de prótesis en la reparación de cartílago articular, puede eliminar el dolor y reestablecer parcialmente la funcionalidad pero su tiempo de vida útil es corto [3], esto debido a los materiales utilizados en su fabricación y su diseño, además existen dificultades para obtener materiales bioactivos que cumplan con los requerimientos mecánicos necesarios [5].

Un material candidato para la reparación de cartílago es el PHA, el cual es un polímero natural producido por bacterias, que ha sido utilizado como implante debido a sus propiedades de biodegradabilidad, citocompatibilidad y comportamiento mecánico ajustable [6] [7] [8], otros polímeros que han sido utilizados para fabricar implantes para reemplazo de cartílago como el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PGA) y el quitosano no promueven adecuadamente la adhesión celular [7], en cambio el PHA ha demostrado mejorar el crecimiento y la diferenciación de varios tipos de células [7].

Es por ello que el objetivo de este proyecto fue la fabricación de scaffolds biodegradables que estimularan a las células a crear su propia matriz extracelular, al tiempo que éstos se degradaban en el cuerpo; para ello se utilizó un scaffold fabricado de un polímero natural llamado polihidroxialcanoato (PHA) que no deja partículas poliméricas en su proceso de degradación y se esperaba que permitiera el desarrollo celular entre sus poros, de manera que el scaffold pudiera ser usado como potencial material de restitución de tejido cartilaginoso.

Para la fabricación de los scaffolds se realizó un diseño de experimentos factorial 3² donde los factores y los niveles (entre paréntesis) fueron el porcentaje de PHA (7.5, 10 y 12.5 %) y el porcentaje de agua (60, 75 y 90 %) obteniendo así nueve tratamientos, que se fabricaron a partir de una solución polimérica en la que se agregó PHA, diclorometano para disolver el PHA, agua para generar mayor porosidad y facilitar la congelación y tergitol como surfactante, la solución se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó por 48 horas, una vez obtenidos los scaffolds, estos se lavaron con soluciones de etanol y se liofilizaron de nuevo.

Después de la fabricación de los scaffolds, estos se caracterizaron usando diversas técnicas, a nivel morfológico se utilizó el método de Arquímedes para determinar el porcentaje de porosidad de las muestras y micrográficas por la técnica de microscopía electrónica de barrido SEM para analizar el tamaño de los poros; a nivel mecánico se realizaron ensayos de compresión para obtener datos de resistencia máxima a la compresión a una deformación de 75 % y módulo de elasticidad; finalmente para verificar la estabilidad de las muestras se realizaron ensayos de degradación hidrolítica y ensayos de absorción; estas seis pruebas permitieron la elección del tratamiento más adecuado para la regeneración de tejido cartilaginoso el cual fue PHA 10 % y agua 75 %.

Una vez definido el mejor tratamiento este se sometió a un proceso de biofuncionalización que consistió en exponer los grupos carboxilo del polímero con un ataque de NaOH y luego usar los reactivos clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) y sal de sodio de N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS) para acoplar colágeno en la superficie, finalmente se realizaron pruebas de biocompatibilidad utilizando fibroblastos humanos y el análisis MTS para evaluación de viabilidad celular.

Dentro de los resultados obtenidos, los porcentajes de porosidad y tamaño de poro fueron suficientes para propiciar la migración celular y el intercambio de nutrientes y desechos en el interior de los scaffolds, la resistencia mecánica obtenida fue inferior a los valores típicos del tejido nativo, pero similares a los reportados en la literatura por otros autores como exitosos, ya que ellos argumentan que el ambiente interno corporal permite el refuerzo estructural de las muestras. Con respecto a la estabilidad de las muestras se obtuvieron porcentajes de absorción similares a los reportados en la literatura por otros autores, no obstante, los datos de degradación no parecieron seguir un patrón definido, pero se logró establecer un tratamiento con velocidades de degradación similares a las velocidades de regeneración del tejido reportadas [9], [10], [11].

Para verificar el proceso de biofuncionalización se utilizaron espectros de FTIR que permitieron observar la activación de los grupos carboxilo, pero no fue posible la identificación de grupos amidas correspondientes al colágeno.

Finalmente los resultados de biocompatibilidad arrojaron resultados citotóxicos tanto de muestras biofuncionalizadas como de muestras no biofuncionalizadas, mas no en los pellets del polímero, por lo tanto se sospechó de presencia de diclorometano porque a pesar de no tener evidencia en los espectros FTIR, el diclorometano fue el único reactivo tóxico utilizado en el proceso, su presencia fue identificada por un ensayo de cromatografía de gases.

Como conclusiones se presentan las propiedades de los scaffolds obtenidos y la influencia del porcentaje de agua y de PHA presentes en las muestras, en general la mayor cantidad de agua favoreció el incremento del tamaño de poro pero disminuyó la resistencia mecánica, caso contrario ocurrió con el porcentaje de PHA, para las pruebas de estabilidad no fue posible definir tendencias claras, pero los valores obtenidos fueron adecuados para la aplicación.

Se recomienda buscar estrategias para la eliminación de diclorometano en las muestras, que purifiquen el material, eliminando trazas de dicho solvente; ya que las propiedades mecánicas, morfológicas y de estabilidad resultaron ser muy prometedoras para el reemplazo de tejido cartilaginoso.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La reparación de algunas lesiones menores en los tejidos del cuerpo humano, suelen darse por sí mismas gracias a la irrigación sanguínea, en el caso de algunos tejidos como el cartílago, la autoreparación es difícil debido a la ausencia de vascularización en estos [2], es por ello que ante las lesiones presentadas en este tejido, es necesario el uso de implantes que le permitan al cartílago seguir siendo funcional. En este aspecto, la Ingeniería de Tejidos (IT) propone la estimulación de la regeneración del tejido más que la sustitución del mismo, siendo necesaria la utilización de plataformas de crecimiento celular o scaffolds que le brinden a las células un ambiente idóneo para generar su propia matriz extracelular, siendo entonces importante el uso de materiales que tengan la capacidad de degradarse para permitir su sustitución por la matriz extracelular propia de las células [12]. Es así como en los últimos años, se han desarrollado scaffolds con biomateriales poliméricos como los PHA, gracias a sus propiedades biocompatibles, sus propiedades mecánicas ajustables y su capacidad de degradarse sin dejar residuos tóxicos [7].

Un ejemplo de dichos scaffolds es el desarrollo propuesto por You y sus colaboradores en 2011 quienes fabricaron scaffolds utilizando un PHA denominado 3-hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato (PHBHHx), debido a que este facilita el crecimiento y la diferenciación de diversos tipos de células. Durante los ensayos biológicos utilizaron células madres mesenquimales de médula ósea humana, los scaffolds fueron modificados a través de una intervención superficial de manera que se potenció la bioactividad de la estructura, este proceso es mejor conocido como biofuncionalización, en este estudio los scaffolds se recubrieron con una solución de PHA y el péptido RDG, ya que este último proporciona un punto de anclaje para las proteínas de la pared celular de las células madres, obteniéndose muy buenos resultados, como la propagación más homogénea de células y mayor adhesión celular, proliferación y diferenciación condrogénica en comparación con los scaffolds sin biofuncionalizar [7].

De acuerdo con los antecedentes se planteó como objetivo de este proyecto, establecer un protocolo para la fabricación (utilizando el método de liofilización) de scaffolds de PHA, caracterizándolos química y mecánicamente y su posterior biofuncionalización de manera que se obtenga un producto con potenciales usos en la reparación de tejido cartilaginoso.

3. OBJETIVOS

General

Establecer un proceso para la fabricación por liofilización de scaffolds de polihidroxialcanoato (PHA) biofuncionalizados con potencial uso en IT.

Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de diferentes porcentajes de agua agregada en las formulaciones, en las propiedades mecánicas y morfológicas de los scaffolds de PHA.
- Comparar las propiedades químicas, morfológicas y mecánicas de scaffolds de PHA obtenidos con diferentes formulaciones.
- Proponer un método para la biofuncionalización de los scaffolds de PHA con miras a mejorar su proliferación y adhesión celular.
- Evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de los scaffolds fabricados, antes y después de la biofuncionalización.
- Documentar un protocolo para la fabricación por liofilización de scaffolds de PHA biofuncionalizados.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. BIOMATERIAL

El término biomaterial fue definido en la Conferencia de Desarrollo de Consensos sobre las Aplicaciones Clínicas de los Biomateriales desarrollada por los Institutos Nacionales de Salud (*American National Institute of Health, 1982*) como:

“Cualquier sustancia o combinación de sustancias, diferente a los medicamentos, sintéticas o naturales, que pueden ser usadas por un periodo dado de tiempo, que mejora o reemplaza parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del organismo, para mantener o mejorar la calidad de vida del individuo” [13].

Diez años después, la Sociedad Europea redefine el concepto de biomaterial en la Segunda Conferencia de Consensos de la Sociedad Europea de Biomateriales (*Second Consensus Conference on Definitions in Biomaterials, Chester, UK, 1992*) como:

“Un material ideado para interactuar con los sistemas biológicos, para evaluar, tratar, aumentar o sustituir cualquier tejido, órgano o función del cuerpo” [14].

Más recientemente, Ratner y Montufar retoman el concepto de biomaterial como, cualquier sustancia o combinación de ellas, que no sean drogas o fármacos, de origen natural o sintético, que puede ser usada por tiempo indeterminado aumentando o reemplazando parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, con la finalidad de mejorar la calidad de vida frente a la adversidad [15], [16].

Las definiciones a lo largo de ventiocho años y entre diferentes comunidades científicas son muy similares, apoyando el argumento de que el concepto de biomaterial no ha cambiado y puede asumirse como compartido por la comunidad científica que trabaja en el tema.

Sin embargo, la utilización de los biomateriales data desde el comienzo mismo de la historia de la humanidad, donde si bien no existía el término como tal, se utilizaban los recursos de la naturaleza para sustituir o reforzar funciones de órganos o tejidos defectuosos [17]. Inicialmente, la elección de un biomaterial partía de la experiencia previa o el sentido común [18], es así como los primeros biomateriales cumplían muy bien su función mecánica pero no necesariamente ocurría lo mismo con respecto a su biocompatibilidad [19].

Con el paso del tiempo, se fueron mejorando las propiedades de los biomateriales, se buscaba incrementar su tiempo de vida útil, mejorar su biocompatibilidad y hacer diseños más cómodos en su uso [19]. Pero la revolución en cuanto a investigación de biomateriales se refiere, no inició sino hasta alrededor de 1950, cuando los médicos cirujanos comenzaron a implantar materiales no biológicos en el cuerpo humano [17]. A partir de allí nacieron las generaciones de los biomateriales ejemplificadas en la Fig. 1 [20].

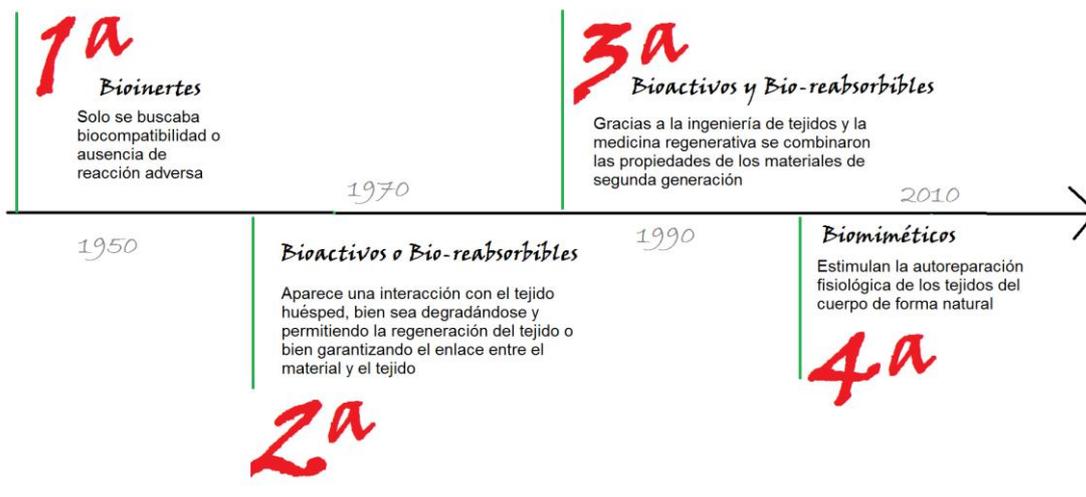


Fig. 1. Generaciones de los biomateriales. Modificación de [20].

Dada la definición de biomaterial discutida previamente, este debe cumplir con ciertas características básicas como son: ser biocompatible, no ser tóxico, no ser carcinógeno, ser químicamente inerte y estable (a menos que no sea lo que se busca) [21], además debe cumplir los requerimientos de la aplicación específica para la cual fue diseñado (función, estabilidad, sollicitaciones externas, mecanismos de fijación, interacción con el tejido hospedero, entre otras, que cumplan con las propiedades físico-químicas, mecánicas y biológicas, y las características superficiales y de interface específicas del objetivo buscado) [15], aparte de ser económicamente reproducible a gran escala, entre otros. Los biomateriales pueden ser clasificados según su naturaleza química en metálicos, cerámicos, poliméricos y compuestos [19], [22].

Los materiales poliméricos (naturaleza del material objeto de este estudio) son compuestos moleculares de largas cadenas a base de carbono, hidrógeno y oxígeno, formadas por la polimerización de moléculas más simples llamadas monómeros que pueden ir desde 100 hasta más de 100.000. La polimerización es una reacción que puede ocurrir naturalmente mediante reacciones bioquímicas en el interior de la célula formando polímeros naturales, o puede ocurrir artificialmente obteniéndose polímeros sintéticos [23]. Los polímeros están distribuidos ampliamente en la naturaleza, se pueden encontrar en el cuerpo humano, por ejemplo proteínas y ácidos nucleicos [24] y pueden obtenerse de origen animal (colágeno, quitosano), agrícola (celulosa) [25] y microbiano (ácido poliláctico y polihidroxicanoatos) [26], [27].

Los biopolímeros naturales son de gran interés por sus aplicaciones médicas y farmacéuticas, siendo utilizados como sistemas de liberación de fármacos, sensores de diagnóstico y sustitutos de piel; ya que permiten la formación de una interface con el sistema biológico gracias a su alta biocompatibilidad [26], [28].

4.2. INTRODUCCIÓN A LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Anualmente, millones de personas pierden la funcionalidad de órganos y tejidos, estos suelen iniciar un proceso de regeneración biológica donde el propio organismo es capaz de restaurarse, sin embargo, este mecanismo sólo ocurre en algunos tejidos y sólo cuando la lesión no es demasiado grave [29], en casos donde la autorreparación no es posible, una estrategia de solución se fundamenta en la IT que, como conocimiento interdisciplinario aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida al desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función de un tejido u órgano dañado por enfermedad o traumatismo [30].

Es así como la IT juega un papel muy importante en el uso de sustitutos de tejidos tanto blandos como duros y tiene como fundamento esencial el uso de plataformas de soporte conocidas como scaffolds, sobre los cuales se cultivan células que colonizan la matriz para su implantación en el cuerpo y ayudar a reemplazar el tejido [31]. Este término ha sido muy usado en los últimos veinte años como una promesa científica, en principio se preveía que en un futuro no muy lejano el ser humano estaría en la capacidad de desarrollar de forma artificial órganos y estructuras biológicas complejas, con la intención de poder cambiar una pieza dañada en un paciente por una de estas creaciones, tal como se hace con las máquinas.

El término “Ingeniería de Tejidos” se acuñó en 1987 y se presentó como una alternativa al trasplante de órganos, ya que el sistema inmune genera rechazos y dichos órganos son escasos, esta alternativa entonces propone que el cuerpo se cure a sí mismo estimulado por implantes, prótesis y modificaciones celulares [32].

Su popularidad ha ido en aumento debido a los desarrollos que ha alcanzado en áreas como fabricación de matrices celulares biomiméticas, fabricación de estructuras complejas, la posibilidad de controlar el metabolismo celular a través de factores de crecimiento y señales moleculares, y desarrollo de técnicas de caracterización, entre otros que potencializan su uso en la medicina regenerativa [33]. A pesar de que se ha visto que en la formación de órganos, trabajar con aquellos que tienen una estructura tridimensional compleja es una empresa difícil, y que la velocidad de desarrollo de este campo es mucho menor a la que se ve en otros campos científicos, la medicina regenerativa y la IT continúan siendo un campo de investigación relevante, que de cumplir sus objetivos, la salud y el bienestar de cada individuo podrían garantizarse de manera muy eficaz.

Para el desarrollo de estructuras en IT, se pueden seguir dos estrategias, una de ellas implica la construcción de un scaffold celular, sobre el que se depositan células antes del implante del mismo (ver Fig. 2), las células fabrican su propia matriz extracelular a medida que el scaffold se degrada, en la segunda estrategia el scaffold se implanta libre de células y se estimula la infiltración de estas por medio de moléculas de señalización [32].

Con el tiempo, las células proliferan en el scaffold para formar un sistema de tejido [34], [35], [36]. Un scaffold debe tener un tamaño de poro adecuado, para proporcionar la difusión de nutrientes; además estos poros deben estar interconectados para facilitar la vascularización y la migración celular. Por otro lado, los scaffolds deben también ser biocompatibles, con propiedades mecánicas y de superficie apropiadas, tanto desde el punto de vista químico como desde su morfología [37]. En la selección de los materiales usados en IT pueden incluirse desde los cerámicos hasta los

polímeros, y pueden ser degradables o no según su naturaleza, dentro de los materiales biodegradables se destacan cerámicos como los fosfatos tricálcicos, o polímeros como el quitosano; todos ellos pueden moldearse con relativa facilidad en formas geoméricamente complejas, con excelente biocompatibilidad y buen resultado en numerosas aplicaciones biomédicas [21], [34].

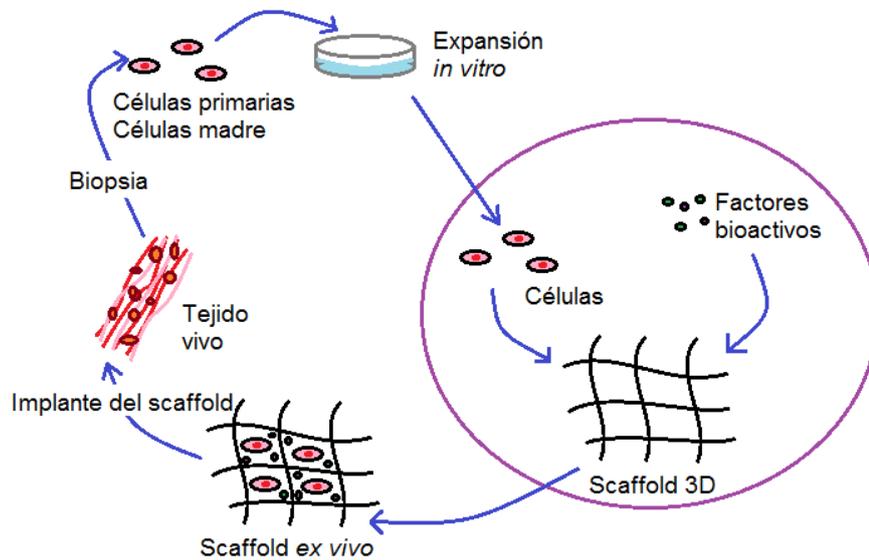


Fig. 2. Esquema básico de la estrategia más típica de la Ingeniería de Tejidos. Modificado de [38].

Los polímeros biodegradables son los materiales preferidos para la fabricación de scaffolds, ya que se desintegran o bioabsorben una vez que han cumplido sus funciones, lo que lleva a la formación natural de los tejidos sin dejar elementos permanentes de síntesis en el cuerpo humano [39], [40], [41], [42].

La literatura sobre el desarrollo y estudio de scaffolds para IT es amplia y con aportes de gran importancia. El desarrollo de los nuevos biomateriales llamados de tercera y cuarta generación [20] ha permitido una mayor aproximación a los requerimientos de un scaffold ideal [43]. Estos materiales se caracterizan por que pueden interactuar con los tejidos de forma específica, mediante estímulos a nivel celular y molecular, combinando las propiedades de bioabsorbabilidad y bioactividad, en un mismo material.

4.2.1. POLÍMEROS EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

Los polímeros naturales han estado presentes desde hace miles de años en la naturaleza, el ámbar por ejemplo, fue utilizado 2.500 años a.C. por algunas civilizaciones para embalsamar a sus muertos y también en joyería [44]. La goma laca es otro polímero natural producido por la excreción de un insecto (*Keria lacca*), el cual es soluble en algunas soluciones como el alcohol y se utilizaba como recubrimiento de superficies [44], [45].

Los primeros polímeros creados o modificados por el hombre, partieron de la manipulación de polímeros naturales, el primer acontecimiento que se reporta como creación de un polímero fue la vulcanización de la goma por parte de Charles

Goodyear en 1839, lo que permitió obtener un material seco, resistente y elástico. La baquelita, fue el primer polímero completamente sintético, obtenido a partir de fenol y formaldehído en 1909 por L. Baekeland [44], [46].

Dentro de los polímeros sintéticos, uno de los primeros avances hecho en la medicina, fue la utilización de polimetilmetacrilato (PMMA) en la fabricación de implantes oculares; Nicholas Harold Lloyd Ridley descubrió en noviembre de 1949, que los trozos de los parabrisas de algunos aviones de guerra fabricados con PMMA que quedaban incrustados en los ojos de los pilotos no generaban reacciones alérgicas, fue así como nació el primer lente intraocular [47].

Los polímeros naturales han sido muy estudiados en la industria médica gracias a sus propiedades de biocompatibilidad y degradación, el colágeno por ejemplo es una proteína abundante en el cuerpo humano que le confiere elasticidad, flexibilidad y resistencia a los tejidos, por lo cual ha sido utilizado en la fabricación de sustitutos de córnea, piel artificial, suturas, transportador de fármacos y agente hemostático, entre otros [46], [48]. Las características ya vistas de los polímeros naturales hacen que estos sean más frecuentemente utilizados en tejidos como piel, hueso y cartílago [49], [50], [51], [52]. Algunos ejemplos de los usos de polímeros en la ingeniería de tejidos son presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de algunos polímeros utilizados en la ingeniería de tejidos y su aplicación.

Polímero	Uso	Referencia
Scaffold electrohilado de ácido poliláctico	Liberación de fármacos	[53]
Películas de quitosano	Estimulación de regeneración de piel	[49]
Matriz de colágeno	Cicatrización del ligamento cruzado anterior	[54]
Andamiaje acanalado poroso basado en ácido hialurónico	Regeneración de estructuras del sistema nervioso, estrategia conocida como conductos neurales.	[55]
Scaffolds de policaprolactona	Reparación de lesiones condrales	[51]
Scaffolds a partir de poli (ácido láctico) (PLA) y polietilenglicol (PEG)	Regeneración de hueso esponjoso y cartílago	[50]
Matrices basadas en un copolímero acetato de vinilo (AcV)-fumarato de diisopropilo (FIP) entrecruzado con quitosano	Regeneración del tejido cartilaginoso	[52]

4.2.1.1. POLÍMEROS NATURALES

Los polímeros naturales (ver Fig. 3) son compuestos moleculares de largas cadenas a base de carbono, hidrógeno y oxígeno, formados por la polimerización de moléculas más simples llamadas monómeros [23], la cual ocurre al interior de las células animales, vegetales o en microorganismos [56], [27], a nivel clínico el atractivo de estos polímeros radica

en sus propiedades de alta biocompatibilidad y degradación [48] permitiendo su uso como sistema de liberación de fármacos, sensores de diagnóstico y sustitutos de piel, entre otros, puesto que permiten la formación de una interface con el sistema biológico y ello requiere alta biocompatibilidad por parte del polímero [28].

Algodón de plantas es un polímero natural usualmente usado en la fabricación de ropa



La seda del gusano de seda es utilizada para fabricar ropa



La madera es un polímero natural usado para el papel



El látex natural del árbol de caucho es un polímero



El caucho puede ser usado para hacer llantas



o ¡bandas de caucho!



El caparazón de los crustáceos está hecho de quitina, un polímero natural



Los carbohidratos como los espaguetis son polímeros naturales



Las proteínas de los huevos y otros alimentos también son polímeros naturales



Fig. 3. Polímeros naturales. Modificado de [57]

Como ejemplo de investigaciones con polímeros naturales, está el trabajo de Suarez et al. quienes fabricaron películas de quitosano con adición de glicerina, para mejorar las propiedades mecánicas con respecto a las propiedades de las películas de quitosano tradicionales y ser utilizadas en la regeneración de tejido epitelial, en este trabajo obtuvieron una relación proporcional entre la cantidad de glicerina utilizada en la película y la flexibilidad de esta [49].

Villanueva por su parte fabricó scaffolds de PLA mediante impresión 3D, donde obtuvo tamaños de poro entre 176 μm y 675 μm , además de valores de resistencia a la compresión entre 6.15 MPa y 15.17 MPa y porcentajes de porosidad entre 56.12 % y 63.3 % convirtiéndolos en estructuras con un alto potencial para la reparación y regeneración de tejidos duros y blandos (óseos y cartilagosos) [50].

Canadas et al. fabricaron scaffolds de PHA utilizando la técnica de electrohilado y evaluaron su biocompatibilidad con células madre mesenquimales humanas, ya que estas tienen la capacidad de diferenciarse en diversos linajes y por tanto pueden ser utilizadas para reemplazos o regeneración de varios tejidos, de este trabajo en el cual produjeron el PHA a través de la bacteria *Cupriavidus necator*, obtuvieron que la topología 3D de la estructura es crítica para garantizar la adhesión y proliferación celular, así que su utilización queda sujeta a la morfología del tejido a reparar [58].

Además con estos polímeros se elimina el problema de la degradación lenta de los polímeros sintéticos, la cual puede tardar 500 años y liberar en el proceso partículas de plástico más pequeñas (inferior a 5 mm) que se pueden acumular por ejemplo en ecosistemas marinos y representan un peligro para los organismos por ingestión y atragantamiento. Uno de los polímeros naturales más usados son los PHA, gracias a sus propiedades, como son su gran versatilidad con respecto a su resistencia mecánica haciéndolo útil en un sin número de aplicaciones, su efecto no tóxico, y principalmente su biocompatibilidad [59].

4.2.1.1.1. POLIHIDROXIALCANOATOS

Los PHA son poliésteres compuestos de monómeros de polihidroxiácidos polimerizados linealmente (polímeros naturales), producidos principalmente por bacterias como reserva de nutrientes [59] y almacenados en gránulos intracelulares [60]. Las bacterias producen el polímero a partir del consumo de sustratos orgánicos, y la cantidad producida depende de la especie de la bacteria y de las condiciones del cultivo, en general, estas condiciones consisten en un desbalance de nutrientes, donde la presencia de carbono es alta en comparación de otros nutrientes como el nitrógeno, azufres o fosfatos, de manera que la bacteria no se reproduce con facilidad pero si almacena energía (Fig. 4) [59], [60].



Fig. 4. Células bacterianas con gránulos de PHA de diferente tamaño y cantidad. Tomado de [61].

La estructura química de este polímero consiste en un esqueleto (igual a la estructura básica del poliéster) de tres unidades de carbono, acompañados por un grupo alquilo unido al carbono número tres del grupo, es decir, (R)-3-hidroxiácido en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Fig. 5) [60], la variación de este alquilo ha generado más de 100 monómeros diferentes de PHA (Fig. 6) impidiendo la unificación de características químicas y mecánicas de dicho polímero, de hecho, la cadena lateral de este polímero tiene una longitud que varía entre tres y más de catorce átomos de carbono, influyendo directamente sobre sus propiedades como son el punto de fusión y cristalinidad, por tanto la longitud de dicha cadena puede determinar el tipo de procesamiento que requiere el polímero y la aplicación en que puede ser usado [59].

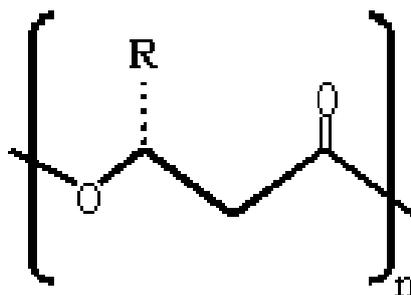


Fig. 5. Estructura general de los polihidroxicanoatos. Tomado de [60].

La primera observación de PHA se hizo en 1888 en células bacterianas, pero no fue hasta 1925 que se supo que se trataba de un polímero utilizado para almacenar la energía de la célula, y sus propiedades fueron completamente desconocidas hasta hace pocos años cuando iniciaron los estudios sobre algunas de sus propiedades como peso molecular, temperatura de fusión, cristalinidad y morfología del gránulo. Un factor limitante se presentó cuando se inició el proceso de producción controlada de este polímero, ya que los plásticos derivados del petróleo eran mucho más económicos, y las políticas medioambientales no eran importantes [62].

Los PHA tienen pesos moleculares altos (56 a 1400 kDa), sin embargo, la gran variedad en que pueden producirse los hace versátiles en cuanto a sus aplicaciones, el P3HB por ejemplo, es muy utilizado gracias a la facilidad de su producción y tiene características similares al polipropileno otorgándole un potencial uso como embalaje de productos agrícolas, biomédicos e higiénicos, y protección de materiales fibrosos [62].

Con respecto a aplicaciones biomédicas, el PHA es una gran alternativa debido a su biocompatibilidad, y degradación enzimática no tóxica [63], su principal aporte ha sido en la fabricación de scaffolds para células óseas [62].

Los polímeros sintéticos pueden ser termoestables, siendo más resistentes mecánicamente que otros polímeros pero con procesamiento irreversible, es decir, no pueden ser reprocesados ni reciclados; o pueden ser termoplásticos, lo que les permite ser reprocesados. Los polímeros sintéticos más comunes son el poliestireno utilizado para la fabricación de piezas resistentes, el polivinilcloruro que puede ser maleable para fabricar bolsas de almacenamiento de líquidos, o rígido para fabricar tuberías de agua, el politetrafluoroetileno es utilizado para fabricar utensilios antideslizantes, el polietileno es el polímero más utilizado y puede ser de alta o baja densidad, confiriéndole distintas propiedades, y finalmente el polipropileno es utilizado en automóviles molduras, cajas de batería, botellas, tubos, filamentos y bolsas [64].

A pesar de que existe tecnología competente para el reciclaje de los polímeros sintéticos, los costos y los problemas de procesamiento hacen de esta tecnología un proceso poco eficiente. Como respuesta a estos problemas de contaminación se pueden utilizar polímeros denominados biodegradables [64].

Los polímeros biodegradables se clasifican en tres subgrupos, los fotodegradables que son sensibles a la luz y sufren degradación por exposición a radiación UV, los semidegradables donde se inserta almidón entre moléculas de polietileno para ser parcialmente degradados por bacterias, y el tercer tipo de polímero degradable son los completamente degradables (como lo son el poliláctico y el poliglicólico), que se han convertido en una nueva promesa para mitigar la contaminación generada por polímeros, estos se degradan al contacto con el ambiente y puede ser generados a partir de plantas, animales o bacterias [64].

Los polímeros completamente degradables pueden ser obtenidos de almidón que se usa principalmente para la fabricación de utensilios para comer, también puede ser derivados de bacterias y son conocidos como PHA, estos últimos pueden ser sintetizados por el 64 % de las bacterias que habitan en los suelos, los polímeros basados en soya que puede ser moldeados gracias a la cantidad de proteínas que posee, y los polímeros basados en celulosa son utilizados principalmente en embalaje, pero no son muy comunes ya que a pesar de que es el biopolímero más abundante de la tierra, su procesamiento es costoso, entre otros polímeros [64], [65]. Las propiedades mecánicas del PHA comparadas con otros polímeros se muestran en la Tabla 2.

Las propiedades que exhibe el PHA estudiadas a lo largo del documento lo convierten en un material con una gran capacidad de sustituir el tejido cartilaginoso, en este segmento se sintetizan las opiniones de algunos investigadores.

Los PHA son los poliésteres microbianos más ampliamente estudiados debido a su biocompatibilidad y a su capacidad de degradarse sin generar efectos tóxicos, en contra posición con algunos materiales comerciales disponibles para impresión 3D, basados en petroquímicos cuyos efectos sobre la biocompatibilidad son desconocidos y cuya fabricación no es ambientalmente sostenible [67]. También se han caracterizado sobre otros polímeros naturales, por su amplia gama de propiedades mecánicas y su fácil procesabilidad [68], es un polímero con las características biocompatibles de los polímeros naturales, y la maquinabilidad de un polímero sintético [58].

Varios tipos de células han sido sembradas sobre estructuras de PHA con resultados de biocompatibilidad positivos, como lo son osteoblastos, células epiteliales y condrocitos ovinos, por ejemplo, Kai et al, sembraron condrocitos de conejo en estructuras realizadas con combinaciones de tres tipos de PHA, y en todas las combinaciones, encontraron que a pesar de que las células tenían una tasa de adhesión baja en los primeros tres días, la proliferación se incrementaba significativamente entre el tercer y el séptimo día. La proliferación celular dependió más de las estructuras porosas y su comportamiento mecánico que del material en sí, ya que este es químicamente biocompatible [69].

Tabla 2. Propiedades mecánicas de varios tipos de PHA comparadas con las propiedades mecánicas de otros polímeros. Modificado de [66].

Polímero	Contenido del copolímero	Módulo de Young (GPa)	Esfuerzo tensil (MPa)	Elongación hasta la ruptura (%)
P(3HB)		3.5-4	40	3-8
P(4HB)		149	104	1000
	(3 mol% 3HV)	2.9	38	n.a.
	(9 mol% 3HV)	1.9	37	n.a.
P(3HB-co-3HV)	(14 mol% 3HV)	1.5	35	n.a.
	(20 mol% HV)	1.2	32	n.a.
	(25 mol% 3HV)	0.7	30	n.a.
	(3 mol% 4HV)	n.a.	28	45
	(10 mol% 4HV)	n.a.	24	242
P(3HB-co-4HB)	(16 mol% 4HV)	n.a.	26	444
	(64 mol% 4HV)	30	17	591
	(90 mol% 4HV)	100	65	1080
P(3HHx-co-3HO)		n.a.	10	300
P(3HB-co-3HA)	(6 mol% 3HA)	0.2	17	680
P(3HB-co-HP)	(67 mol% HP)	n.a.	n.a.	n.a.
P(3HB-co-3HHx)		n.a.	20	850
P(3HO)		n.a.	6-10	300-450
Polipropileno isotáctico		1.0-1.7	29.3-38.6	500-900
HDPE		0.4-1.0	17.9-33.1	12-700
LDPE		0.05-0.1	15.2-78.6	150-600
PS		3.0-3.1	50	3-4
Nailon 6,6		2.8	83	60
Polietilen-tereftalato		2.2	56	7300

4.3. SCAFFOLDS

Los scaffolds son estructuras o matrices celulares artificiales altamente porosas que tienen la capacidad de albergar células y estimular sus funciones como la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación, y están diseñados para sustituir o regenerar diversos tejidos [31]. Surgieron como una alternativa a los trasplantes, reconstrucciones quirúrgicas, prótesis artificiales y dispositivos mecánicos, que no brindaban una solución satisfactoria en caso de daños significativos en los tejidos [12].

Los scaffolds generalmente utilizados en la IT se fabrican a partir de biopolímeros, proteínas, péptidos y materiales inorgánicos. Además de la influencia del material utilizado, las características y propiedades finales de los scaffolds son determinadas por la técnica de fabricación utilizada. Pueden proveer resistencia mecánica, poros interconectados, superficie química específica y geometrías únicas para regeneración de tejidos. Estas características claves pueden lograrse utilizando una técnica particular, una cuidadosa selección del material y los agregados correspondientes de los scaffolds [70].

Cualquiera que sea el proceso de fabricación del scaffold debe asegurar que no se modifique el material en tal forma que afecte sus características como biomaterial. Las propiedades mecánicas del scaffold surgen como una combinación de las propiedades del material utilizado, la geometría del scaffold, la incorporación de compuestos agregados y la técnica de fabricación, ya que las técnicas de fabricación dependen casi que enteramente de las propiedades del material y el objetivo para el cual se desea fabricar el scaffold.

Aunque son diversas las técnicas de procesamiento, sobresalen algunas como: la liofilización, separación de fases, espumado gaseoso, disolución y colada con lixiviación de partículas, asociación de fibras, moldeo por fusión, e incluso, prototipado rápido [32], [70], [71].

4.3.1. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN DE SCAFFOLDS

Para la fabricación de scaffolds, se han desarrollado muchas metodologías que buscan la obtención de éstos con propiedades particulares según el requerimiento, una de ellas se basa en el aprovechamiento de la estructura porosa de corales y esponjas marinas, y consiste en someter estos materiales a un proceso de transformación química, este método ha sido utilizado principalmente para la fabricación de cuerpos porosos de hidroxiapatita (ver Fig. 7) [72]; bloques con porosidad inducida (ver Fig. 8) [72] es otra técnica que consiste en introducir algunos compuestos químicos en una solución previa (de la sustancia a utilizar para fabricar el scaffold) que permitan la generación de poros, luego la solución es sometida a tratamiento térmico, pero esta técnica tiene la desventaja de producir scaffolds con muy poca resistencia mecánica [73]; el electrohilado (ver Fig. 9) es una técnica que consiste en producir nanofibras por medio de un equipo el cual somete gotas de la solución (material para hacer el scaffold) a una diferencia de voltaje que rompe la tensión superficial de la gota formado hilos muy delgados que son halados hasta un colector [74].

Finalmente, uno de los métodos más utilizados es conocido como freeze-drying (liofilización) [71], [19], [34], [36], el cual consiste en fabricar una solución a partir del material de interés y según las especificaciones de este, dicha solución es congelada para garantizar el estado sólido de la misma y luego es introducida en un liofilizador, el cual extrae el contenido líquido de la muestra pasándolo de un estado sólido a un estado de vapor (sublimación) para evitar que el líquido en movimiento modifique la estructura del scaffold.

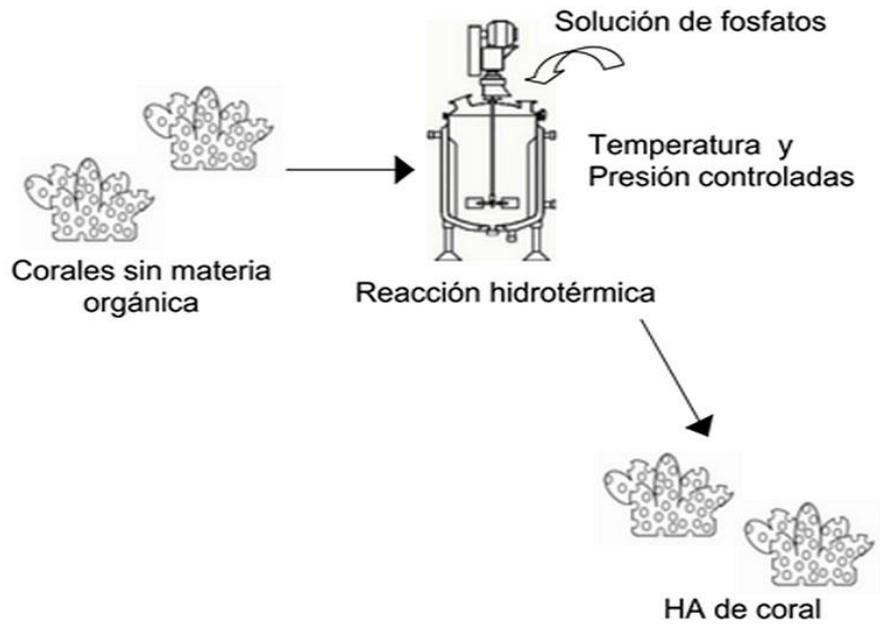


Fig. 7. Esquema de fabricación de cuerpos porosos de hidroxapatita usando corales y/o esponjas marinas. Tomado de [72].

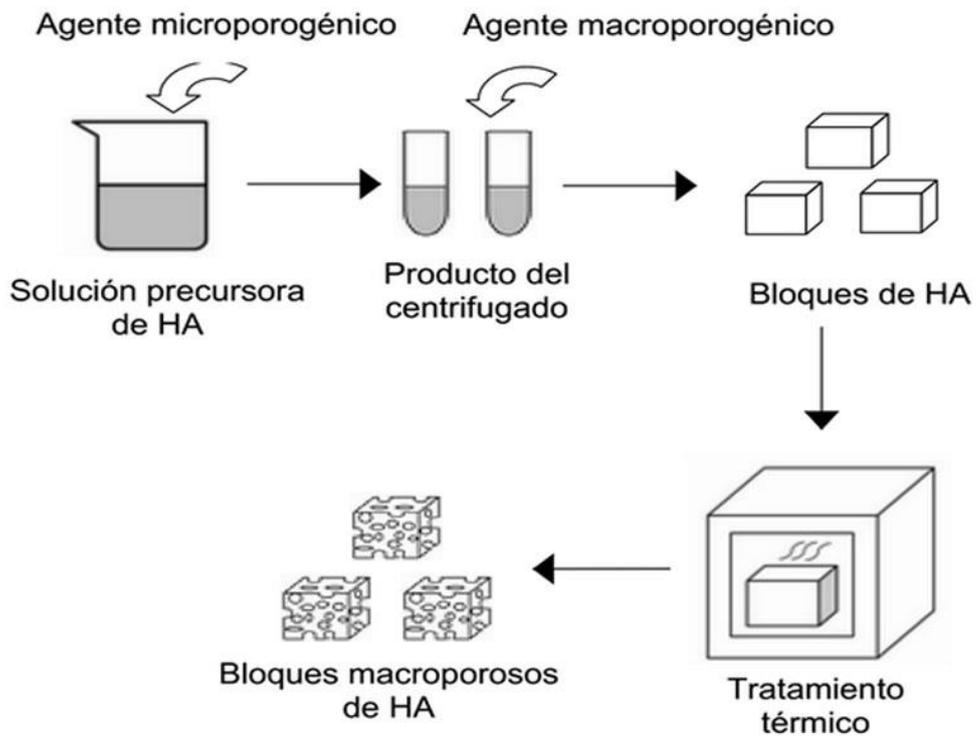


Fig. 8. Esquema de fabricación de cuerpos porosos de hidroxapatita usando la técnica de bloques con porosidad inducida. Tomado de [72].

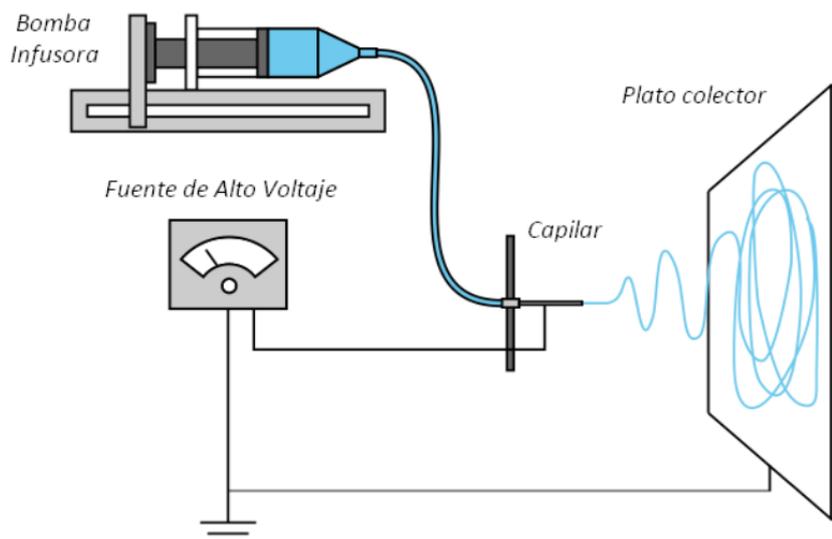


Fig 9. Ensamble básico del sistema de electrohilado. Tomado de [75].

Las etapas fundamentales del proceso de liofilización son: *La congelación*: el producto es congelado, es una condición necesaria para que permanezca seco a baja temperatura. *El vacío*: después de la congelación, el producto es colocado en un compartimiento donde se hace el vacío. Esto permite al solvente congelado en el producto, vaporizarse sin pasar a través de la fase líquida, en un proceso conocido como sublimación. Durante el proceso de congelamiento, se da una nucleación de cristales de hielo desde la solución, los cuales crecen a lo largo de las líneas de los gradientes térmicos [77]. La remoción del hielo mediante la técnica de liofilización genera un material poroso donde el tamaño promedio del poro puede ser controlado mediante la variación de la tasa de congelamiento (ver Fig. 10).

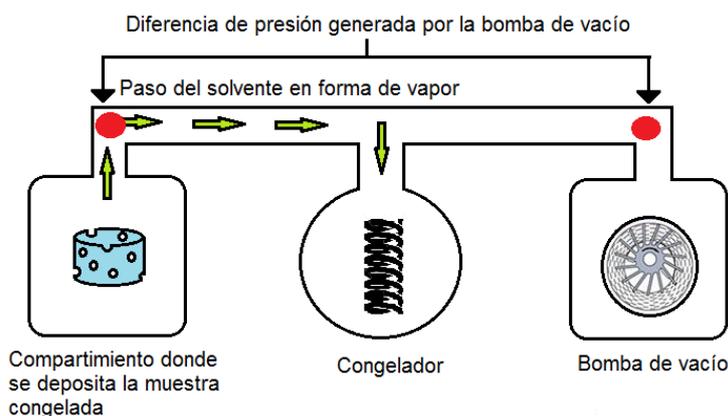


Fig. 10. Esquema básico del sistema de liofilización. Autoría propia.

Las propiedades mecánicas de los scaffolds obtenidos mediante esta técnica dependen principalmente del tamaño y de las orientaciones de los poros, la geometría de gradientes térmicos durante la congelación regula la orientación de los poros y la conectividad. Por lo tanto, la microestructura del scaffold dependerá de la forma del molde utilizado para la congelación y de la temperatura del congelador. El beneficio de este proceso es que los scaffolds se pueden fabricar con

diversas geometrías, y sus poros tubulares se pueden controlar. Al variar las condiciones de congelación, el tamaño de poro puede oscilar entre 1-250 μm , dimensiones que son relevantes para la adhesión celular y la proliferación de los diferentes tipos de células [78], [79]. Además permite obtener alta porosidad (90%) y poros interconectados [80], [71].

4.4. BIOFUNCIONALIZACIÓN DE POLÍMEROS

La adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular dentro de un scaffold requieren que este tenga un balance adecuado entre las propiedades mecánicas, estructurales y químicas, que no siempre es fácil de lograr, pero que permite que la asimilación de los implantes sea rápida y efectiva. La nanobiotecnología ofrece un abanico de herramientas que permiten la biofuncionalización de los biomateriales donde estructuras bioactivas son incorporadas de forma organizada y precisa [81].

Para la biofuncionalización, las proteínas provenientes de la matriz extracelular han jugado un papel importante, las de mayor interés han sido el colágeno, fibronectina, elastina, fibrina, lamininas y vitronectina [82], [83], [84], también, se han explorado otras proteínas como la queratina, la seda, las proteínas de los mejillones y factores de crecimiento de diverso tipo (BMPs, FGFs, VEGFs, EGFs) [85], [86], [87], [83], [88], [89], [90], los cuales pueden ser incorporados a la superficie de los materiales mejorando su integración con el tejido.

Debido a sus propiedades, los metales y los polímeros son los materiales que más requieren procesos de biofuncionalización para incrementar su bioactividad, el titanio y sus aleaciones han sido los metales que se han biofuncionalizado con más regularidad en los últimos años, donde se ha incursionado en la inmovilización de péptidos RGD sobre su superficie para mejorar la osteointegración del mismo [91], o en la adhesión de oligonucleótidos con el mismo objetivo ya que los oligonucleótidos permiten la liberación lenta de factores de crecimiento, incrementando la proliferación de células del estroma de médula ósea sobre su superficie y por consiguiente incrementan la actividad osteogénica [92].

Por otra parte en los materiales poliméricos, las técnicas de biofuncionalización varían con respecto a los metales pero tienen el mismo objetivo, en algunas ocasiones solo basta con modificar la superficie (sin agregar proteínas) para obtener el efecto deseado, ejemplo de ello es el uso de ácido cítrico para modificar la superficie de una película de quitosano, el cual promueve significativamente la biomineralización de los sustratos a base de quitosano facilitando la adhesión y proliferación de osteoblastos [93], otro tipo de biofuncionalización implica la utilización de proteínas, usualmente el polímero necesita una modificación superficial previa, en un estudio hidrolizaron PLGA con NaOH para aumentar los grupos carboxilo e hidroxilo sobre la superficie del polímero e inmovilizar colágeno, demostrando que esto aumentaba la respuesta bioactiva de la superficie [94].

Sin importar el mecanismo de inmovilización que se use, es de vital importancia asegurar la integridad de las proteínas (conformación y topología) una vez hayan sido ancladas, ya que es posible que sufran cambios como la desnaturalización o se pueden aglomerar [95], [96]. Estos cambios podrían disminuir la actividad de la proteína e incluso generar respuestas inmunogénicas que llevan a condiciones clínicas negativas.

4.4.1. TIPOS DE FUNCIONALIZACIÓN DE PHA

La funcionalización de polímeros, si bien es un concepto asumido como el proceso químico mediante el cual se incorporan grupos funcionales a cadenas poliméricas, tiene como objetivo la modificación de las propiedades superficiales del polímero [97], la biofuncionalización se centra en las modificaciones superficiales del polímero con objetivos biológicos, y para efecto de este proyecto se asume como biofuncionalización, cualquier tipo de modificación, sea química o no, que permita cumplir tal fin.

Los polímeros en general tienen poca hidrofiliidad y carecen de sitios de reconocimiento celular por lo que su afinidad con las células es pobre, mejorar la reactividad de su superficie implica entonces aumentar su hidrofiliidad o generar puntos de unión celular [98]. Los PHAs por ejemplo son hidrofóbicos y tienen baja energía superficial, por lo que los tratamientos superficiales permiten mejorar las propiedades de contacto y conservar las propiedades estructurales del polímero [99].

La modificación superficial de los polímeros depende de la naturaleza de estos, en la literatura se pueden encontrar cuatro principales tipos de modificación del PHA.

4.4.1.1. Producción controlada

Este tipo de modificación (realizada principalmente en los 90's) aprovecha la característica natural del polímero para obtener variaciones en su composición, ya que las características químicas del PHA dependen del sustrato utilizado en su producción y de la cepa bacteriana lo cual facilita la producción de cientos de polímeros diferentes (ver Fig. 11) [99], [100], [101].

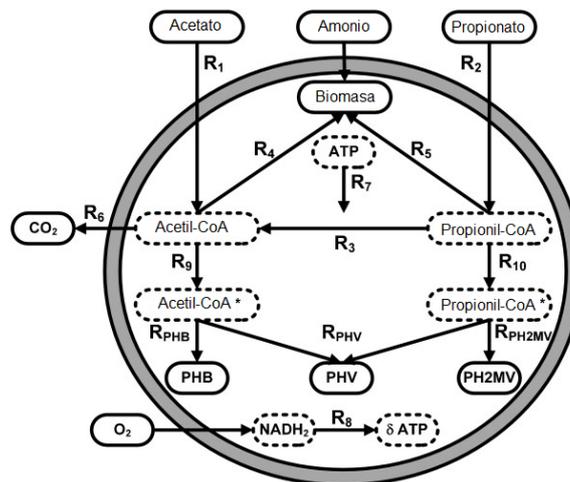


Fig. 11. Ruta metabólica de la producción de PHA, donde se observan reacciones metabólicas, sustrato y productos en las líneas continuas y metabolitos en las líneas discontinuas, implicados en la producción de PHA de cultivos mixtos. Modificado de [102].

4.4.1.2. Modificación química

Para realizar dicha biofuncionalización autores como Masaeli et al (ver Fig. 12), sugieren el uso de reactivos químicos para inducir una hidrólisis alcalina en la superficie y exponer grupos funcionales que permitan la posterior adición de biomoléculas como colágeno y péptidos [98].

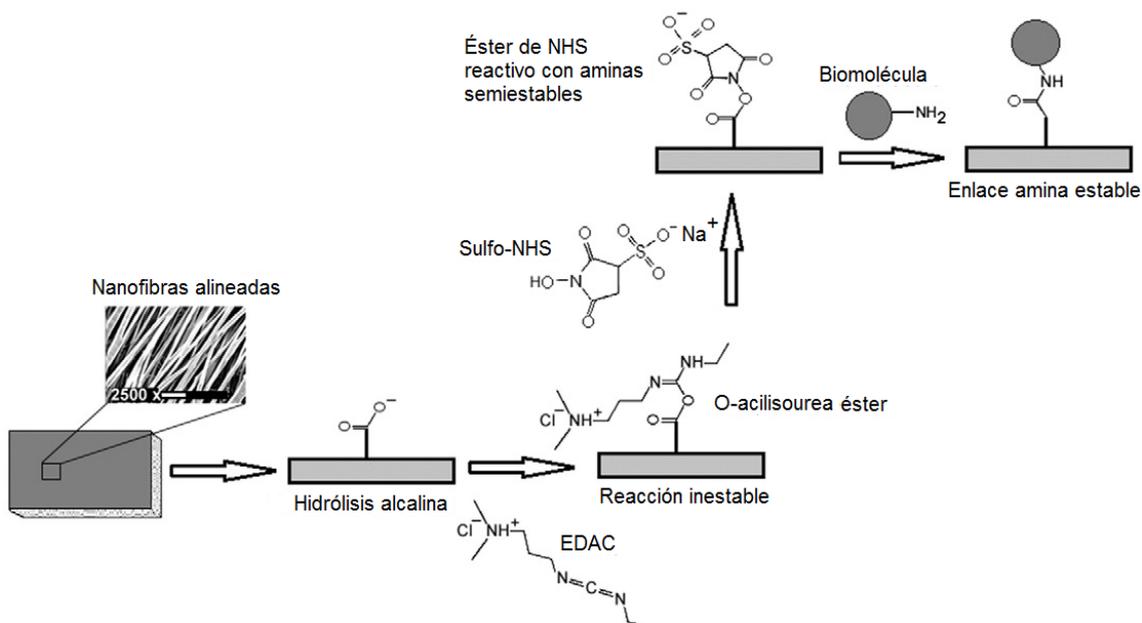


Fig. 12. Representación esquemática de la propuesta de biofuncionalización de Masaeli et al. donde se observa la unión covalente de biomoléculas en la superficie de scaffolds de nanofibras de polihidroxitirato y polihidroxitirato-valerato. Modificado de [98].

El uso de radiación UV es otro método basado en procesos químicos fotoinducidos, que aprovecha ciertos grupos funcionales del polímero fotoreactivos para realizar eliminaciones o adiciones químicas específicas, que contribuyen a la modificación de propiedades como la humectabilidad, biocompatibilidad o degradación, por ejemplo, la humectabilidad de PHB aumenta cuando es bombardeado con iones carboxilo de alta energía [99] (ver Fig. 13).

Norrish I

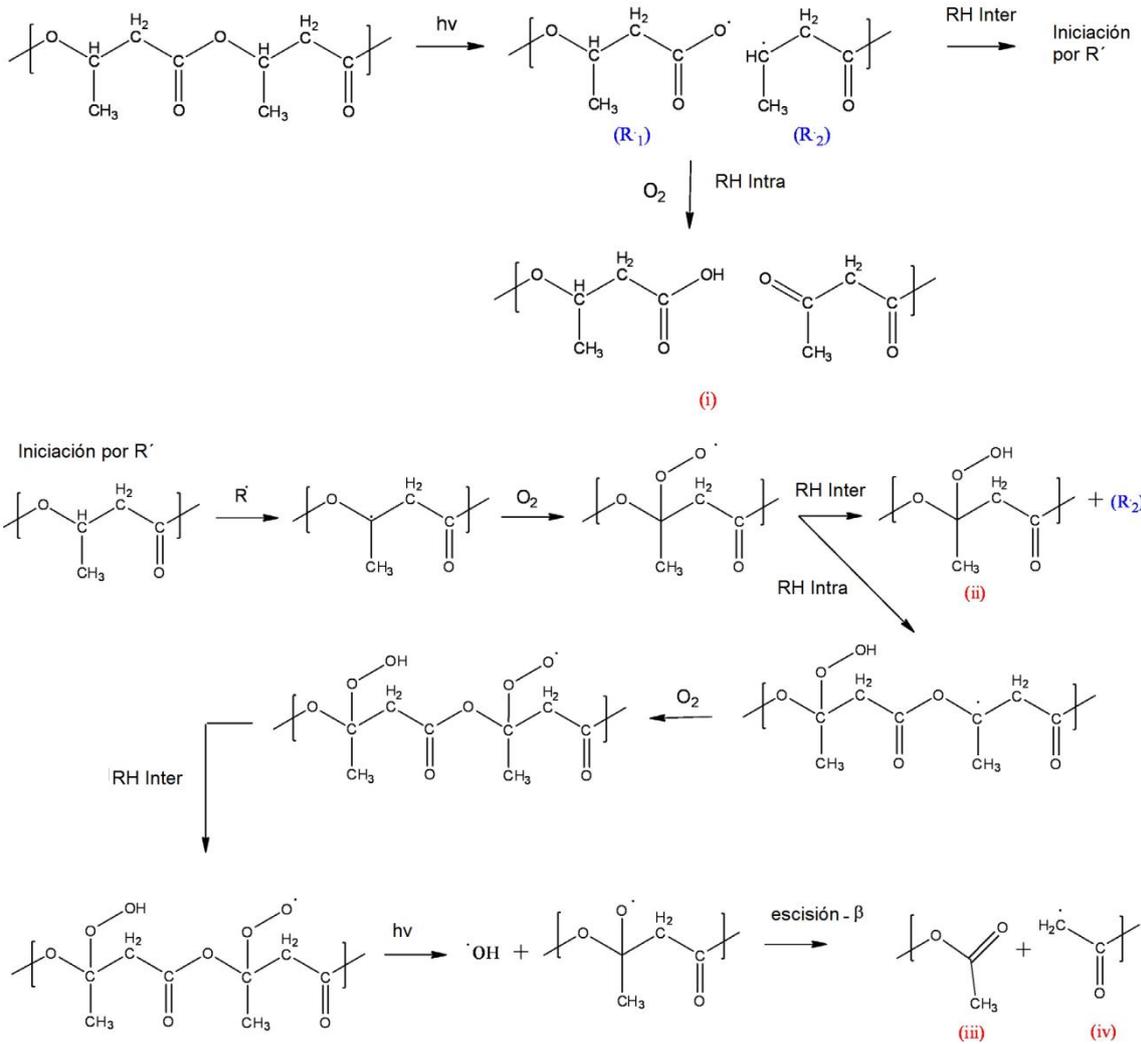


Fig. 13. Posible reacción fotoquímica propuesta por Kessler et al. en la modificación superficial de polihidroxitbutirato con ultravioleta. Modificado de [99].

4.4.1.3. Modificación por plasma

El uso de plasma para modificar la superficie de los polímeros se desarrolló para modificar algunas propiedades de estos, como el alto coeficiente de transmisión de vapor de agua que poseen principalmente los polímeros biodegradables y que puede ser un obstáculo para algunas aplicaciones como el empaquetamiento de alimentos, para ello la técnica del plasma consiste en la deposición de un recubrimiento sobre la superficie del polímero, el cual dependerá de la naturaleza del polímero base ya que se debe garantizar una adecuada fijación de la capa y del propósito del recubrimiento [103] (ver Fig. 14).

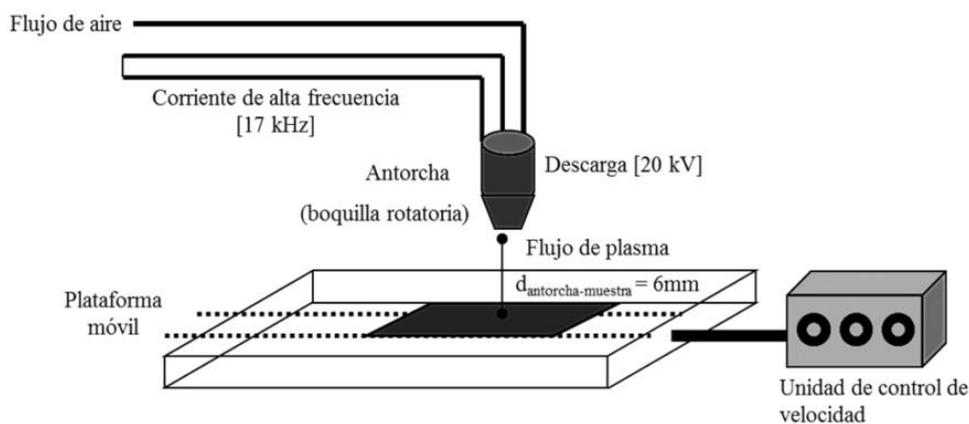


Fig. 14. Esquema del funcionamiento de una antorcha de plasma atmosférico. Tomado de [104].

4.4.1.4. Modificación genética

La modificación genética se basa principalmente en la identificación, aislamiento y clonación de genes responsables de la fabricación de PHA, estos genes son implantados en otras bacterias con el objetivo principal de aumentar la productividad del polímero (ver Fig. 15) [105].

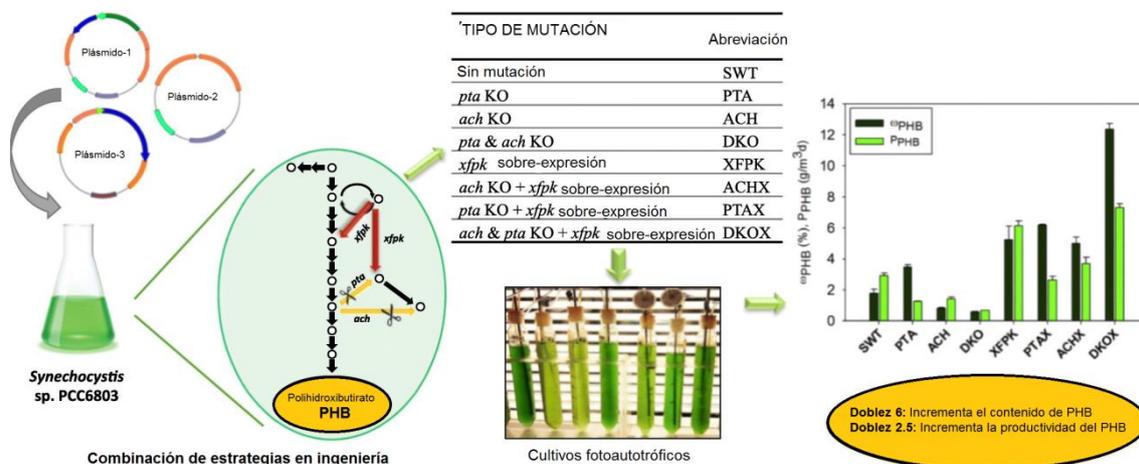


Fig. 15. Abstract de la investigación publicada por Carpine et al. donde se observa el efecto de varias modificaciones genéticas hechas sobre la cepa *Synechocystis sp.* PCC6803 en la producción de PHB. Modificado de [106].

4.5. ESTADO DEL ARTE DE SCAFFOLDS DE PHA BIOFUNCIONALIZADOS

La biofuncionalización de PHA con miras en el mejoramiento de sus propiedades biológicas para su potencial aplicación en la IT es un desarrollo reciente, sin embargo, la producción controlada de PHA ha sido investigada desde finales de los 80's y con ella se desarrolla un tipo de biofuncionalización, ya que en dicha producción se varían las condiciones de cultivo y la bacteria utilizada para obtener variaciones en las propiedades del PHA producido [100], [101], [107], [108], [109], [110]; existen otros tipos de biofuncionalizaciones conocidas por constituir modificaciones intencionales en el PHA o en su misma producción, ya mencionadas, como lo son la utilización de plasma, reacciones químicas y modificaciones genéticas [98], [99], [103], [111], [112].

Las publicaciones científicas de principios de los 90's, sobre PHA en general no tenían como objetivo principal la relación entre las variaciones de las propiedades del polímero con los cambios en el sustrato y el tipo de bacteria utilizada, sin embargo, esta relación se hizo evidente en muchas de ellas.

En trabajos como el de W. J. Page (1992) se estudió la relación entre el uso de la melaza de remolacha como sustrato y la bacteria *Azotobacter vinelandii* UWD con el aumento del rendimiento en la producción del PHA, no obstante, encontró una relación entre el uso de este sustrato con un agregado de valerato en la formación de copolímeros que contienen β -hidroxivalerato [100].

De igual forma Fidler y Dennis, en 1992 trabajaron sobre el aumento de la eficiencia de producción de PHA por parte de la bacteria *E. coli*, y demuestran que con esta bacteria es posible obtener un PHA específico denominado poli- β -hidroxibutirato (PHB), además que con una cepa diferente de la bacteria se puede producir poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHB-co-3-) [101]. De esta manera, otros autores lograron asociar sustratos o bacterias a un tipo de PHA específico como se observa en la Tabla 3.

El tipo de cepa empleada y el tipo de sustrato implementado en la producción del PHA fue la primera estrategia utilizada para modificar las propiedades de este. Actualmente se sigue utilizando esta estrategia, pero con el objetivo propio de obtener un efecto en las propiedades del polímero.

En años más recientes la modificación del PHA basada en la producción de las células bacterianas se realiza con el objetivo claro de generar la modificación, ejemplo de ello es el trabajo de Hyakutake et al. quienes utilizaron una cepa de *E. coli* denominada *JM109* cultivada en un medio estándar para esta bacteria y luego fue cultivada en un medio deficiente de glucosa y carbono para estimular la producción de PHA, además a este medio se le agregaron diferentes tipos de alcoholes para inducir cambios en el polímero, según los resultados una de las modificaciones más significativas es el descenso en el peso molecular en el polímero obtenido debido a un proceso de alcoholólisis inducido por una enzima de PHA clase *IV* en presencia de alcohol [113].

Bera et al. sembraron *Halomonas hydrothermalls* en un medio de cultivo compuesto de residuo de biodiesel de *Jatropha*, se adicionó además ácido levulínico derivado de algas marinas (ALDAM) que contenía ácido fórmico, azúcares

residuales y minerales disueltos. El ALDAM incrementó la producción de PHA y permitió la incorporación de 3-hidroxivalerato en el PHA producido [114].

Tabla 3. Algunas investigaciones publicadas al inicio de la década de los 90's donde se evidencia la relación entre las propiedades del PHA y el sustrato y bacteria utilizadas en la producción del mismo.

Autores y año	Precursor (bacteria o/y sustrato)	Producto	Referencia
G. W. Haywood et al. en 1989	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Poli-3-hidroxitirato (PHB) o polihidroxicanoato (PHA) que contiene sólo unidades 3-hidroxitirato (HB) y 3-hidroxivalerato (HV).	[107]
D. R. Williams et al. en 1994	<i>Rhodococcus ruber</i> y ácido succínico	3-hidroxivalerato (3HV)	[108]
E. Y. Lee en 1995	<i>Agrobacterium sp. SH-1</i> y GW-014 con glucosa, xilosa o sacarosa	P (3HB-co-3HV)	[109]
E. Y. Lee en 1995	<i>Agrobacterium sp. SH-1</i> y GW-014 con hidroxicanoato libre de nitrógeno	3HB, 3HV y 4-hidroxitirato (4HB)	[109]
Y. Poirier en 1995	Células vegetales transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que expresan dos genes de la bacteria <i>Alcaligenes eutrophus</i> .	poli ([r] - (-) - 3-hidroxitirato de alto peso molecular (PHB),	[110]

Kourmentza y Kornaros utilizaron un cultivo microbiano mixto obtenido de lodos activados de la planta de tratamiento de aguas residuales de Patras (Grecia) y las sembraron en un medio de cultivo que fue inicialmente enriquecido con carbono y nitrógeno, y luego se limitó la disponibilidad de estos elementos para seleccionar las bacterias productoras de PHA, una vez seleccionado el cultivo se utilizaron ácidos grasos de cadena corta como sustrato y se varió el pH; de este estudio se concluyó que bajo las condiciones establecidas el pH de 6.9 era el ideal para la producción de PHA [115].

Otro tipo de modificación que se encuentra en la literatura para biofuncionalizar el PHA consiste en hacer una modificación química posterior a la extracción del polímero de su fuente bacteriana, uno de estos procesos fue realizado en 2014 por Masaeli et al. quienes fabricaron scaffolds de PHB/PHBV con la técnica de electrohilado y los biofuncionalizaron sometidos a NaOH, solución MES, EDAC, sulfo-NHS, colágeno y péptidos mejorando la interacción de los scaffolds con las células de Schwann [98].

Kessler et al. utilizaron otro método de modificación química, sometieron películas de polihidroxibutirato (PHB) a luz ultravioleta con presencia de oxígeno, este tratamiento permitió incrementar los grupos carbonilos en la superficie y su hidrofiliidad, de manera que el polímero se hizo más sensible a la degradación por hongos entomopatógenos. Los investigadores aseguraron que mediante esta técnica es posible controlar la tasa de degradación del polímero [99].

Dong et al. recubrieron películas de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (PHBHHx) y poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-valerato) (PHBV) con una combinación de proteínas PhaP-RGD, las cuales aumentaron el comportamiento hidrofílico de la superficie del polímero y con ello aumentaron la unión y la tasa de crecimiento de fibroblastos de ratón depositados en dicha superficie. Para lograrlo, depositaron las proteínas sobre el polímero y las incubaron durante 12 horas a 4 °C, para favorecer la unión hidrófoba entre la película y las proteínas [116].

En un trabajo similar al anterior, Xie et al. fabricaron scaffolds de PLA y dos tipos de PHB, el PHBVHHx y el poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-hexanoato) (P3HC3H), los cuales fueron sometidos a un proceso de biofuncionalización con dos proteínas PhaP-IKVAV y PhaP-RGD extraídas de un gen de *Aeromonas hydrophila*. Los resultados arrojaron que ambas proteínas mejoran la adhesión, la proliferación y la diferenciación de células neurales de rata a corto plazo, siendo significativamente mayor la adhesión y proliferación celular en los scaffolds fabricados con PHBVHHx y la diferenciación celular neuronal y el crecimiento de neurita fue mayor en los scaffolds de PLA, ambos resultados fueron obtenidos con la proteína PhaP-IKVAV [117].

El tratamiento con plasma, es el tercer método de biofuncionalización del PHA expuesto en el presente trabajo, consiste básicamente en inducir modificaciones superficiales en los polímeros a través del bombardeo de iones sin causar modificaciones significativas en las cadenas poliméricas. Belard et al. por ejemplo, en 2013, utilizaron PHBV entre otros polímeros para fabricar películas y luego biofuncionalizarlas con una capa de plasma-acetileno. Dentro de los resultados los autores no realizaron pruebas biológicas que validen la activación de las películas a través de la biofuncionalización [103].

Más tarde en 2015 Syromotina et al. fabricaron películas de PHB y para biofuncionalizarlas las sometieron a una atmósfera de O₂ y gas NH₃ e indujeron una descarga de plasma. Se concluyó que las películas tratadas con plasma-amoniaco promovieron la proliferación y unión celular [111].

Un año después Syromotina et al. repitieron el experimento anterior utilizando una película de P3HB, y descubrieron que tanto la química superficial como los cambios de rugosidad superficial causados por el tratamiento con plasma afectaron la humectabilidad superficial, igualmente aumentó el ángulo de contacto con el agua y disminuyó la energía libre superficial, al tiempo que aumentó el componente polar de la energía superficial, incrementando significativamente la adhesión y proliferación celular [118].

González et al. Modificaron la superficie de un poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-valerato) con injertos de N-hidroxietilacrilamida polimerizada con radiación plasmática, ocasionando un incremento en la hidrofiliidad y en la degradación de la película [119].

Otro método usado para biofuncionalizar el PHA encontrado en la literatura consiste en la modificación genética de las bacterias productoras del polímero, de manera que es posible modificar la estructura química de este desde su fabricación en el interior de la célula. Ejemplo de esto, es el trabajo de Arikawa et al. quienes en 2016 analizaron el efecto de nueve genes de *Aeromonas caviae* expresados en cepas recombinantes de *Cupriavidus necator* H16, comparándolos con la producción de PHA de *C. necator*, en este estudio encontraron que el gen denominada *PhaZ6* podía producir PHBHHx de ultra alto peso molecular y que la delección de los genes *PhaZ1* y *PhaZ2* reduce la producción de PHA, principalmente [112].

Otros estudios genéticos de la producción de PHA tienden a centrarse en la identificación, aislamiento y/o clonación de los genes encargados de la producción de PHA en las bacterias, tal es el caso del trabajo de Tai et al. quienes clonaron el gen *phaC* encontrado en una piedra caliza y lo expresaron en *Cupriavidus necator*, obteniendo una cantidad significativa de PHA acumulada en la bacteria [120], de igual forma Satoh et al. clonaron una porción del gen de la biosíntesis de PHA perteneciente a la cepa *Bacillus sp INTO05*, el cual contenía tres genes (*phaR*, *-B* y *-C*) y lo expresaron en *E. coli* recombinante, logrando identificar actividad de PHA perteneciente a los tres genes [105].

Algunos estudios combinan más de una técnica de biofuncionalización para obtener propiedades específicas, ejemplo de esto se tiene la investigación realizada por You et al., quienes en 2011 fabricaron scaffolds hidrófobos de PHBHHx por el método de inducción de separación de fases térmica y luego los biofuncionalizaron con un péptido denominado PhaP_RGD, el cual es obtenido de *E. coli BL21* recombinante; los resultados arrojaron una mejor adhesión, crecimiento y diferenciación celular en los scaffolds recubiertos por el péptido que en los no recubiertos. Además, al evaluarlos sobre células de médula ósea humana, se incrementó la interacción célula-matriz por efecto de los péptidos utilizados en la biofuncionalización [7].

En la investigación de Dong et al. se fabricaron películas de PHA e igualmente las biofuncionalizaron con una proteína de fusión llamada Pha-KQAGDV obtenida de *E. coli* recombinante, el proceso consiste solo en sumergir las películas en una solución que contiene la proteína. Los resultados de este trabajo arrojan que en las películas recubiertas disminuye el grado de hidrofobicidad natural del PHA y por tanto aumenta la biocompatibilidad de la película y su capacidad para promover la unión y la proliferación celular [6].

Höfer et al. expresaron el gen *phaC2* de *Pseudomonas fluorescens GK13* en la bacteria recombinante *Methylobacterium extorquens*, y alimentaron su medio de cultivo con metanol y ácido 5-hexenoico (C6), se comprobó que el C6 reducía la producción de biomasa y el rendimiento total del PHA, sin embargo, permitía la aparición de abundantes grupos funcionales en el polímero, en especial el enlace C=C, la incorporación de 3-hidroxihex-5-enoato y del 3-hidroxihexanoato en las cadenas, debido a los sustratos utilizados, produjo mayor estabilidad térmica y temperaturas de fusión de 139 °C a 168 °C del PHA permitiendo el autoclavado y posibilitando su uso de este polímero a nivel médico [121].

Nkrumah y Scholz biofuncionalizaron PHA químicamente, pero realizaron una modificación inicial durante el proceso de biosíntesis para permitir la biofuncionalización química posterior; en esta investigación se produjeron poli (3-hidroxinanoato-co-3-hidroxi-11-bromoundecanoato) (PHNUBr) y poli (3-hidroxinanoato-co-3-hidroxi-10-

undecinoato) (PHNUD), usando *Pseudomonas oleovorans*, durante el proceso de biosíntesis se adicionaron unidades repetidas bromadas y de alquino (38.5 % y 50 % respectivamente) para generar un precursor de terminales azida que permitieran la reacción química posterior, una vez extraído el PHA de la célula se realizaron modificaciones químicas con azida-alquino catalizada con cobre para unir benzoato de propargilo y 2-azidoacetato de metilo a los PHA, y con azida-alquino para unir el (1R, 8S, 9s) –Biciclo-non-4-in-9-ilmetanol (BCN-OH) al PHA [122].

Estos estudios entre otros, muestran la gran flexibilidad de conformación y de modificación de propiedades que tiene el PHA, esto sumado a su capacidad de degradación sin dejar rastros tóxicos lo convierte en un candidato ideal para su uso en IT. Además el estado actual en cuanto al desarrollo de scaffolds de PHA biofuncionalizados para ingeniería de tejidos en Colombia, es aún incipiente lo que hace necesario realizar estudios en esta temática tan novedosa que representa resultados prometedores en el área de los biomateriales.

4.6. SCAFFOLDS DE PHA Y OTROS POLÍMEROS

Son pocas las investigaciones realizadas en la fabricación de scaffolds de PHA combinado con otros polímeros, en general, se realizan mezclas de diferentes tipos de PHA [98], [123], [69], [8], aun así algunos autores han investigado el efecto de la inclusión de otros polímeros en la fabricación de scaffolds de PHA.

Shum-Tim et al. fabricaron scaffolds tubulares de PHA-PGA colonizados por células vasculares autólogas para sustitución de vasos sanguíneos, en el experimento, injertaron los scaffolds en segmentos aórticos abdominales de corderos y obtuvieron un material que imitaba el comportamiento mecánico de la aorta natural, además no se presentaron aneurismas hasta el momento del sacrificio de los animales [124].

Lemechko et al. mezclaron PHA con un exopolisacárido marino similar al glicosaminoglicano EPS HE800, con el objetivo de mejorar la adhesión celular ya que el HE800 es hidrofílico (el PHA es hidrofóbico), para garantizar el acoplamiento de ambos polímeros activaron los grupos terminales carboxílicos del PHA lo que permitió la unión de estos con grupos hidroxilo del HE800, los scaffolds se produjeron por electrohilado y se observó una mejora en la adhesión y crecimiento de células madre mesenquimales humanas con respecto a scaffolds fabricados solo con PHA [125].

Recientemente Gonzalez et al. utilizaron una mezcla comercial de polilactida termoplástica (PLA) con PHA, el PHA estaba constituido por unidades de 3-hidroxibutirato y una pequeña cantidad de unidades de 3-hidroxivalerato; los investigadores fabricaron scaffolds con una impresora 3D y compararon los resultados obtenidos con scaffolds de PLA, en la investigación descubrieron que las propiedades mecánicas y de degradación dependen en gran medida de la técnica de impresión utilizada, pero la combinación de polímeros incrementó la estabilidad térmica del material y fue de vital importancia en la biocompatibilidad hallada tras cultivar células HEK293, potenciando así su uso en la IT [67].

4.7. SUSTITUTOS DE CARTÍLAGO ARTICULAR

Por las cualidades ya antes mencionadas, el PHA es un excelente candidato para regeneración de todo tipo de tejidos, en especial de tejidos blandos, el cartílago por ejemplo podría verse beneficiado por el uso de PHA en su proceso de regeneración ya que al ser avascular no puede regenerarse fácilmente, incluso ante daños pequeños.

4.7.1. Generalidades

El cartílago es un tejido avascular compuesto de matriz extracelular y células. La matriz constituye más de 95 % del volumen total del cartílago, es sólida, firme y flexible, es rica en glucosaminoglucanos lo que permite la difusión de nutrientes a falta de vascularización [126]. Su composición consiste básicamente en colágeno tipo II (en forma de fibras), colágeno tipo IX (une las fibras), además de otros componentes como colágeno tipo X y XI, hialuronano y proteoglicano [127].

Las células propias del cartílago son los condrocitos (ver Fig. 16) y se ocupan del mantenimiento de éste, los condroblastos son células que si bien no se encuentran inmersas en el cartílago son las responsables de la producción de este [128], la morfología de estas células incluye un retículo endoplásmico altamente desarrollado, un aparato de Golgi grande y múltiples vesículas, lo cual indica una importante actividad excretora [127].

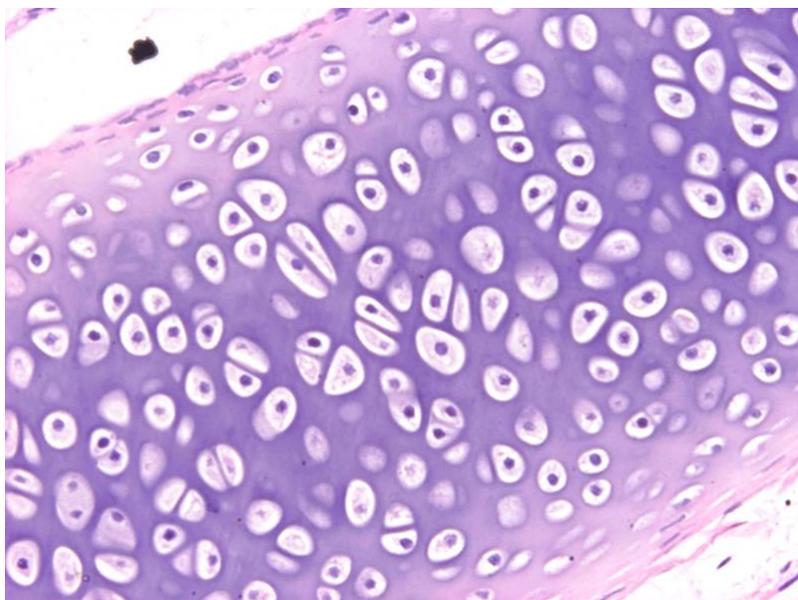


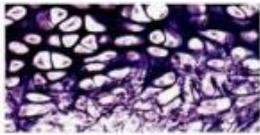
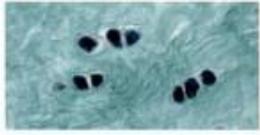
Fig. 16. Condrocitos inmersos en su matriz extracelular. Tomado de [129].

4.7.2. Funciones

La función básica del cartílago es de sostenimiento mecánico del cuerpo, pero las funciones específicas dependen del tipo de cartílago, ya que poseen diferentes propiedades (ver Tabla 4) [127].

4.7.3. Tipos de cartílago

Tabla 4. Tipos de cartílago humano y sus principales características [126].

Características	Cartílago Hialino	Cartílago Elástico	Cartílago Fibroso
Fotografía			
Ubicación	Se encuentra en el tejido esquelético fetal, discos epifisarios, superficie articular de la diartrosis, placas cartilaginosas bronquiales, anillos traqueales, laringe, cartílagos costales y de cavidades nasales.	Se encuentra en la epiglottis, cartílagos corniculados y cuneiformes, pabellón auricular, trompa de Eustaquio y conducto auditivo externo.	Se encuentra en meniscos, articulación de la muñeca, inserciones tendinosas, sínfisis pubiana, discos intervertebrales y articulares.
Función	Base para el desarrollo óseo fetal, osificación endocondral y crecimiento de huesos largos, resiste compresión, provee amortiguación, posee superficies lisas para el contacto de las articulaciones en baja fricción y provee sostén estructural del aparato respiratorio.	Provee sostenimiento flexible.	Altamente resistente a deformación por fuerzas externas.
Tipos celulares		Condrocitos, condroblastos.	
Principales componentes de la matriz extracelular	Fibrillas de colágeno tipo II y agrecano (proteoglucano)	Fibrillas de colágeno tipo II, agrecano (proteoglucano) y fibras elásticas.	Fibrillas de colágeno tipo I y II y versicano (proteoglucano)
Reparación	Capacidad muy limitada (casi nula), tiende a generar cicatrices de tejido fibroso.		

4.7.4. Autoreparación del cartílago articular

El cartílago articular es un tipo de cartílago hialino con ausencia de pericondrio, que puede soportar esfuerzos mecánicos intensos y cíclicos, pero que es incapaz de autoreparar aún las lesiones más leves debido a la ausencia de vascularización, inmovilidad de condrocitos y a la poca proliferación de estos. De hecho la única autoreparación que puede realizar el cartílago hialino es aquella donde la lesión involucra el pericondrio, el cual no existe en el cartílago articular [126].

4.7.5. TIPOS DE REEMPLAZOS

La deficiente autoreparación del tejido cartilaginoso impulsa el uso de tratamientos quirúrgicos que faciliten su reparación y por lo tanto la recuperación de las funciones del cartílago. Las diferentes técnicas que han sido utilizadas en la reparación de cartílago pueden concentrarse en tres grupos [130]:

4.7.5.1. Técnicas reparadoras

Estas técnicas se refieren a tratamientos mecánicos sobre el cartílago que favorecen la formación de fibrocartílago. Estas son:

4.7.5.1.1. Microfracturas

La técnica consiste en perforar la superficie del cartílago para producir un sangrado que transporte células madre mesenquimales a la zona de la lesión, las cuales tienden a diferenciarse en fibrocondrocitos y promueve la reparación con colágeno tipo I, además se ha demostrado que solo es efectiva para lesiones pequeñas ($>1.5 \text{ cm}^2$) [130], [131], [132].

Álvarez et al. realizaron un estudio con 65 pacientes con lesiones en cartílago de rodilla tratados con microfractura en el Hospital Universitario Manuel Ascunse Domenech de la ciudad de Camagüey, Cuba. Las conclusiones de este estudio incluían las características más típicas de los pacientes en las cuales se presentan este tipo de lesiones; con respecto a la técnica utilizada para el tratamiento (microfractura) los autores concluyen que en general durante los primeros cinco años de la intervención los resultados fueron favorables en el 88.8 % de los casos, pero a partir de este tiempo, dicho porcentaje decrece, en especial en los pacientes con piernas arqueadas y lesiones superiores a 1 cm [131].

4.7.5.1.2. Desbridamiento artroscópico

En esta técnica se retira el tejido dañado articular, usualmente es un retiro superficial similar a una afeitada. Dicha técnica suele presentar malos resultados ya que tiende a incrementar la degeneración del cartílago. A pesar de dichos resultados esta técnica suele ser conveniente para pacientes de más de 60 años, con enfermedades degenerativas y muy baja demanda física [130], [133].

4.7.5.2. Técnicas reconstructivas

Estas técnicas consisten en reemplazar la zona afectada del cartílago y son:

4.7.5.2.1. Mosaicoplastia

Esta técnica también conocida como trasplante osteocondral autólogo, consiste en tomar injertos autólogos cilíndricos obtenidos de zonas que no soportan carga e implantarlos en la zona dañada, posee la ventaja de que el trasplante es propiamente cartílago hialino, sin embargo, su disponibilidad es limitada y genera morbilidad en la zona donante, sin contar con que las características mecánicas de dicho injerto difieren de las de la zona afectada ya que este se extrae de una zona con sollicitaciones mecánicas diferentes [130].

4.7.5.2.2. Trasplante de aloinjerto osteocondral

Esta técnica reconstructiva es similar a la mosaicoplastia pero el donante es cadavérico y el injerto se obtiene también con el hueso subcondral adyacente al cartílago, a nivel inmunológico dicho injerto cuenta con propiedades muy atractivas ya que al ser el cartílago un tejido avascular no requiere aporte sanguíneo y por tanto el riesgo de respuesta inmune del huésped es baja, además es ideal para daños de gran tamaño. A nivel clínico se han hecho algunos estudios y se han reportado tasas significativas de fracaso en lesiones bipolares (lado femoral y tibial) y artritis difusa, entre otros [130].

4.7.5.2.3. Implantes sintéticos

Estos implantes son fabricados de materiales biológicos como el colágeno, el quitosano y el alginato o de materiales sintéticos como el ácido poliláctico o el ácido poliglicólico, poseen la ventaja de no implicar un riesgo por transmisión de enfermedades, sin embargo, sus propiedades no son idénticas al tejido natural y no ha podido comprobarse su efectividad clínica [130].

Como implante sintético, los polímeros son los materiales utilizados por excelencia en la reparación de tejido cartilaginoso debido a sus propiedades en especial su comportamiento mecánico [51], [52], la IT en este aspecto apunta actualmente a fabricar implantes que promuevan a regeneración del tejido natural, y el éxito de esta campaña no solo se basa en la morfología del implante sino también en las propiedades de los materiales utilizados [71]. Los hidrogeles son un claro ejemplo de implantes sintéticos en la regeneración de cartílago, Gallego utilizó ácido hialurónico para fabricar hidrogeles y obtuvo muestras con poros interconectados, con un adecuado proceso de degradación, con baja viscosidad que les permite ser inyectados y con buena viabilidad celular [134].

4.7.5.3. Técnicas regeneradoras

El objetivo de estas técnicas es facilitar la regeneración del tejido del cartílago hialino. La técnica regeneradora más significativa es el trasplante de condrocitos autólogos.

4.7.5.3.1. Trasplante de condrocitos autólogos

El objetivo principal de esta técnica es reponer las células del cartílago, para ello y a diferencia de otras técnicas no interviene el hueso subcondral, ya que esto generaría una cicatriz (fibrocartílago) y afectaría el desempeño del cartílago en funciones como la absorción de impactos, para ello las células son aisladas de su matriz, expandidas en un cultivo y reimplantadas en la zona del defecto, esta técnica promete la formación de cartílago hialino funcional, sin embargo, requiere de al menos dos cirugías y es técnicamente muy exigente [130], [135].

El cartílago como tejido avascular no puede autorepararse con facilidad, es por ello que la IT constituye una alternativa para mediar en el proceso de reparación de forma más efectiva, en este sentido el PHA es un polímero natural cuyas propiedades lo convierten en un excelente candidato para regeneración de todo tipo de tejidos, en especial de tejidos blandos como el cartílago. El marco teórico presentado respalda el proceso experimental que se desarrolla a partir de este punto en el trabajo, el cual busca la creación de scaffolds biodegradables que estimulen la excreción de matriz extracelular por parte de las células de manera que el scaffold pudiera ser usado como potencial material de restitución de tejido cartilaginoso.

5. METODOLOGÍA

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación, se estableció una metodología basada en seis pasos, resumida en la Fig. 17

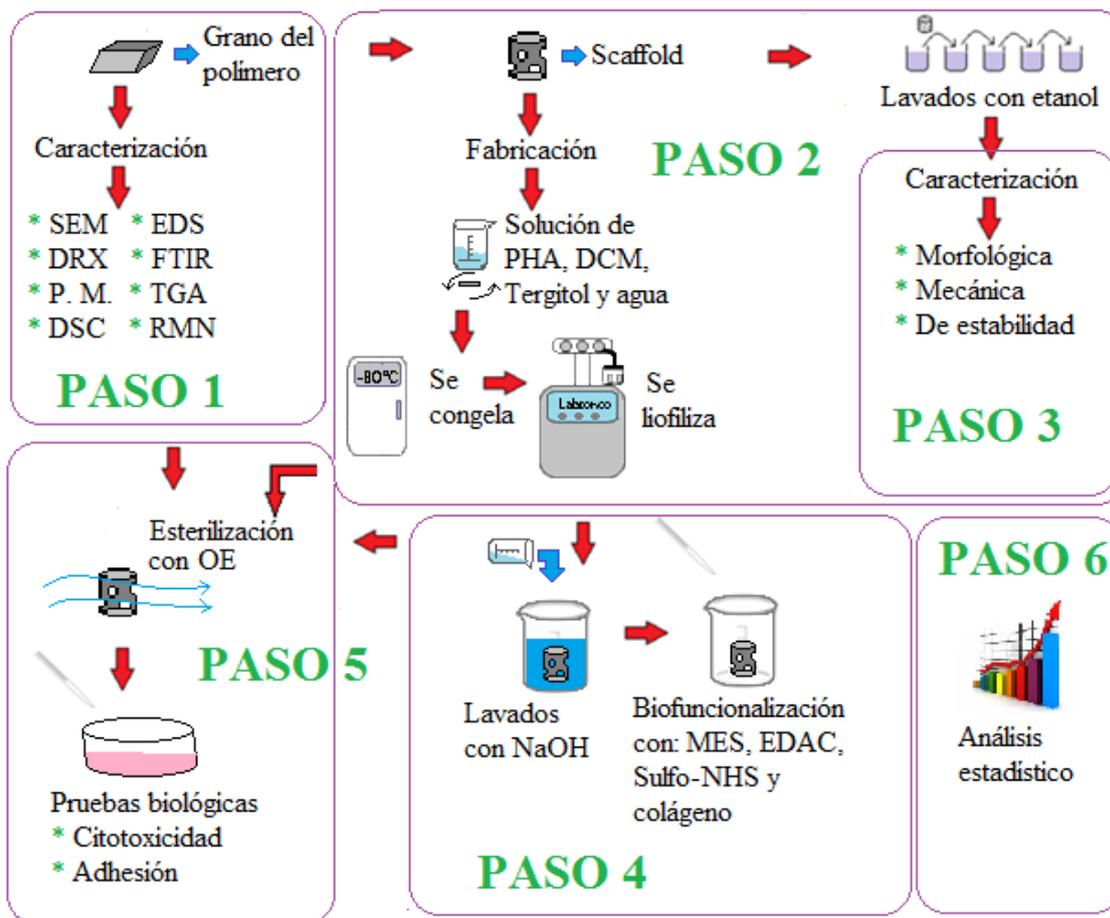


Fig. 17. Representación de los 6 pasos de la metodología. Autoría propia.

5.1. Paso 1: Caracterización de PHA

La caracterización del material es necesaria para comprender los fenómenos presentes en el desarrollo del proyecto de investigación, para ello se realizaron ocho pruebas sobre el polihidroxialcanoato.

- 5.1.1.** Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): este microscopio utiliza un haz de electrones en lugar del haz de luz utilizado en la microscopía óptica, lo que le permite aumentar la resolución de la imagen de las muestras observadas más allá de la capacidad misma de la luz [136], para este ensayo se utilizó un SEM JEOL JSM-6490LV, cuya resolución es de 3 nm, a una amplificación de 300 000X. Las muestras de PHA comercial se encontraban en presentación de pellet, de manera que el pellet se recubrió con oro para incrementar la conducción de electrones y se realizó la caracterización.

- 5.1.2.** Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS): este ensayo utiliza los electrones que el SEM bombardea sobre la muestra y recoge los rayos X refractados para la identificación de los elementos presentes en una región específica de la muestra [137], para este se utilizó el mismo equipo SEM utilizado para obtener la micrografía. La preparación de las muestras corresponde a la misma del SEM ya que ambas caracterizaciones se realizaron en el mismo ensayo.
- 5.1.3.** Difracción de Rayos X (DRX): esta técnica permite identificar las fases cristalinas de la muestra [138], en este proyecto se realizó el ensayo en un rango $2\theta = 5^\circ$ a 70° en un equipo Rigaku, Miniflex. Para la realización de este ensayo se utilizó un pellet de PHA sin ninguna modificación.
- 5.1.4.** Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR): esta técnica permite la identificación de los grupos funcionales presentes en la muestra, a través de las vibraciones de las moléculas [139], [140], en este proyecto se utilizó un equipo Infrarrojo de Transformada de Fourier, Marca Perkin Elmer, modelo Spectrumone, detector DTGS, y la muestra se preparó fabricando una pastilla de KBr en una relación aproximada de 100:1 mg, KBr-Muestra, a la cual se le aplicó una presión de 5 Ton.
- 5.1.5.** Peso Molecular por viscosimetría: para determinar el peso molecular de la muestra se utilizó un análisis de viscosidad debido a que se espera que la muestra tenga un peso molecular significativamente alto, para ello se prepararon soluciones de PHA a diferentes concentraciones (0.0021 g/ml; 0.0035 g/ml; 0.0040 g/ml; 0.0045 g/ml ; 0.0050 g/ml), en cloroformo grado analítico, se utilizó un viscosímetro de Ostwald sumergido en un baño de agua a 20°C , y para determinar el peso molecular se utilizaron los parámetros de Mark - Houwink: $K = 0.0151 \text{ mL/g}$ y $\alpha = 0.756$.
- 5.1.6.** Análisis Termogravimétrico (TGA): es una técnica en la cual la masa de una muestra es monitoreada en función del tiempo o la temperatura [141], para este proyecto el TGA se realizó en función de la temperatura, con un tamaño de muestra inicial de 15.847 mg, en un equipo TGA Q500 V20.13 Build 39 y una rampa de temperatura de 25°C a 900°C a una tasa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, en atmósfera de nitrógeno. La muestra consistió en pellets de PHA sin ninguna modificación.
- 5.1.7.** Calorimetría de Barrido Diferencial (DSC): es una técnica en la cual la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia es monitoreada en función del tiempo o de la temperatura [142], para este proyecto el DSC se realizó en función de la temperatura, con un tamaño de muestra de 7.889 mg, en un equipo DSC Q200 V24.10 Build 122, una rampa inicial de 25°C a 180°C y de 180°C a -90°C para borrar la memoria del material y eliminar agua e impurezas y una rampa de -90°C a 200°C y de 200°C a 25°C donde se lee el comportamiento del material, a una tasa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$, bajo una atmósfera de nitrógeno. La muestra consistió en pellets de PHA sin ninguna modificación.
- 5.1.8.** Resonancia magnética nuclear (RMN): esta técnica aprovecha la propiedad magnética de núcleos de elementos que posean espín, en este caso se utilizó la RMN de protones y es utilizada principalmente para identificar los grupos funcionales presentes en la muestra [143]. Para realizar la técnica se disolvió 2 mg de PHA en 0.625 ml de Cloroformo deuterado y se realizó un ensayo con protones de hidrógeno en un equipo Bruker Ascend™ 600.

5.2. Paso 2: Fabricación de scaffolds

Para dar inicio al desarrollo del objetivo general y al objetivo específico 5, referentes al proceso de fabricación de los scaffolds y a la documentación de este proceso, se estableció la siguiente metodología (basada en [144]) que se encuentra

resumida en el diagrama de la Fig. 18, los valores de cada reactivo usados en los protocolos seguidos se encuentran en la Tabla 5.

En el diagrama de flujo de la Fig. 18, se plasman diez momentos en el proceso de fabricación de los scaffolds de PHA que se explican a continuación:

- Se realizó un lavado previo del material con etanol para asegurar la limpieza de este antes de los procesos de fabricación, para ello se realizó un ciclo de lavados propuesto por [145] que consistió en: 1 h con etanol al 100 %, ½ h con etanol al 70 %, ½ h con etanol del 50 %, ½ h con etanol al 30 % y 1 h con agua destilada.
- Disolución de PHA: el PHA se disolvió en diclorometano en porcentajes de 7.5, 10 y 12.5 %, el tiempo requerido varió según la concentración entre 10 y 20 min y se utilizó una velocidad de 600 rpm, el beaker utilizado se selló con un reloj de vidrio y cinta adhesiva protectora para evitar la volatilización del diclorometano.
- Tergitol: el tergitol se añadió a la solución para permitir la formación de la emulsión con agua destilada, ya que el diclorometano no es soluble en agua, su concentración fue 7.8 % w/w del agua más el polímero, y se agitó por aproximadamente 15 min a 600 rpm.
- Agua: el agua fue añadida a la solución para disminuir el punto de congelamiento de la solución, ya que el diclorometano cuenta con un punto de congelamiento de $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ [146] y para generar poros, para ello se realizó un goteo por tiempos que oscilaban entre 30 y 45 min según la concentración de la solución, a 1200 rpm.
- Pre-congelado: antes de verter la solución en el molde, este era congelado mediante exposición de sus paredes externas a nitrógeno líquido por 3 min, para evitar la separación de las fases de la emulsión en el momento de verterla en el molde.
- Congelamiento: una vez vertida la solución en el molde, se dejó congelar por 10 min a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes del proceso de liofilización.
- Liofilización inicial: la solución congelada y contenida en los moldes se liofilizó durante 48 h con una presión 0.12 mbar.
- Lavados: para eliminar las trazas de los solventes que hayan podido quedar en los scaffolds se realizó un lavado con etanol y agua destilada igual al planteado en el primer ítem del proceso [145].
- Segundo congelamiento: para secar las muestras después del lavado se realizó una segunda liofilización, para ellos las muestras fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h en un ultracongelador.
- Liofilización final: se liofilizaron las muestras por 24 h.

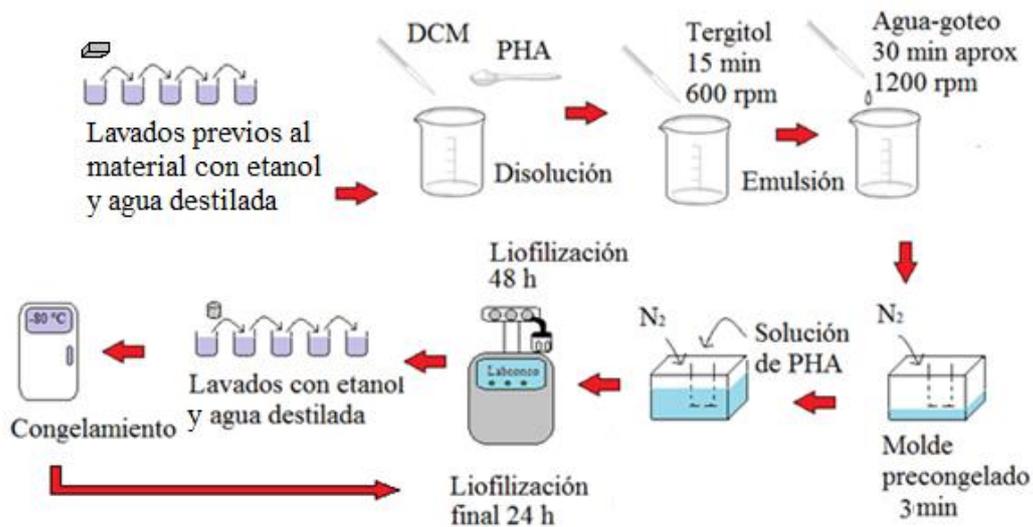


Fig. 18. Diagrama de flujo de la fabricación de scaffolds de PHA. Autoría propia.

Tabla 5. Porcentajes de los reactivos utilizados en la fabricación de los scaffolds.

Reactivo	Valores	Con respecto a
% PHA	7.5, 10, 12.5 w/v	Diclorometano
% Agua	60, 75, 90 w/w	Polímero + diclorometano
% Tergitol	7.8 w/w	Agua + polímero

5.3. Paso 3: Caracterización de los scaffolds sin biofuncionalizar

Para dar respuesta a los objetivos específicos uno y dos, que están relacionados con la influencia del porcentaje de PHA y agua en los scaffolds en las pruebas morfológicas, mecánicas y de estabilidad, se planteó el siguiente protocolo, resumido en la Fig. 19.

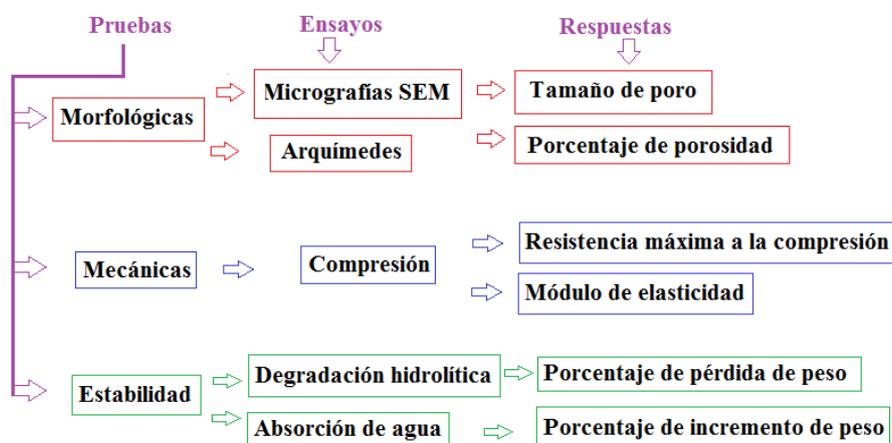


Fig. 19. Diagrama de flujo de la caracterización de los scaffolds. Autoría propia.

5.3.1. Pruebas morfológicas

- Para hallar la distribución de tamaño de poro se realizaron micrografías SEM en un equipo SEM JEOL JSM-6490LV, para ello se realizaron dos cortes (transversal y longitudinal) a dos scaffolds de cada tratamiento y se tomaron nueve micrografías de cada corte, tres con un aumento de 200X, tres con un aumento de 500X y tres con un aumento de 1000X, para obtener la variable respuesta se utilizó el software *Image J* y se midieron las áreas de los poros de las micrografías de 200X, se calculó el tamaño de poro máximo y promedio, y se realizó un cálculo de la distribución de los poros mayores a 30 μm de diámetro, para eliminar ruido producido por la rugosidad de la superficie que impedía la identificación de los poros.
- Para hallar el porcentaje de porosidad de los scaffolds se utilizó el método de Arquímedes utilizando etanol en lugar de agua para garantizar que el fluido fuera menos denso que el scaffold, este método se basa en el principio de Arquímedes en que la fuerza de empuje ejercida por el agua sobre un objeto que está suspendido en medio de esta, es igual al agua desplazada por el objeto (volumen) y esta puede hallarse con una balanza, dicho principio se ejemplifica en la Fig. 20.

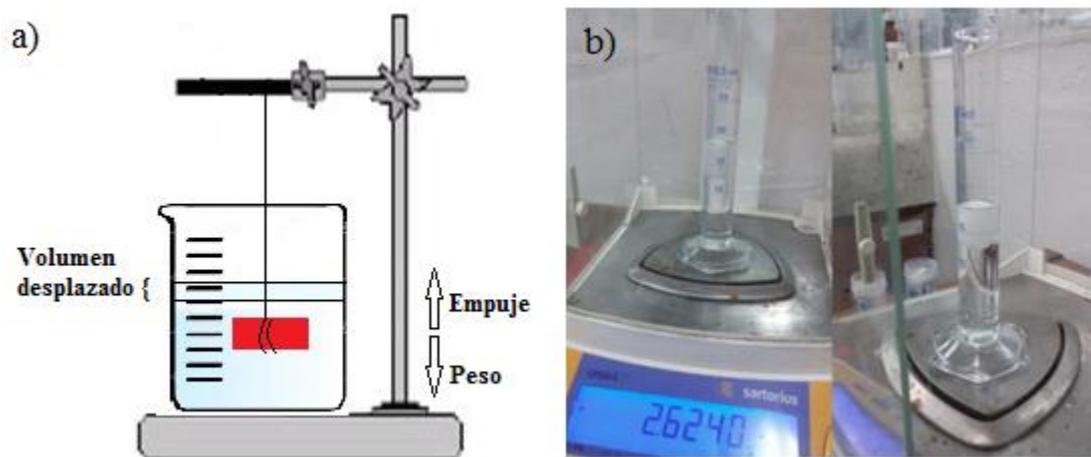


Fig. 20. a) Representación gráfica del principio de Arquímedes, b) Método de Arquímedes realizado con etanol en vez de agua.

Autoría propia.

Además estos resultados se reforzaron utilizando el método geométrico con la Ec. 1:

$$\% \text{ Porosidad} = (\pi r^2 h) - \frac{\text{Peso polímero}}{\text{Densidad del polímero}}$$

Ec. 1. Ecuación de porcentaje de porosidad donde $\pi r^2 h$ es el volumen del scaffold y la relación $\text{Peso polímero}/\text{densidad de polímero}$, es el volumen que ocupa el polímero contenido en el scaffold.

5.3.2. Pruebas mecánicas

Para las pruebas mecánicas se fabricaron tres scaffolds de diámetro 12.7 mm y altura de 25.4 mm por cada protocolo, dentro de los estándares que dictan la norma ASTM-D695-15 y se sometieron a ensayos de compresión en una máquina

de ensayos universales (ver Fig. 21) Digimess a una velocidad de 5 mm/min y fuerza de carga de 4.903 N, la compresión se realizó hasta una deformación del 75 % de la altura de scaffold.

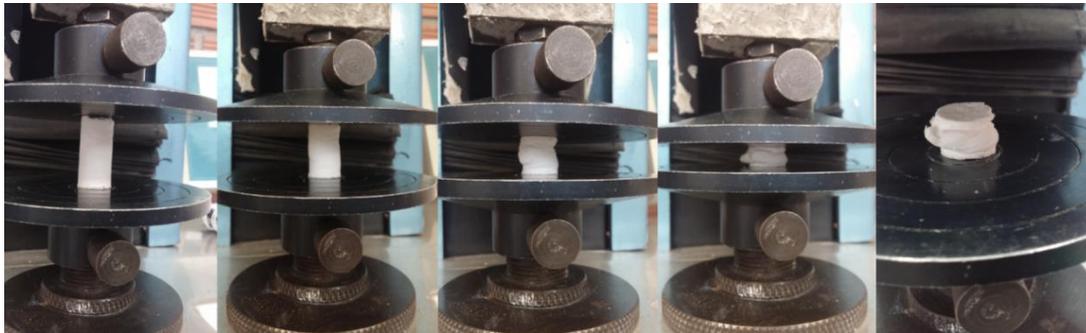


Fig. 21. Fotografías del ensayo de compresión organizadas en orden temporal de izquierda a derecha. Autoría propia.

- Para hallar la resistencia máxima se tomó el máximo valor obtenido.
- Para hallar el módulo de elasticidad, se eliminaron los datos iniciales que corresponden a valores arrojados por la máquina antes de hacer el primer contacto con el scaffold, luego se realizó una línea de tendencia para suavizar la curva obtenida y luego se tomó el promedio de la pendiente entre los porcentajes de deformación 0-2, 2-4, 4-6, 6-8 y 8-10 como una modificación de la norma ASTM-D695-15, como se observa en la Fig. 22.

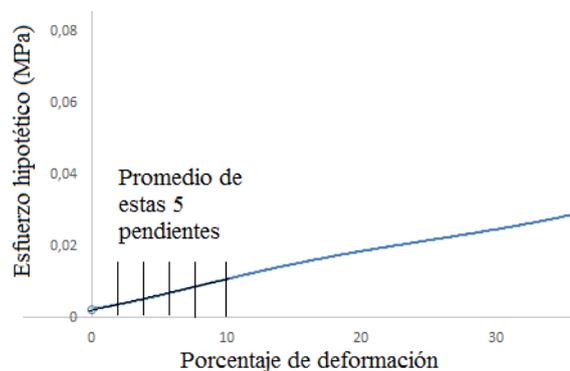


Fig. 22. Ejemplo de la obtención del módulo elástico en las curvas de compresión. Autoría propia.

5.3.3. Pruebas de estabilidad

- Para la prueba de degradación hidrolítica se utilizó una modificación a la norma ASTM F1635 propuesta por [147], donde se pesaron 12 semi-discos de los scaffolds de cada protocolo, se introdujeron en 12 ml de SBF y se almacenaron a 37 °C en una incubadora, se extrajeron tres muestras por protocolo al día siete del experimento, se midió el pH de la solución y las muestras fueron congeladas y liofilizadas para ser pesadas por segunda vez (ver Fig. 23), con estos datos se calculó el porcentaje de masa perdida (ver Ec. 2) y se repitió el experimento con las muestras faltantes a los días catorce, veintiuno y veintiocho.



Fig. 23. Fotografías secuenciales de la prueba de degradación hidrolítica, a) Obtención del volumen adecuado de la muestra para la prueba, b) La muestra una vez pesada se expone a SBF, c) La prueba se realiza en una incubadora a 37 °C, d) Finalmente se liofilizan las muestras para realizar el segundo y último pesaje. Autoría propia.

$$\% \text{ de masa perdida} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Ec. 2. Ecuación para calcular la pérdida de masa en la prueba de degradación.

- Para la prueba de absorción se utilizó la norma ASTM D570-98, donde los scaffolds (diámetro 12.7 mm y altura de 25.4 mm) fueron pesados en seco y sumergidos en agua destilada a 23 °C por 24 h, luego se les retiró el exceso de agua con un paño seco y se pesaron por segunda vez (ver Fig. 24) para determinar el porcentaje del incremento del peso (ver Ec. 3).



Fig. 24. Fotografías secuenciales de la prueba de absorción, a) La muestra se pesa en seco antes de iniciar la prueba, b) La muestra se somete a un ambiente húmedo c) por 24 h, d) El exceso de agua es retirado con un paño una vez ha pasado el tiempo establecido y e) Las muestras son pesadas nuevamente. Autoría propia.

$$\% \text{ de incremento de peso} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Ec. 3. Ecuación para calcular el incremento en el peso de los scaffolds en la prueba de absorción.

5.4. Paso 4: Biofuncionalización de los scaffolds

Para desarrollar el objetivo tres se realizó un proceso de biofuncionalización a los scaffolds siguiendo el protocolo propuesto por Masaeli [98] con modificaciones, se inició lavando discos cortados de los scaffolds de 6 mm de alto con NaOH al 0.25 N por 90 min para inducir una hidrólisis alcalina en la superficie de los discos, posteriormente estos fueron lavados y secados durante 24 h a 37 °C, luego fueron lavados con solución buffer MES 0.1 M por 30 min a temperatura ambiente, una vez lavados se depositaron en una solución buffer MES con EDAC (5 mg/ml) y sulfo-NHS (2.5 mg/ml) por 90 min a temperatura ambiente para permitir la agregación de grupos funcionales a la superficie del material, luego se depositaron en una solución de PBS con 5 mg/ml de colágeno por 24 h a temperatura ambiente, seguido de un lavado con PBS y un secado a 37 °C por 24 h, las reacciones se pueden observar en la Fig. 25, el proceso se controló a través de ensayos de FTIR.

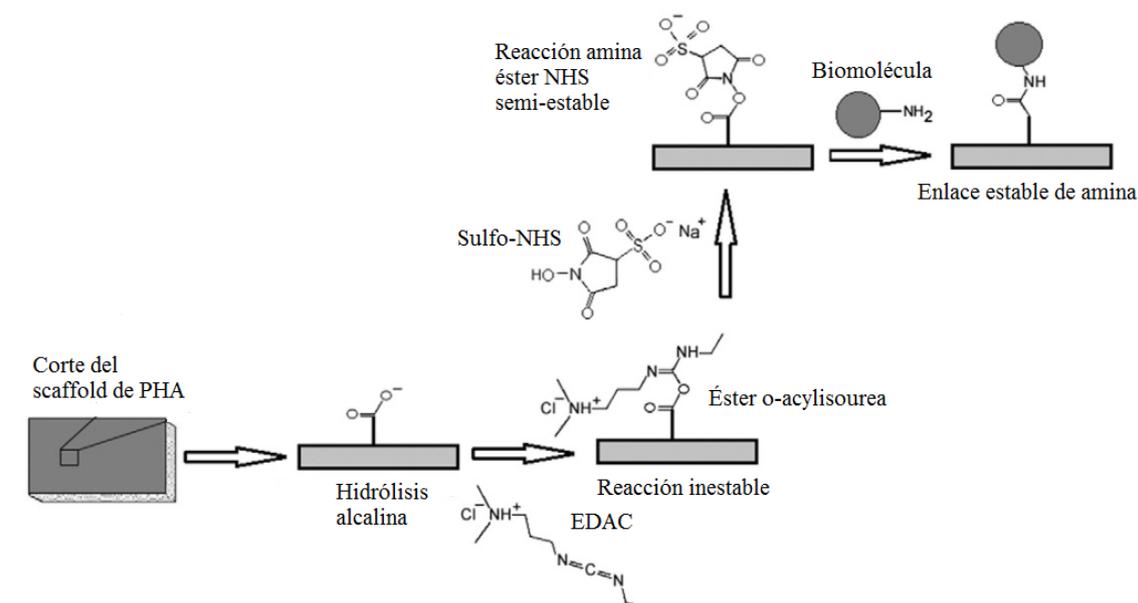


Fig. 25. Reacciones presentes en la biofuncionalización de discos de los scaffolds de PHA. Modificado de Masaeli [98].

5.5. Paso 5: Ensayos biológicos

Siguiendo la norma ASTM F748-16 que trata sobre la elección de los métodos genéricos para la evaluación de biológica de materiales y dispositivos, se debe determinar primero la necesidad de demostrar la biocompatibilidad del material a tratar [148], en este orden de ideas el test de citotoxicidad se recomienda como una prueba de detección temprana que puede proporcionar información sobre la predicción de la respuesta a pruebas de citotoxicidad *in vivo*.

El enfoque de este trabajo de investigación fue la evaluación de las propiedades de un biomaterial desde el aspecto ingenieril, ya que se considera que este aspecto debe ser tratado y definido antes de cualquier prueba subsecuente en la fabricación de scaffolds, una vez establecido el comportamiento mecánico, y las características morfológicas y de estabilidad del material, se eligió la prueba de citotoxicidad dentro del conjunto de pruebas biológicas como un primer acercamiento a las pruebas biológicas que corresponderían con una siguiente fase del proceso investigativo, para determinar dicha metodología se remitió la norma ISO 10993-5 donde se especifican los detalles de la prueba de citotoxicidad para dispositivos médicos [149], de esta manera, las pruebas de citotoxicidad de este proyecto de

investigación se realizaron con la metodología descrita en esta norma, tales como el ensayo de extractos y se siguió una de las recomendaciones para la selección de las células, por lo que se usó una línea de fibroblastos como célula diana de la prueba.

Para la realización de los ensayos biológicos se esterilizaron tres tipos de muestras (pellet del polímero, scaffolds sin biofuncionalizar y scaffolds biofuncionalizados), con óxido de etileno en la planta de esterilización de Corpaul, las muestras fueron almacenadas entre 1 y 7 días, luego se sometieron a una prueba de citotoxicidad por contacto indirecto (extracto) con MTS, con un protocolo de tres días (representado en la Fig. 26), así:

Día 1

- Preparación de los extractos: se obtuvieron los extractos del pellet del polímero, de los scaffolds sin biofuncionalizar y de los scaffolds biofuncionalizados, depositando las muestras en medio de cultivo celular DMEM (5 % de FBS y 1 % de penicilina/estreptomicina) a 37 °C por 24 h, según la relación que establece la norma ISO 10993-12 (scaffolds: 0.1 g/ml, pellets: 0.2 g/ml y películas: 6 cm²/ml).
- Siembra de células: se sembraron 8000 células/pozo de fibroblastos humanos en una caja de 96 pozos donados por el Biobanco de la IPS universitaria, y se agregó 100 µL de medio a cada pozo. Cada medida se hizo por cuadruplicado y se usó un control de células y medio en el que no se depositó ningún extracto.

Día 2

- Se retiró el medio de los pozos y se puso 50 µL de los extractos en cada uno (menos en el control). El plato se incubó por 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂.

Día 3

- Se realizó la prueba de MTS: se disuelven 50 µL de MTS en el medio y se incuba a 37 °C por 1.5 h, tras las cuales se lee la absorbancia a 490 nm, en un equipo iMark BioRad.

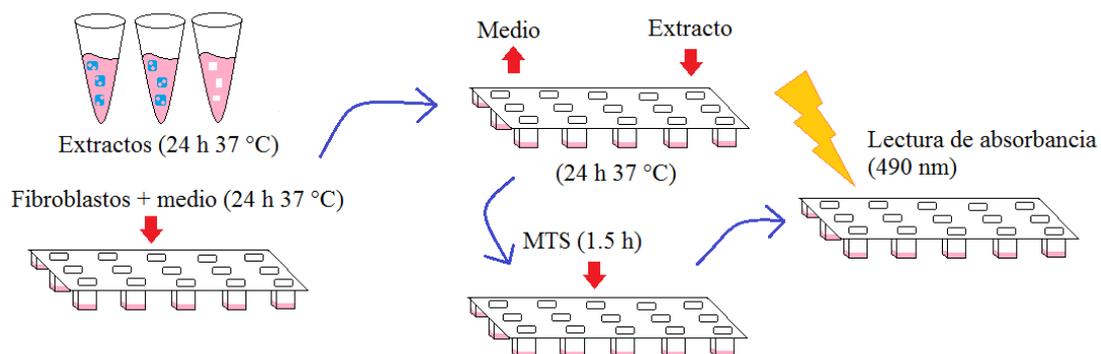


Fig. 26. Esquema de la metodología de la prueba de citotoxicidad. Autoría propia.

5.6. Paso 6: Validación estadística

Diseño de experimentos

Para la validación estadística de los resultados morfológicos, mecánicos y de estabilidad de los scaffolds sin biofuncionalizar se utilizó el software R, donde se construyó una tabla ANOVA para verificar la significancia del efecto de los factores en las variables respuestas con un nivel de confianza del 97 % ($\alpha=0.03$), para el que se plantearon dos hipótesis, la nula y la alterna

H_0 = No existen diferencias entre los tratamientos

H_1 = Al menos un par de tratamientos es diferente

La tabla ANOVA se validó con la comprobación de tres supuestos a saber:

- i) Supuesto de distribución normal de los residuales de los datos, para ello se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, cuyas hipótesis son:

H_0 = Los residuales proceden de una distribución normal

H_1 = Los residuales NO proceden de una distribución normal

- ii) Supuesto de homoscedaticidad de las varianzas de los residuales, para ello se usó la prueba de Bartlett, cuyas hipótesis son:

H_0 = Las varianzas de los residuales son iguales

H_1 = Al menos dos varianzas de los residuales son distintas

- iii) Supuesto de independencia de los residuales, para ello se hizo la prueba de Durbin-Watson, cuyas hipótesis son:

H_0 = La correlación entre los residuales es cero. Son independientes

H_1 = Al menos un par de residuales son dependientes entre si

Para todos los supuestos el valor-p debe ser mayor que el nivel de confianza escogido para no rechazar la hipótesis nula y concluir sobre los efectos encontrados con un 97 % de nivel de confianza.

Para los casos donde no se cumplen los supuestos se utilizó la prueba no paramétrica de Wilcoxon que permite determinar si hay diferencias significativas entre dos muestras sin necesidad que estas tengan distribución normal o sean homoscedasticas, solo necesita que los residuales sean independientes.

Para ello se usó las siguientes hipótesis:

H_0 = No existe diferencias entre las medianas

H_1 = Las medianas son diferentes

Donde el valor-p debe ser menor que el nivel de confianza escogido para rechazar la hipótesis nula y concluir que las medianas son diferentes y por tanto los valores obtenidos en la variable respuesta son significativos.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Como se ilustró en la metodología, los resultados se presentan en su orden, caracterización del material, producción y caracterización morfológica, mecánica y de estabilidad de scaffolds de PHA, biofuncionalización de los scaffolds con un análisis químico que da cuenta de lo que ocurre en cada paso de la biofuncionalización y finalmente una prueba de citotoxicidad. Sin embargo, debido a dificultades encontradas en el proceso, se presentan adicionalmente una prueba de cromatografía de gases para identificar compuestos presentes en los scaffolds y una prueba cualitativa de observación celular en una prueba de citotoxicidad.

6.1. Caracterización de PHA

El fabricante reportó que el material es un bio-poliéster alifático, biodegradable y semicristalino diseñado para ser procesado por extrusión en especial en la fabricación de láminas, por ello consiste en un compuesto de PHA y PLA con algunos aditivos que facilitan el procesamiento, sin embargo, no da cuenta de las cantidades de los elementos presentes, ni de la naturaleza de los aditivos ni del tipo de PHA utilizado, la caracterización de la sesión 6.1 ayuda a comprender mejor la naturaleza del material utilizado en la investigación.

6.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En la micrografía de la Fig. 27 se observa la superficie del polímero utilizado en los experimentos, en cuya superficie no se encuentra porosidad de diámetro mayor a 2 μm , la resolución de las micrografías no permite apreciar la porosidad de diámetro inferior con claridad.

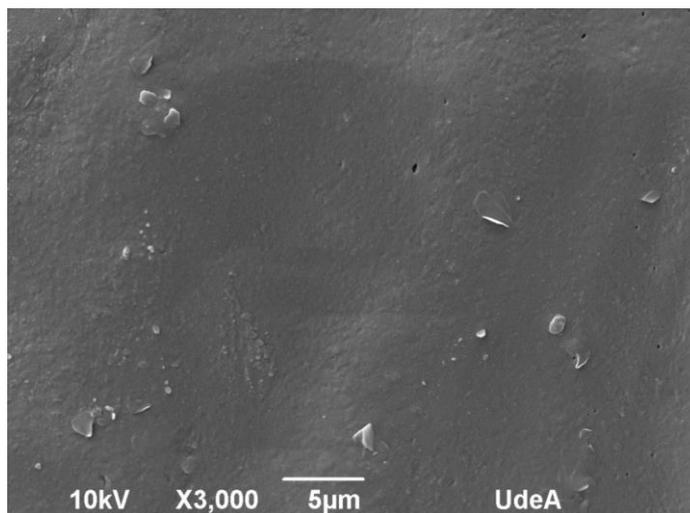


Fig. 27. Micrografía SEM de una muestra de PHA.

6.1.2. Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS)

En el espectro de EDS de la Fig. 28 se pueden observar picos pertenecientes a los elementos químicos carbono y oxígeno típicos de los polímeros, los otros picos significativos corresponden a elementos pertenecientes al proceso de preparación de la muestra, tales como el oro.

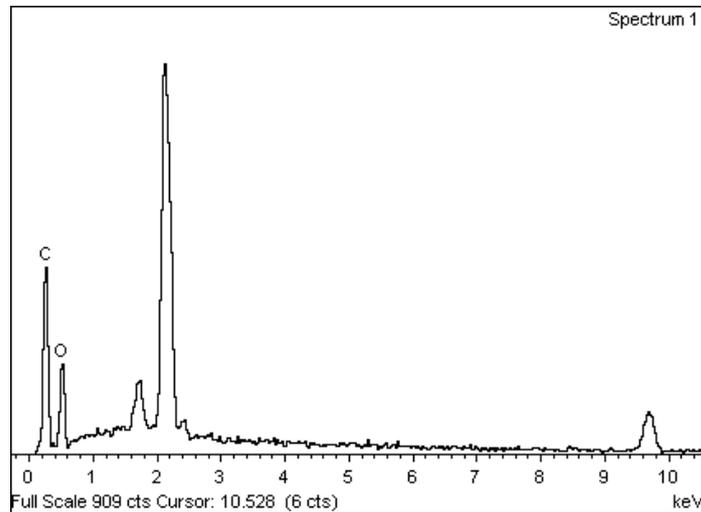


Fig. 28. Espectro EDS de una muestra de PHA.

Análisis

En la micrografía se observa una superficie con posibles poros de diámetros inferiores a 2 μm (no es concluyente porque la resolución de la micrografía no es suficiente), la naturaleza del material no permitió incrementar la ampliación de la imagen ya que los altos voltajes utilizados por el equipo destruían la muestra. El EDS se realizó como una identificación inicial de los elementos presentes en el material y este arrojó presencia de carbono y oxígeno, elementos típicos de los polímeros.

6.1.3. Difracción de Rayos X (DRX)

Para comenzar a identificar más claramente la naturaleza de los polímeros del material estudiado, se realizó un DRX, cuyo espectro se presenta en la Fig. 29, donde se pueden observar claramente dos picos, $2\theta=13.5^\circ$ y $2\theta=17^\circ$ que corresponde a PHA y es posible que el $2\theta=16.5^\circ$ correspondiente a reflexiones de cristales de PLA, esté solapado.

Análisis

Comparado con la literatura, el DRX exhibe picos característicos de difracción de PHA en los puntos $2\theta=13.5^\circ$ y $2\theta=17^\circ$ [150]. Según trabajos encontrados en la literatura el pico característico de difracción de cristales de PLA debe observarse en $2\theta=16.5^\circ$, sin embargo, el pico en $2\theta=17^\circ$ del PHA puede solaparlo, la existencia de PLA se comprueba a través de otras pruebas de caracterización del material. Los máximos de base ancha presentes en la gráfica, caracterizados por ser amorfos pueden pertenecer a los aditivos presentes en el material que no son identificados.

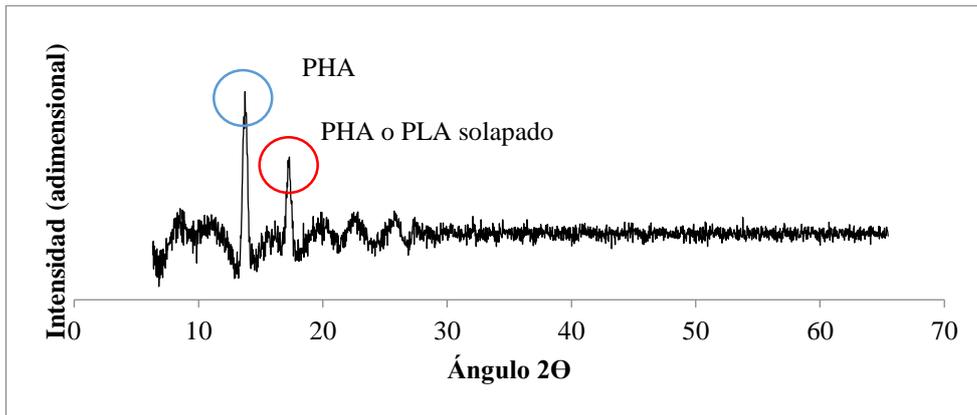


Fig. 29. Espectro DRX de una muestra de PHA.

6.1.4. Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR)

Para reconocer los grupos funcionales de los polímeros en el ensayo de FTIR, se presentan primero las estructuras químicas del PHA y el PLA en la Fig.30 donde se observa que la cetona, el éster y el ácido carboxílico hacen parte del grupo carbonilo y son comunes a ambos polímeros, los únicos grupos funcionales diferentes entre estos dos polímeros son el grupo metileno para el PHA y el grupo metino para el PLA.

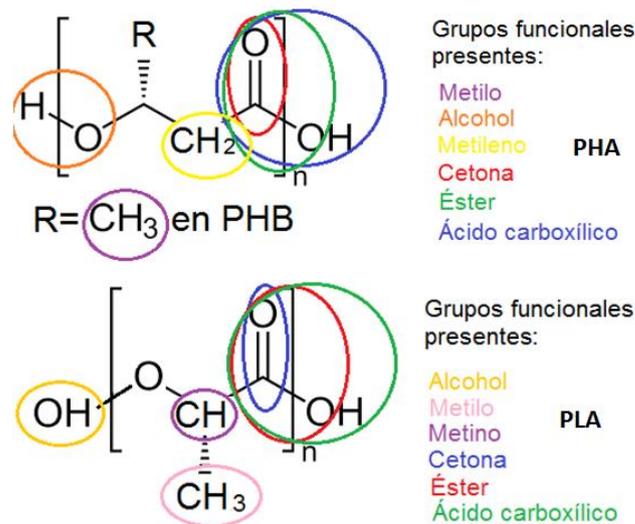


Fig. 30. Estructura química y grupos funcionales para el PHA y el PLA. Autoría propia.

En la Tabla 6 se detallan las ocho zonas del espectro del FTIR descritas por Zuluaga et al. [140], y su aparición en el espectro de FTIR de la muestra.

Tabla 6. Rango de bandas presentes teóricamente en los polímeros estudiados y en la muestra.

Rango de bandas cm^{-1}	Moléculas presentes	Presentes en PHA	Presentes en PLA	Presentes en la muestra
3750-3000	O-H, N-H	OH	OH	Si
3300-2900	$\text{C}\equiv\text{C-H}$, $\text{X}\equiv\text{C-H}$, Ar-H	No	No	Si, pero puede corresponder a la siguiente zona
3000-2700	CH_3 , CH_2 , C-H, CHO	Si	Si	Si
2400-2100	$\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$, $\text{X}=\text{C}=\text{X}$, SiH	No	No	No
1900-1650	C=O	Si	Si	Si
1675-1500	C=C (alifáticos y aromáticos), C=N	No	No	No
1475-1300	C-H	Si	Si	Si
1000-650	C=C-H, Ar-H	No	No	Si

La única zona que presentan bandas que no corresponden al FTIR del PHA o del PLA se encuentra entre 1000 y 650 cm^{-1} y pueden deberse a la huella dactilar de los polímeros, para esto se debe hacer una comparación entre FTIR teniendo en cuenta que pueden existir bandas producto de la interacción de los polímeros, sin embargo, no se dispone de los polímeros separados no haciendo viable esta tarea.

En la Fig. 31 y en la Tabla 7 la banda ancha y pequeña entre 3200 cm^{-1} y 3600 cm^{-1} puede corresponder a presencia de agua.

Entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} aparecen tres bandas mayores y otras dos más pequeñas, la aparición de más de tres bandas indica la posible presencia de grupos CH_2 y CH_3 que se confirma con la banda en 1460 cm^{-1} , las dos bandas entre 1365 cm^{-1} y 1385 cm^{-1} corresponde a CH_3 y la pequeña banda en 710 cm^{-1} indica que el CH_2 se encuentra formando cadenas de más de cuatro moléculas. La ausencia de bandas alrededor de 3100 cm^{-1} indica la ausencia de alquenos o aromáticos. La gran banda en 1710 cm^{-1} indica la presencia de carbonilo [140].

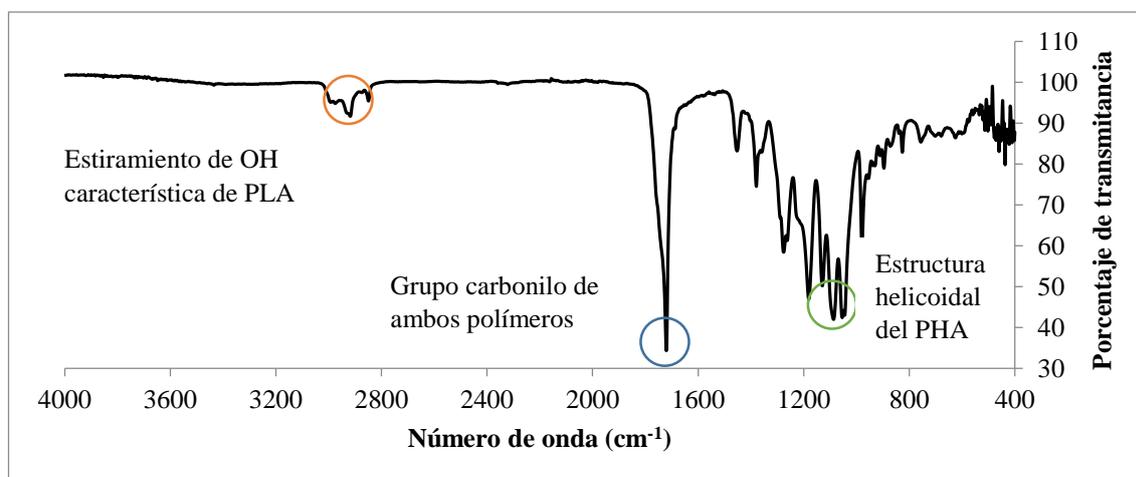


Fig. 31. Espectro FTIR de una muestra de PHA.

Tabla 7. Bandas presentes en el espectro FTIR del polímero.

Banda (cm ⁻¹)	Compuesto	Intensidad	Presente en
3790	OH libre	Débil	PLA
3450	OH	Muy fuerte	PLA, es un alcohol que induce fuerzas intramoleculares
2997 y 2947	CH ₃	Media	PLA
2930 y 2850	CH	Débil	Está presente en ambos polímeros
2882	CH	Débil	PLA
2400	Posible clorhidrato	Media	Parece corresponder a los aditivos presentes
2350	CO ₂	Débil	Atmósfera
2316 y 2090	Lisina	Media y débil	Es posible que se deba a los aditivos
1760	C=O	Muy fuerte	PLA
1650	Posible amina	Fuerte	Es posible que se deba a los aditivos
1452, 1348 y 1388	CH ₃	Fuerte	PLA
1360 y 1368	CH- CH ₃	Fuerte	PLA
1300 y 1315	CH	Media	PLA
1270	CH-COC	Fuerte	PLA
1185-1215	COC- CH ₃	Muy fuerte	PLA
1130	CH ₃	Fuerte	PLA
1090.1100	COC	Muy fuerte	PLA
1042	CH del grupo metilo	Fuerte	PHB
976	C=C	Fuerte	Pertenece a un aminoácido
703	CH di o tri-sustituido	Media	PHB

Análisis

Existen varias bandas típicas del PLA presentes en espectro del FTIR, la banda en 1729.12 cm⁻¹ es un estiramiento típico del grupo carbonilo amorfo (C=O) [150], [151], [152] cuya amplitud puede deberse a la mezcla de PLA-PHA por el estiramiento de cristales de carbonilo de PHA suponiendo que existe una interacción molecular [153]. Las bandas 2991.37 cm⁻¹, 2926.72 cm⁻¹ y 2853.44 cm⁻¹ corresponden a la extensión de OH característica del PLA [150] y la banda 1182 cm⁻¹ corresponde al estiramiento de C-O del grupo CH-O de PLA que se encuentra solapado [154].

Las bandas 3443.96 cm⁻¹ correspondiente al grupo OH y 1729.12 cm⁻¹ correspondiente al grupo carbonilo son bandas típicas presentes en el PHA [155]. Las bandas presentes en 1447.50 cm⁻¹ y 1395.9 cm⁻¹ corresponden a deformación del CH₃ y extensión de C-O-C respectivamente, presentes tanto en el PHA como en el PLA [152].

La banda 1045.49 cm^{-1} presente en el FTIR no parece corresponder a ningún componente del PHA y el PLA, sin embargo, se cree que está solapando dos picos cercanos a 1089 cm^{-1} y 1057 cm^{-1} correspondientes a una estructura helicoidal perteneciente al PHA [152].

6.1.5. Peso Molecular (PM)

Para determinar el peso molecular del polímero, fue necesario determinar la viscosidad intrínseca de una solución de PHA a través de una prueba de viscosimetría, en las Tablas 8 y 9 se observan los resultados de la medición del tiempo necesario para que las soluciones de PHA fluyeran de un punto a otro, con estos datos y las Ec. 4 y Ec. 5 se puede determinar la relación de viscosidad, la viscosidad inherente y la viscosidad reducida. Con los datos de viscosidad inherente y viscosidad reducida se realizan las gráficas de *Huggins* y *Kraemer* observables en la Fig.32, de donde se extrapolan dos líneas rectas y se promedian para determinar la viscosidad intrínseca, la cual fue de 165.31 mL/g . Nota: para la muestra analizada se elimina el primer punto en ambas gráficas ($0.0021; 162.92$) y ($0.0021; 194.26$) correspondientes a la viscosidad inherente y a la viscosidad reducida vs concentración respectivamente, ya que no se ajustan de manera adecuada a la tendencia lineal de los otros puntos.

Una vez se determinó la viscosidad intrínseca se halla el peso molecular con la Ec. 6, y su resultado es $220.310,97\text{ Da}$.

Tabla 8. Resultados de medición de tiempo y determinación de viscosidades para una muestra de PHA.

Concentración muestra (g/mL)	Tiempo (s)			Tiempo promedio (s)	Relación de viscosidad (t/ts)	Viscosidad inherente (mL/g)
Cloroformo (Solvente)	36.44	36.31	36.38	36.38	No aplica	No aplica
0.0021	51.28	51.15	51.22	51.22	1.41	162.92
0.0035	55.56	55.53	55.44	55.51	1.53	120.75
0.004	57.6	57.47	57.38	57.48	1.58	114.39
0.0045	60.25	60.12	60.12	60.16	1.65	111.81
0.005	61.62	61.53	61.37	61.51	1.69	105.04

Tabla 9. Resultados de viscosidad específica y viscosidad reducida.

Concentración muestra (g/mL)	Viscosidad específica ((t/ts)-1)	Viscosidad Reducida (mL/g)
Cloroformo (Solvente)	No aplica	No aplica
0.0021	0.41	194.26
0.0035	0.53	150.28
0.004	0.58	145.06
0.0045	0.65	145.31
0.005	0.69	138.17

$$\text{Viscosidad inherente} = \ln(\text{relación de viscosidad}) / C$$

Ec. 4. Fórmula para determinar la viscosidad inherente, donde C corresponde a la concentración a la cual se realizó el análisis para cada muestra en mL/g.

$$\text{Viscosidad reducida} = \text{Viscosidad específica} / C$$

Ec. 5. Fórmula para determinar la viscosidad reducida, donde C corresponde a la concentración a la cual se realizó el análisis para cada muestra en mL/g.

$$\text{Peso molecular (Dalton)} = \sqrt[\alpha]{\text{viscosidad intrínseca} / K}$$

Ec. 6. Fórmula para determinar el peso molecular de la muestra, donde α y K son constantes Mark-Houwink y para este procedimiento son 0,756 y 0,0151 mL/g respectivamente [156].

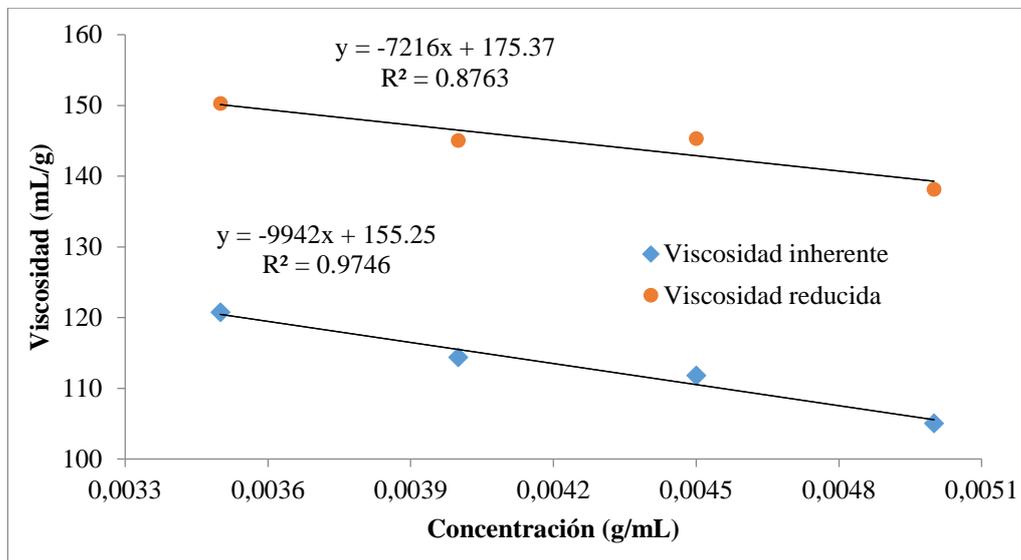


Fig. 32. Gráfico de viscosidad inherente (azul) y viscosidad reducida (rojo) vs concentración, para PHA.

Análisis:

El peso molecular se halló mediante una prueba de viscosimetría y su resultado fue $220.310,97 Da$ lo cual es un valor de un alto peso molecular frecuente en polímeros, sin embargo, al tratarse de un material compuesto, el valor obtenido de peso molecular es un promedio del verdadero tamaño que tienen las cadenas poliméricas presentes.

La resistencia mecánica, el grado de cristalinidad, la temperatura de fusión y la temperatura de transición vítrea de los polímeros están directamente influenciados por el peso molecular del polímero, cuanto mayor es el peso molecular, mayor es la resistencia mecánica encontrada [157].

El peso molecular de los distintos tipos de PHA oscila entre 200 y 300 kDa y depende del tipo de bacteria que lo produzca y de su actividad metabólica [158]. El peso molecular del PLA depende del tipo de síntesis con que se haya

obtenido, a partir de policondensación del monómero de ácido láctico se pueden obtener pesos de 15 kDa, y por polimerización a través de la apertura del anillo se pueden obtener pesos moleculares de hasta 680 kDa [159].

Una prueba más precisa para determinar el peso molecular es la electroforesis en gel, pero debido a que la naturaleza de los solventes necesarios para disolver el polímero puede dañar algunas partes poliméricas del equipo, no fue posible hacerlo.

6.1.6. Análisis Termogravimétrico (TGA)

Una técnica para identificar la presencia del PHA y PLA e inferir indirectamente las proporciones de estos es el TGA, en el termograma de la Fig. 33 se observan dos pérdidas de masa a las temperaturas 254.98 °C y a 325.44 °C correspondientes a reacciones de descomposición de los polímeros PHA y PLA respectivamente, y se observa un residuo de 2.944% alrededor de 600 °C.

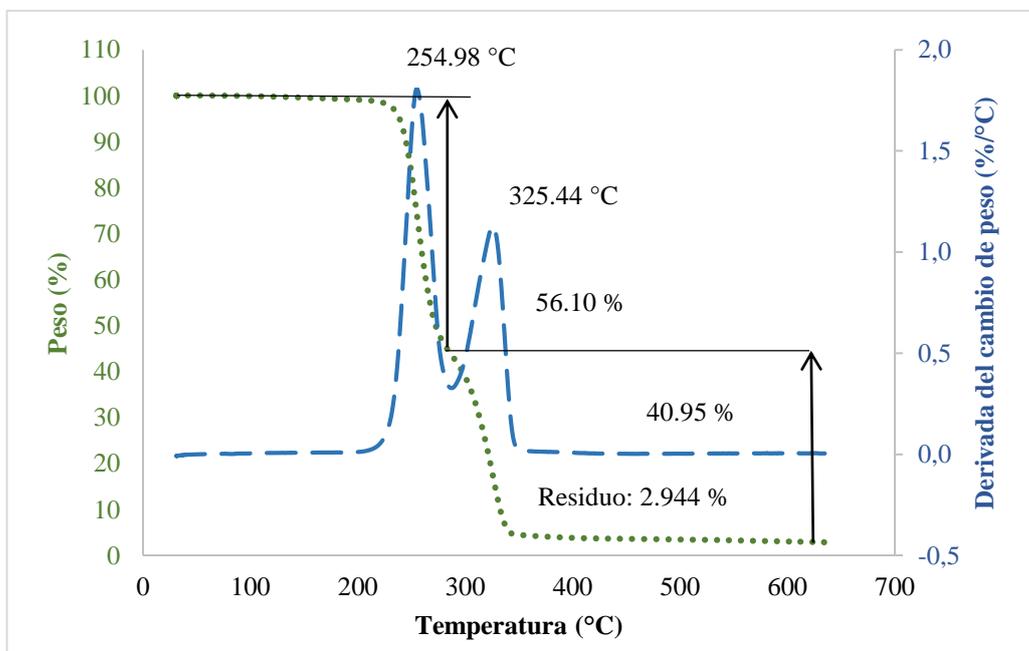


Fig. 33. Termograma de TGA de una muestra de PHA.

Análisis:

En la literatura se encuentran reportes de TGA de PLA donde se observa que este polímero se degrada a una temperatura de entre 382 °C y 375 °C, pero la presencia de PHA en el compuesto disminuye la temperatura de degradación del polímero [160], por tanto se asocia la pérdida de masa observada a 325.44 °C con las reacciones de degradación del PLA. La pérdida de masa observada a 254.98 °C se asocia con la descomposición del PHA ya que este polímero es el componente principal de la muestra y según lo encontrado en la literatura [160] parece corresponder a PHB. Además Guan, Q [160] reportó que a mayor cantidad de PHB presente en la muestra, menor temperatura de degradación experimenta el PLA, ellos reportaron una temperatura de degradación para el PLA de aproximadamente 375 °C para compuestos de PHB 25 % w/w de PLA, por otro lado, algunos autores que utilizaron PHB y porcentajes de 25 %/75 %

de PHB/PLA reportaron temperaturas similares para la degradación del PLA como 350 °C [150] y 355 °C [151]; Nanda [161] y colaboradores utilizaron PHBV en vez de PHB y el porcentaje fue diferente y reportaron para PHBV/PLA 70 %/30 % una temperatura de degradación del PLA de aproximadamente 325 °C, por tanto se puede determinar que el PHA representa el polímero principal del compuesto. Con el TGA es posible determinar la relación de los elementos presentes, sin embargo, para disminuir el error es necesario tener una curva de TGA de cada elemento por separado de manera que puede determinarse los porcentajes de peso perdidos por humedad y otros aspectos, para este caso se realiza el cálculo sin dichas precisiones de manera que el resultado obtenido es una estimación y según esta la relación de material es 1.37:1 de PHA/PLA (56.10/40.95) [162].

6.1.7. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En el espectro DSC de la Fig. 34 se observa una temperatura de transición vítrea a -6.37 °C, correspondiente a PHA [163], [164], los dos picos correspondientes a 50 °C y 110 °C son las temperaturas de fusión del material y el valle (153 °C) corresponde a una cristalización.

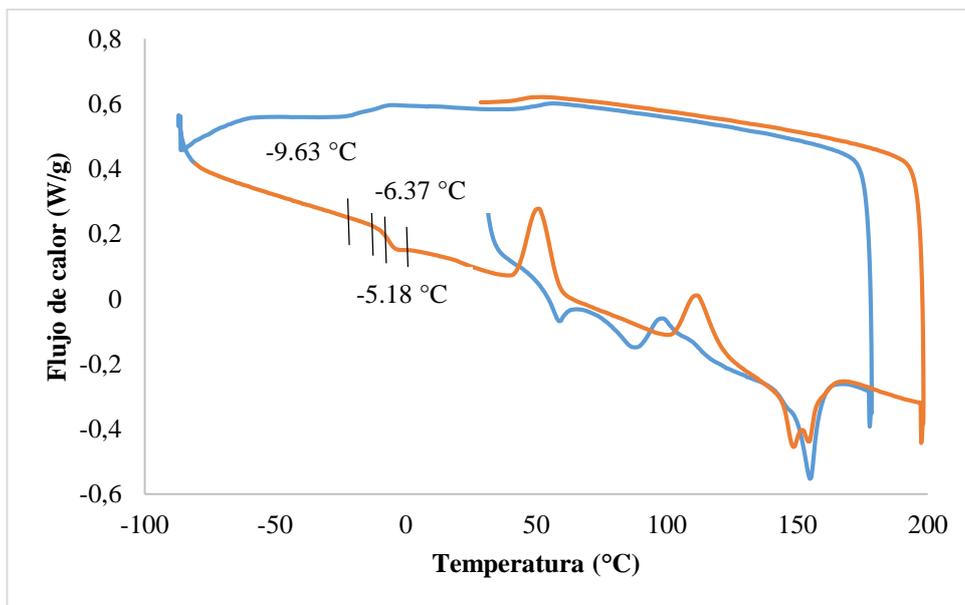


Fig. 34. Espectro DSC de una muestra de PHA.

Análisis:

Según la literatura, la temperatura de transición vítrea del PLA está entre 60 °C y 125 °C, pero no siempre es apreciable en el DSC cuando el material es una mezcla de PHA y PLA [164], sobre todo cuando la relación PHA/PLA en la mezcla es mayor.

La segunda fusión y la cristalización son procesos naturales del PHA que pueden ser apreciados en un DSC de dicho material [164] y se conservan en el DSC del material mezclado, la primera fusión no es natural de ninguno de los elementos por separado, pero se encuentra presente en DSC en la literatura cuando la relación PHA/PLA es mayor a 30/70 [164].

6.1.8. Resonancia magnética nuclear (RMN)

En la Fig. 35 se observa el espectro de RMN donde se pueden identificar algunos picos pertenecientes al PHA, que corresponden a un doblete en 5.3 ppm corresponde a CH [165], otro en 2.5 ppm que se atribuye al grupo metileno adyacente a un átomo de carbono asimétrico que lleva un solo átomo [165], [166] y uno simple en 1.3 ppm que corresponde a CH₃ [165], [167], [113], además el pico de poca intensidad en 4.1 indica que en el extremo P carboxilo hay una molécula CH₃, indicando que el PHA fue obtenido por alcoholisis con etanol [113].

El PLA presenta dos picos característicos, uno en 5.3 ppm correspondiente a un CH y otro en 1.5 ppm correspondiente a CH₃ [168], [169].

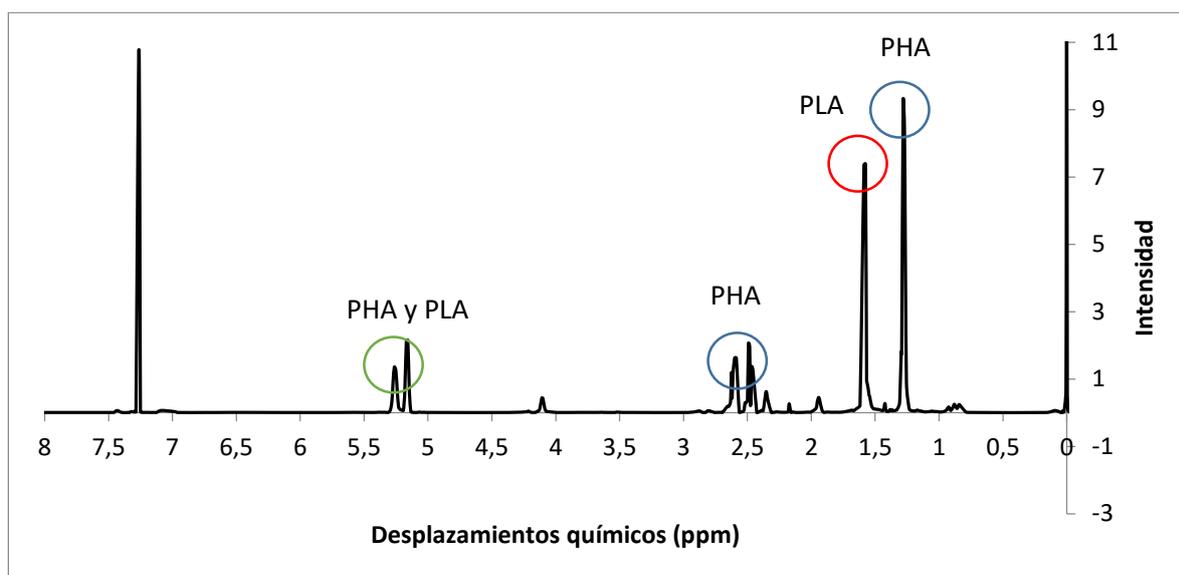


Fig. 35. Espectro de resonancia magnética nuclear de las muestras de PHA con ¹H.

Análisis:

Los picos identificados coinciden con los picos presentados por espectros de PLA y PHA, la presencia de CH₃ en el PLA no permiten concluir que el PHA se trate de un PHB caracterizado por grupos CH₃ en su estructura, aún no ha podido identificarse el pico 7.4 ppm, ya que no pertenece a ningún PHA consultado.

6.2. Caracterización de los scaffolds sin biofuncionalizar

Como se observa en la metodología, la caracterización de los scaffolds se realizó a través de seis variables respuesta a saber: tamaño de poro, porcentaje de porosidad, resistencia máxima a la compresión, módulo de elasticidad, porcentaje de pérdida de peso y porcentaje de incremento de peso; partiendo de dos factores con tres niveles, los cuales fueron tres porcentajes de variación del PHA (7.5, 10 y 12.5 %) y tres porcentajes de variación del agua (60, 75 y 90 %). Los resultados a continuación presentan el análisis individual de cada variable respuesta y la influencia de cada factor a través de un análisis ANOVA.

6.2.1. Pruebas morfológicas

Aquí se detallan dos variables respuesta: tamaño de poro y porcentaje de porosidad

a. Tamaño de poro

Para tomar los datos de tamaño de poro se tomó una micrografía de corte transversal y otra longitudinal de tres scaffolds con el mismo tratamiento, se registraron los datos de área y redondez de cada uno de los poros que superara los 30 μm de diámetro, debido a que los poros de menor tamaño generaron ruido en las lecturas del software *Image J*, ya que este no pudo distinguir entre poros y rugosidad, a continuación se registró el promedio, el mínimo y el máximo de los diámetros de poro de cada fotografía y estos datos se utilizaron para realizar el análisis estadístico, en la Tabla 10, se presentan los promedios y los máximos obtenidos de cada tratamiento.

Tabla 10. Datos obtenidos de tamaño de poro en los scaffolds, dado en μm .

Porcentaje de PHA	Porcentaje de agua	Promedio de diámetro longitudinal	Diámetro máximo longitudinal	Promedio de diámetro transversal	Diámetro máximo transversal
7.5	60	65.55	256.77	59.94	307.82
	75	72.53	500.93	79.45	241.19
	90	88.44	366.17	86.90	458.63
10	60	89.08	407.77	81.24	338.17
	75	73.34	295.11	73.83	304.66
	90	94.61	421.22	91.60	392.86
12.5	60	82.14	347.01	78.90	308.03
	75	82.24	355.22	78.28	307.65
	90	79.78	346.08	70.79	267.56

En las micrografías SEM de la Fig. 36 se observan las imágenes más representativas de los cortes transversal y longitudinal de cada tipo de scaffold a 500X, a simple vista no se observan diferencias significativas en la porosidad ni en la morfología de los poros, sin embargo, es apreciable la característica de interconectividad que presentan estos.

Para obtener datos más cuantitativos de las micrografías se utilizó el software *Image J* donde fue posible obtener el área de cada poro visible en la micrografía (se realizó con una cota mínima de 700 μm^2 , correspondiente a un diámetro aproximado de 30 μm con el objetivo de eliminar el ruido de la lectura, generado por la rugosidad), el área mínima y máxima encontrada en los poros, y valor de redondez que da cuenta de la morfología del poro.

La redondez de los poros es muy variable, se encuentra desde 0.3673 hasta 0.772174, donde 1 corresponde a una circunferencia perfecta y los valores inferiores a deformaciones de dicha circunferencia, no existen efectos de los cortes y los factores en esta medida ya que como se presenta en la Fig. 37, los promedios y las desviaciones estándar son muy similares entre todos los tratamientos, el coeficiente de variación oscila alrededor de 30 % que es considerado aceptable para esta aplicación [170].

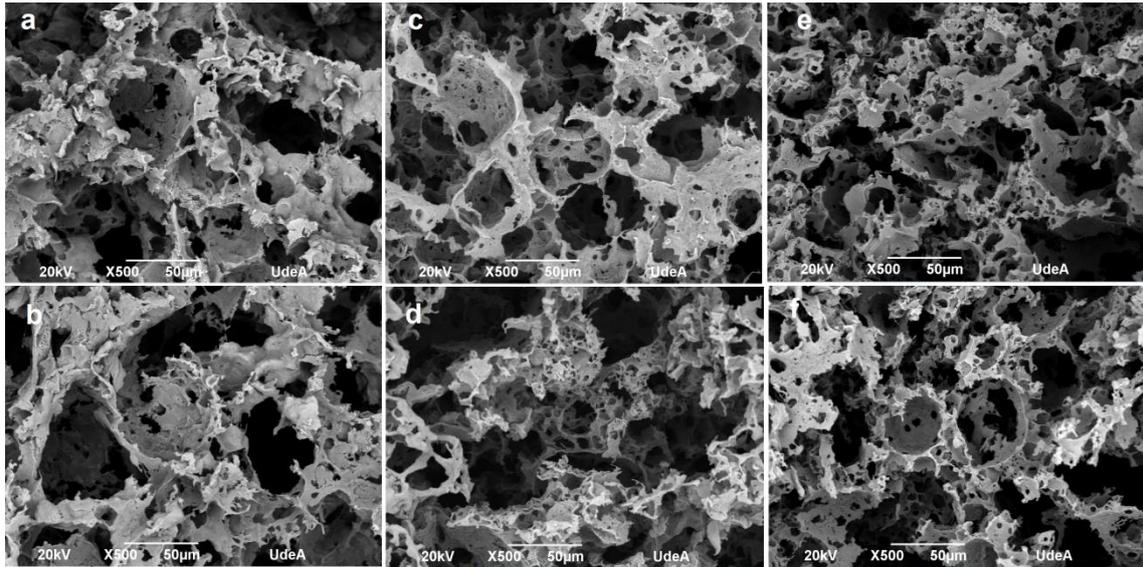


Fig. 36. Micrografías SEM a) y b) 5 % de PHA, corte lateral y transversal respectivamente, c) y d) 7,5 % de PHA, corte lateral y transversal respectivamente, y e) y f) 10 % de PHA, corte lateral y transversal respectivamente.

La distribución de tamaño de poro se presenta en la Fig. 38, donde se observa que no existe una diferencia significativa entre los tratamientos, ya que todos tienen una mayor cantidad de poros con diámetros entre 59 y 94 μm , la única tendencia apreciable que no es realmente significativa es que a mayor porcentaje de agua, hay más poros de mayor tamaño, esto debido probablemente a que el tergitol presenta un límite de solubilidad del agua y por tanto las zonas de agua dentro de la solución aumentan de tamaño conforme aumenta el reactivo.

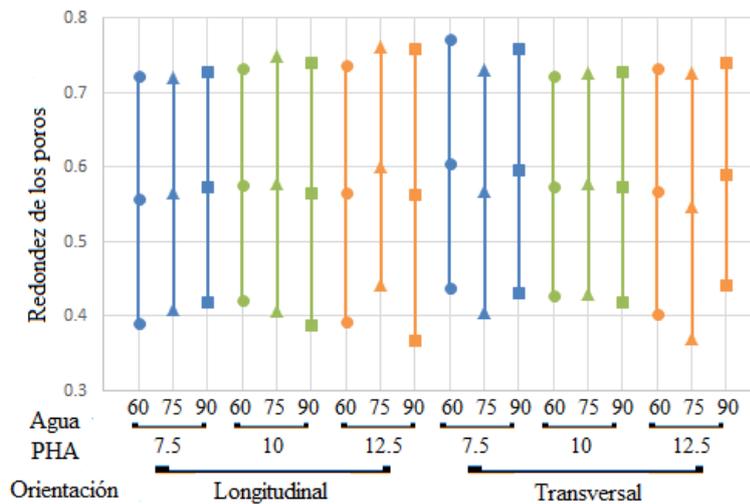


Fig. 37. Promedio y desviación estándar del valor de redondez de poro, donde las líneas azules corresponde a PHA 7.5 %, las verdes a PHA 10 % y las naranjas a PHA 12.5 %, los marcadores redondos corresponden a agua 60 %, los triangulares a agua 75 % y los cuadrados a agua 90 %, finalmente la gráfica está dividida en corte longitudinal y transversal del scaffold.

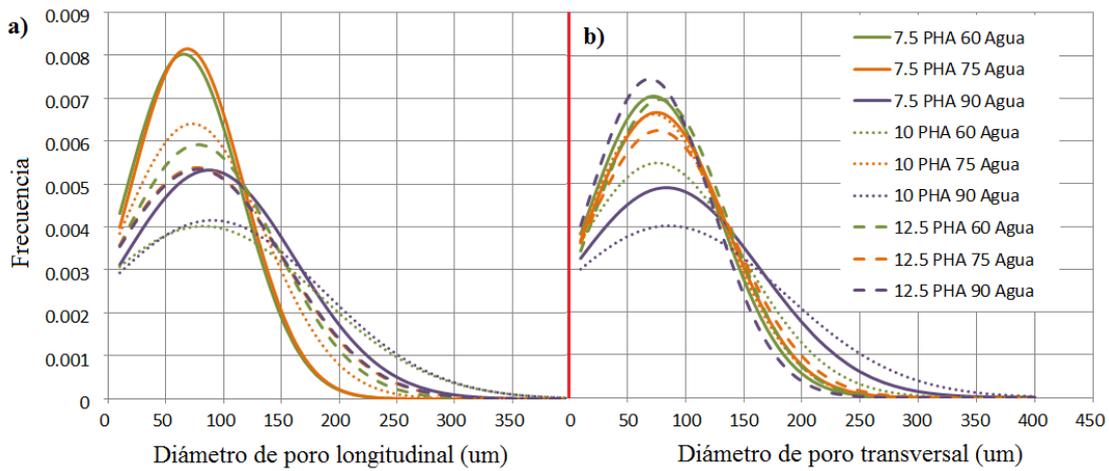


Fig. 38. Gráfico de densidad de los diámetros de poro, donde se visualiza la distribución del tamaño de poro en cada tratamiento.

En la Fig. 39 la tendencia de las medias con respecto al agua es variable y depende del valor de porcentaje de PHA presente, es decir, para el nivel PHA 7.5 % la tendencia es positiva, lo que implica que a medida que se incrementa el valor del agua se incrementa el valor de la variable respuesta (Tamaño de poro), para el nivel de PHA 10 % la tendencia se comporta como una campana invertida, donde la muestra con 75 % de agua presentó los tamaños de poro más pequeños del experimento, y las muestras con 12.5 % de PHA, si bien tienden a tener un comportamiento negativo, las barras de error se solapan entre si mostrando que al parecer no hay diferencias significativas entre estos datos, por tanto los efectos de los factores deben ser verificados con una prueba ANOVA, las tendencias apreciables en las gráficas dan cuenta de que el comportamiento depende del nivel de los factores y no solo de los factores ya que el agua puede tener un efecto positivo, negativo o de campana invertida frente a la variable respuesta dependiendo del nivel de PHA.

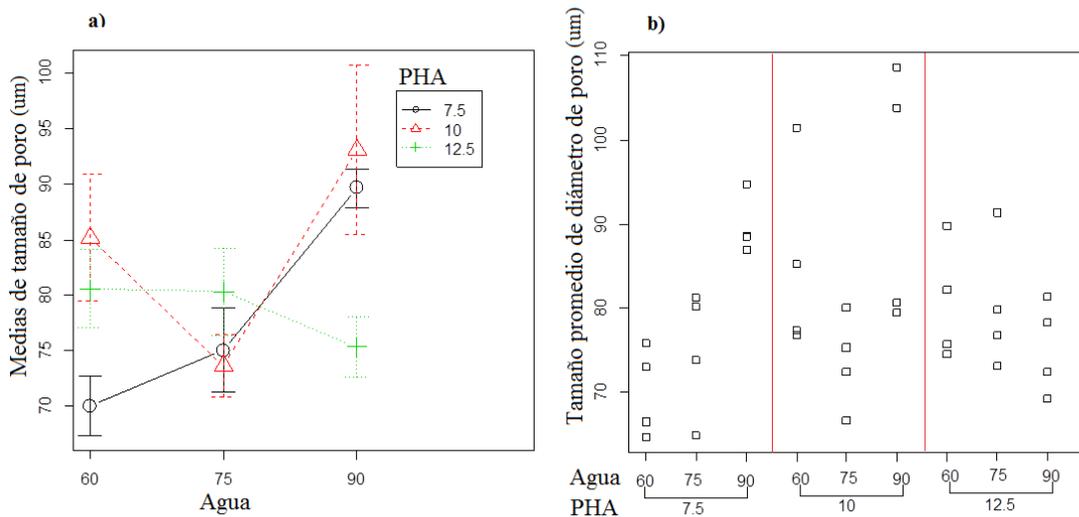


Fig. 39. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de diámetro de poro.

A pesar del dato atípico el diagrama de cajas y bigotes de la Fig. 40, se observa una distribución semi-simétrica que puede indicar comportamiento normal en la distribución de datos, el histograma refuerza esa observación y presenta un sesgo positivo, la gráfica de cuantiles presenta dos datos por fuera del intervalo de confianza, para concluir sobre la normalidad se debe hacer una prueba numérica.

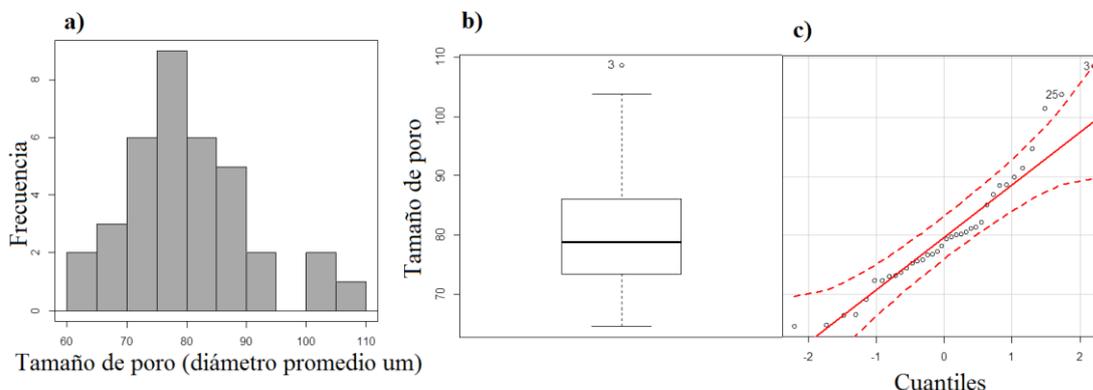


Fig. 40. Normalidad de los datos de diámetro de poro, a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.

Para corroborar el comportamiento de la distribución de datos, se utilizó la prueba numérica Shapiro-Wilk, cuya hipótesis nula es:

$$H_0 = \text{Las muestras tienen distribución normal}$$

Y se tomó como valor de nivel de confianza: $\alpha=0.03$

En la prueba de Shapiro-Wilk (ver Tabla 11) el valor-p es mayor que α , por tanto se acepta la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen una distribución normal.

Tabla 111. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes al tamaño de poro.

Prueba de Shapiro-Wilk
Valor-p=0.031

Para verificar que los tratamientos tienen diferencias significativas con respecto a la variable respuesta se realiza un análisis ANOVA, cuyas hipótesis están planteadas en la metodología.

El valor de suma de cuadrados de los residuales presente en la Tabla 12 es mayor que los otros valores de suma de cuadrados, lo que significa que la diferencia en la variable respuesta se debe a los factores evaluados y a otros no controlables.

El valor-p del factor PHA es mayor que el nivel de confianza por tanto no es significativo para la variable respuesta, sin embargo, su interacción con el factor agua si tiene efecto significativo sobre esta, por tanto es un factor que debe considerarse de importancia.

Tabla 12. Tabla ANOVA de los datos de tamaño de poro.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Agua	621.85	2	4.40	0.02
PHA	243.33	2	1.72	0.20
Agua : PHA	1054.39	4	3.73	0.01
Residuales	1908.12	27		

Para validar la tabla ANOVA se deben corroborar los tres supuestos sobre los residuales detallados en la metodología, para estos el software R arrojó los resultados presentes en la Tabla 13:

Tabla 13. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de tamaño de poro.

Supuesto	Prueba	Valor-p	Conclusión
Normalidad	Shapiro-Wilk	0.74	Los residuales tienen una distribución normal
Homoscedasticidad	Bartlett	0.37	Las varianzas de los residuales son iguales
Independencia	Durbin-Watson	0.26	Los residuales son independientes

Análisis:

Los supuestos del ANOVA permiten hacer conclusiones sobre los resultados obtenidos con un 97 % de confianza, en dicho análisis se observa que el factor agua y la interacción de los factores PHA y agua son más significativos que el factor PHA en la variable respuesta (tamaño de poro), esto quiere decir que la variación del porcentaje de PHA fue muy pequeña para influir en el diámetro promedio del poro, en cambio la diferencia en la cantidad de agua utilizada en la fabricación de los scaffolds fue determinante en el tamaño promedio de poro, y aunque la tendencia no es clara, el valor más alto de tamaño de poro corresponde a 90 % de agua y el más bajo a 60 %, esto se debe posiblemente a que el aumento del solvente incrementa los espacios de separación entre las partículas poliméricas, y por lo tanto se presentan poros con mayor diámetro. La redondez de los poros y la distribución de su tamaño no tuvieron diferencias significativas entre los tratamientos.

Los valores de tamaño de poro obtenido en los scaffolds son adecuados para la aplicación de cartílago articular, ya que los condrocitos tienen un tamaño que varía entre 5 y 30 μm [171], [172].

b. Porosidad

El porcentaje de porosidad da cuenta de la capacidad del scaffold para albergar células y permitir el flujo de nutrientes y desechos celulares; este valor fue determinado con el método de Arquímedes, en la Tabla 14 se presentan los valores obtenidos con este método representados en el valor promedio y la desviación estándar de los datos.

En la Fig. 41 a), la tendencia de las medias con respecto al agua es positiva, es decir, a medida que se incrementa el valor del agua se incrementa el valor de la variable respuesta (porosidad), excepto por los datos arrojados por el nivel PHA 7.5 %, para el PHA la tendencia inicia siendo positiva y finaliza siendo negativa; la tendencia general del experimento es esperable ya que el polímero conforma las paredes de los poros y entre más gruesas o mayor cantidad

de estas, menores serán las cavidades internas. Debido a que las barras de error no se solapan se puede inferir que los datos parecen tener diferencias significativas.

Tabla 14. Datos obtenidos de porcentaje de porosidad en los scaffolds.

Porcentaje de PHA	Porcentaje de Agua	Valor promedio de porcentaje de porosidad	Desviación estándar
7.5	60	94.46	0.10
	75	96.11	0.15
	90	91.74	0.49
10	60	92.78	0.50
	75	94.46	0.32
	90	94.89	0.66
12.5	60	89.56	0.32
	75	92.58	0.55
	90	93.94	0.20

La inclinación de las líneas que conectan las medias indica que parece haber un efecto de ambos factores sobre la variable respuesta, a excepción de un punto en el nivel PHA 7.5 % y agua 90 %, los efectos son positivos (a mayor porcentaje de agua, mayor porcentaje de porosidad), no se aprecia de forma significativa que un factor pueda tener mayor influencia que el otro.

En la Fig. 41 b), están representados los datos de la Tabla 14 obtenidos de la fase experimental.

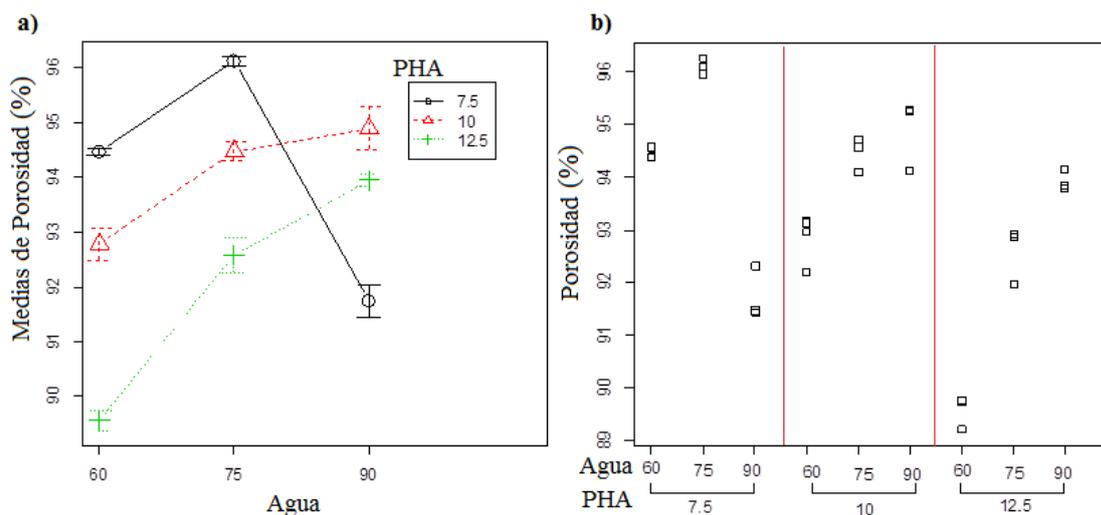


Fig.41. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de porcentaje de porosidad.

En la Fig. 42, el histograma (a) presenta una distribución de los datos aparentemente normal con un sesgo negativo (a la izquierda) que es corroborado en el diagrama de cajas (b), este también da cuenta de que la distribución de datos no es simétrica debido a que la línea media no está en medio de la gráfica, sin embargo, esto no significa que la distribución

no sea normal, la gráfica de cuantiles (c) presenta un dato por fuera del intervalo de confianza lo cual puede indicar anormalidad en la distribución de los datos, para concluir sobre la normalidad se debe hacer una prueba numérica, es este caso se presenta la prueba de Shapiro-Wilk.

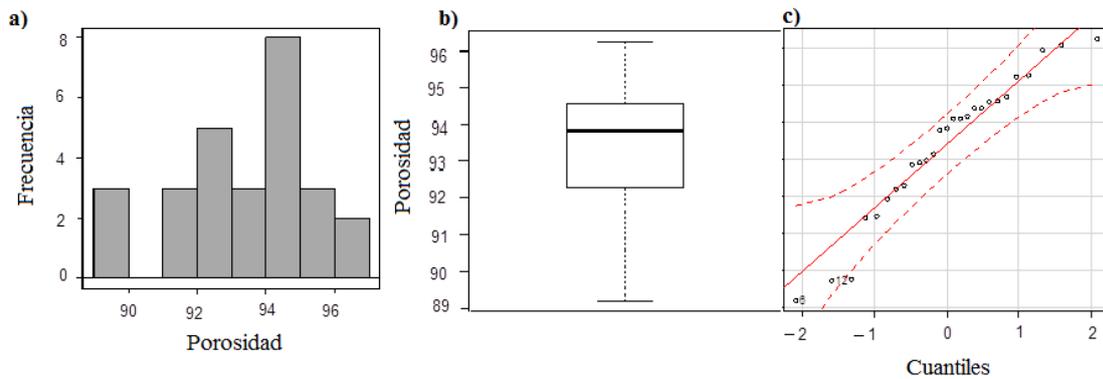


Fig. 422. Normalidad de los datos de porcentaje de porosidad, a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.

Para la prueba de Shapiro-Wilk se plantea la siguiente hipótesis nula:

$$H_0 = \text{Las muestras tienen distribución normal}$$

Se tomó como valor de nivel de confianza: $\alpha=0.03$

En la prueba de Shapiro-Wilk (ver Tabla 15) el valor-p es mayor que α , por tanto no se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen una distribución normal.

Tabla 15. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes al porcentaje de porosidad.

Test de Shapiro-Wilk
Valor-p=0.17

Para verificar que los tratamientos tienen diferencias significativas con respecto a la variable respuesta se realiza un análisis ANOVA, cuyas hipótesis están planteadas en la metodología.

El valor de la suma de cuadrados de los residuales en la Tabla 16 es menor que los demás valores de la columna, lo que significa que la diferencia en el efecto de los factores sobre la variable respuesta se debe solo a los factores evaluados y no a otras variables no controlables. Además, todos los valores- p de los factores son menores que 0.03 (valor de α) entonces los factores individuales y la interacción de estos son significativas.

Para validar la tabla ANOVA se deben corroborar los tres supuestos sobre los residuales detallados en la metodología, para estos el software R arrojó los resultados presentes en la Tabla 17.

Tabla 16. Tabla ANOVA de los datos de porcentaje de porosidad.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Agua	20.42	2	60.87	9.77×10^{-9}
PHA	25.12	2	74.87	1.89×10^{-9}
Agua : PHA	46.39	4	69.13	1.12×10^{-10}
Residuales	3.02	18		

Tabla 17. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de porosidad.

Supuesto	Prueba	Valor-p	Conclusión
Normalidad	Shapiro-Wilk	0.30	Los residuales tienen una distribución normal
Homoscedasticidad	Bartlett	0.41	Las varianzas de los residuales son iguales
Independencia	Durbin-Watson	0.13	Los residuales son independientes

Análisis:

La tabla ANOVA arrojó valores de alta significancia para todos los factores evaluados, por tanto se puede decir con 97 % de confianza que tanto el agua como el PHA y la interacción de ambos fueron decisivos en las respuestas obtenidas de porosidad, en general la mayor cantidad de agua provocó un aumento en la porosidad ya que esta fue eliminada del scaffold dando paso a la aparición de poros, y a mayor cantidad de PHA disminuyó la porosidad ya que esta debió aumentar la cantidad o el espesor de las paredes de los poros. Los scaffolds con 7.5 % de PHA y 90 % de agua fueron una excepción, ya que presentó un valor significativamente bajo en porosidad para lo esperado, es posible que la menor cantidad de polímero y mayor cantidad de agua hayan debilitado la muestra y esta haya tenido microcolapsos disminuyendo la porosidad presente, los cuales debieron ocurrir en poros pequeños ya que este efecto no se ve reflejado en el diámetro de los poros, aun así cabe recalcar que los valores de porosidad oscilan entre 89 y 96 %, y una alta porosidad permite transportar oxígeno, nutrientes y metabolitos de desecho dentro y fuera del scaffold [157] lo cual favorece la migración, adhesión, proliferación y diferenciación celular, que son propiedades altamente deseadas para aplicaciones de ingeniería de tejidos IT [173], [174].

El tamaño de poro y la porosidad no tienen una relación aparente, ya que el tamaño del poro depende principalmente del porcentaje de agua y con una tendencia diferente para cada porcentaje de PHA.

Desde el punto de vista morfológico, todos los resultados alcanzados ofrecen una buena alternativa para el propósito del trabajo, ya que la alta porosidad y el tamaño de poro obtenido en todas las unidades experimentales pueden permitir el paso de condrocitos debido a su tamaño (5-30 μm) [171], [172]. Nava et al. evaluaron el efecto del diámetro de poro en la proliferación de condrocitos, en un scaffold para remplazo de cartílago, en la proliferación de condrocitos; el rango de tamaño que utilizaron fue de 75 a 175 μm y encontraron que a pesar de que los poros de mayor tamaño facilitaban el transporte de oxígeno, nutrientes y desechos, incrementando así la densidad celular, también permitía una adhesión celular 2D en las paredes del scaffold, disminuyendo la actividad metabólica, GAG y constituyentes específicos de colágeno; de acuerdo a estos resultados concluyeron que los poros menores (75 μm) pueden arrojar mejores resultados en la regeneración del cartílago articular [175]. En la investigación presentada en este documento,

se obtuvieron mayores frecuencias de poros de tamaños entre 59 y 94 μm , tanto en cortes longitudinales como transversales de los scaffolds, por lo tanto estos cumplen con los tamaños de porosidad ideal para la proliferación y desarrollo de la actividad metabólica de los condrocitos, según los reportes de la literatura encontrados.

6.2.2. Pruebas mecánicas

Aquí se detallan dos variables respuesta: resistencia máxima a la compresión y módulo de elasticidad.

a. Resistencia máxima a la compresión

Para determinar la resistencia máxima a la compresión y el módulo de elasticidad se utilizó el ensayo de compresión en una máquina universal de ensayos. Los datos obtenidos en la fase experimental son presentados en la Tabla 18 a través de valores promedio y desviación estándar de los datos, los cuales son explicados en la Fig. 44.

Tabla 18. Datos obtenidos de resistencia máxima a la compresión en los scaffolds.

Porcentaje de PHA	Porcentaje de Agua	Valor promedio de resistencia máxima a la compresión (MPa)	Desviación estándar
	60	0.15	0.01
7.5	75	0.07	0.03
	90	0.12	0.02
	60	0.25	0.01
10	75	0.22	0.005
	90	0.11	0.02
	60	0.30	0.05
12.5	75	0.30	0.01
	90	0.17	0.01

En la Fig.43 se observan los resultados promedios obtenidos al realizar el ensayo de compresión en cada una de las formulaciones. El porcentaje de agua utilizado en la formulación está representado en el color de la línea de tendencia, donde las líneas azules representan el 60 % de agua, las rojas en 75 % y las negras el 90 %, la tendencia en este caso no es clara ya que a pesar de que las líneas negras y azules (60 y 90 %) parecen indicar que a mayor cantidad de agua menor resistencia a la compresión, las líneas rojas pertenecientes al 75 % de agua corresponden a la muestra más débil y más fuerte del experimento. La forma de la línea da cuenta del porcentaje de PHA, los puntos corresponden a 7.5 %, la línea discontinua a 10 % y la línea continua a 12.5 %, en este caso la tendencia es más clara ya que a mayor cantidad de PHA presente en la muestra, mayor es su resistencia a la compresión.

Para comprender la interacción que existe entre los factores con respecto a la variable respuesta: “Resistencia máxima a la compresión”, se utilizaron los valores de la resistencia ofrecida por las muestras a 75 % de deformación.

En la Fig. 44, la tendencia de las medias con respecto al agua en general es negativa, es decir, a medida que se incrementa el valor del Agua disminuye el valor de la variable respuesta (Resistencia máxima a la compresión), excepto por los

datos arrojados por PHA 7.5 %, el cual tiene forma de campana invertida, para el PHA la tendencia es difícil de determinar, pero considerando el comportamiento de los dos primeros porcentajes (60 y 75 %) es positiva ya que a mayor porcentaje de PHA mayor porcentaje de resistencia máxima, sin embargo, el factor 90 % PHA no se comporta como la tendencia en general.

La presencia de líneas inclinadas entre las medias indica que parece haber un efecto de ambos factores sobre la variable respuesta, pero no se aprecia de forma significativa que un factor pueda tener mayor influencia que el otro.

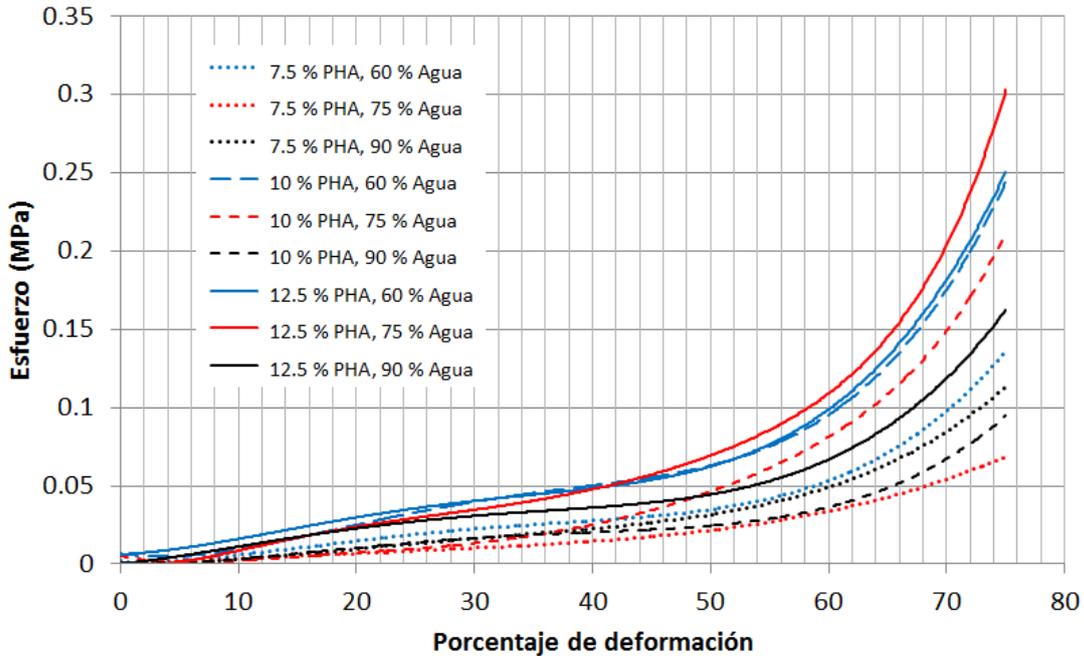


Fig. 43. Líneas de tendencia de la curva esfuerzo vs deformación más representativa de cada formulación, donde la forma da cuenta del porcentaje de agua y el color del porcentaje de PHA.

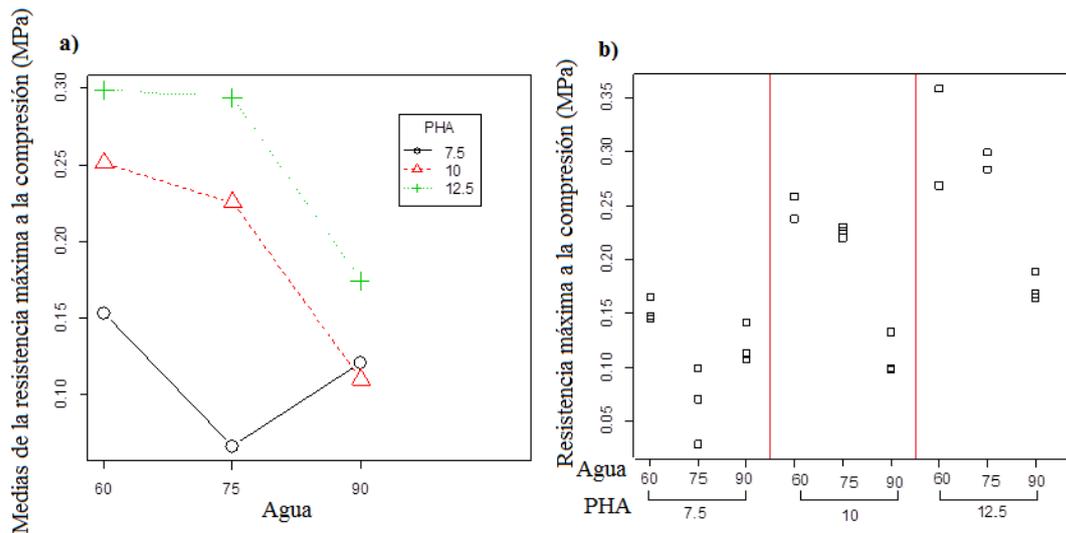


Fig. 44. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de resistencia máxima a la compresión.

El histograma de la Fig. 45 presenta una distribución de los datos aparentemente bimodal, con un sesgo negativo (izquierda) y no simétrica, aun así, el diagrama de cajas da cuenta de una distribución de datos bastante simétrica y la gráfica de cuantiles no presenta datos por fuera del intervalo de confianza porque lo que los datos parecen tener una distribución normal, para concluir sobre la normalidad se debe hacer una prueba numérica, para ella se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk.

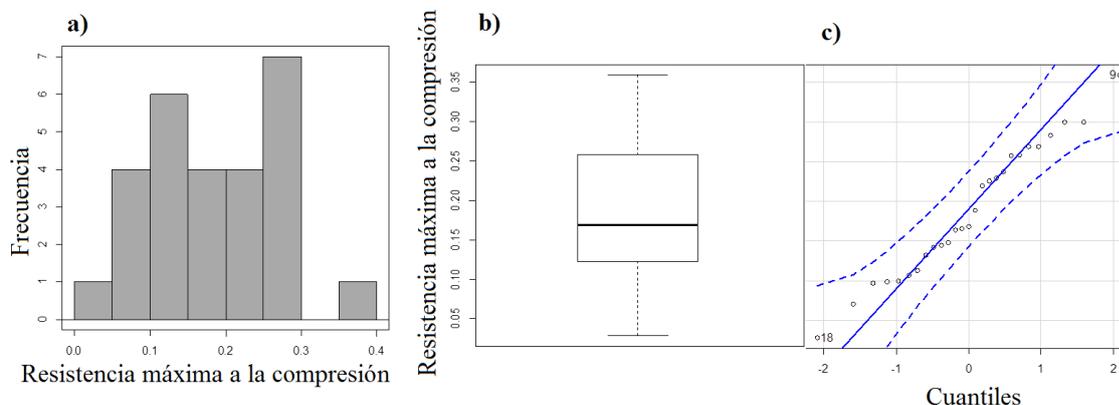


Fig. 45. Normalidad de los datos de resistencia máxima a la compresión a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles

Para el método numérico se plantea hipótesis nula:

$$H_0 = \text{Las muestras tienen distribución normal}$$

Se tomó como valor de nivel de confianza: $\alpha=0.03$

En la prueba de Shapiro-Wilk (ver Tabla 19) el valor-p es mayor que α , por tanto no se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos tienen una distribución normal

Tabla 192. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes a la resistencia máxima a la compresión.

Test de Shapiro-Wilk
Valor-p=0.68

Para verificar que los tratamientos tienen diferencias significativas con respecto a la variable respuesta se realiza un análisis ANOVA, cuyas hipótesis están planteadas en la metodología.

El valor de la suma de cuadrados de los residuales en la Tabla 20 es menor que los demás valores de la columna, lo que significa que la diferencia en el efecto de los factores sobre la variable respuesta se debe solo a los factores evaluados y no a otras variables no controlables. Además, todos los valores- p de los factores son menores que 0.03 (valor de α) entonces los factores individuales y la interacción de estos son significativas.

Para validar la tabla ANOVA se deben corroborar los tres supuestos sobre los residuales detallados en la metodología, para estos el software R arrojó los resultados presentes en la Tabla 21.

Tabla 20. Tabla ANOVA de los datos de resistencia máxima a la compresión.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Agua	0.04	2	38.99	2.87x10 ⁻⁷
PHA	0.09	2	79.33	1.18 x10 ⁻⁹
Agua : PHA	0.03	4	13.09	3.60 x10 ⁻⁵
Residuales	0.01	18		

Tabla 21. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de resistencia máxima a la compresión.

Supuesto	Prueba	Valor-p	Conclusión
Normalidad	Shapiro-Wilk	0.14	Los residuales tienen una distribución normal
Homoscedasticidad	Bartlett	0.11	Las varianzas de los residuales son iguales
Independencia	Durbin-Watson	0.45	Los residuales son independientes

Análisis:

En general, los resultados de resistencia máxima a la compresión indican que a mayor cantidad de PHA presente en la muestra, mayor es su resistencia mecánica, lo cual es esperable ya que la cantidad de polímero aumenta el número de paredes de los poros o su espesor (este fenómeno fue concluido en los resultados de porosidad), también indica que a mayor cantidad de agua presente en la muestra menor es la resistencia a la compresión, lo cual puede deberse a que la cantidad de agua presente este directamente relacionada al aumento de porosidad y por tanto aumentan los espacios vacíos dentro de la muestra y generando debilidad estructural dentro del scaffold; según los resultados de la tabla ANOVA ambos factores y su interacción son altamente influyentes en la variable respuesta.

En los resultados de resistencia máxima a la compresión el nivel de 7.5 % de PHA tiene un comportamiento diferente de las demás muestras experimentales, podría pensarse que uno de los dos últimos puntos presenta una diferencia de conformación significativa (75 % o 90 % de agua), pues no es clara la identificación de la unidad experimental diferente, sin embargo, comparando con los resultados de morfología, se observa que el valor de 90 % de agua tiende a seguir el comportamiento general de las demás unidades experimentales, así que es posible que la interacción entre 7.5 % de PHA y 75 % de agua permite la modificación del fenómeno esperado.

Comparando la tendencia general de los resultados se pueden comenzar a hacer asociaciones, a menor cantidad de material presente en el scaffold final (mayor cantidad de agua y menor cantidad de polímero), la muestra presenta mayor porosidad y menor resistencia a la compresión, ya que la mayor cantidad de paredes de los poros o mayor espesor de estas más estable es la estructura.

El cartílago articular presenta resistencias a la compresión entre 0.5 y 7.7 MPa dependiendo de la zona evaluada [9], [176] y las unidades experimentales evaluadas presentaron valores desde 0.028 hasta 0.299 MPa, que son pequeños en comparación con el cartílago nativo, sin embargo, muchos autores reportan con éxito valores de resistencia a la compresión de scaffolds destinados a reemplazar o regenerar tejidos inferiores a los valores obtenidos en los tejidos nativos, debido a que *in situ* existen otras características ambientales que fortalecen el scaffold, como la invasión celular y su segregación de matriz extracelular sobre el scaffold, es así como en la literatura se encuentran valores desde 0.1

MPa [9], [176] como exitosos para scaffolds en el reemplazo de cartílago articular, algunos valores más altos encontrados han reportado mezclas de PHA como por ejemplo PVA y gelatina [177] alcanzando valores de 0.4 MPa que pueden estar condicionados por los otros elementos presentes, por lo tanto los materiales que presentaron los mejores resultados en este experimento pueden ser utilizados en la regeneración de cartílago articular, no obstante, también se han reportado valores mayores como 10 MPa [178] con éxito.

En este experimento se descartan por sus bajos valores de resistencia a la compresión, todos los scaffolds con 7.5 % de PHA y el scaffold 10 % PHA y 90 % agua, sin embargo, continuarán en el resto de las variables respuesta para facilitar en análisis del efecto de los factores en cada una de estas.

b. Módulo de elasticidad

Los datos experimentales obtenidos para el módulo de elasticidad fueron tomados del ensayo de compresión y se presentan en la Tabla 22.

En la Fig. 46, la tendencia de las medias con respecto al agua en general es negativa, es decir, a medida que se incrementa el valor del agua disminuye el valor de la variable respuesta (módulo de elasticidad), excepto los primeros dos datos arrojados por PHA 7.5 % (60 y 75 % de agua), para el PHA la tendencia es clara, a mayor cantidad de polímero mayor es el módulo de elasticidad.

La presencia de líneas inclinadas entre las medias indica que parece haber un efecto de ambos factores sobre la variable respuesta, pero no se aprecia de forma significativa que un factor pueda tener mayor influencia que el otro.

Tabla 22. Datos obtenidos de módulo elástico en los scaffolds (MPa).

Porcentaje de PHA	Porcentaje de agua (%)	Valor promedio de módulo elástico	Desviación estándar
	60	0.06	0.02
7.5	75	0.07	0.02
	90	0.04	0.04
10	60	0.11	0.03
	75	0.10	0.02
	90	0.05	0.01
12.5	60	0.20	0.04
	75	0.12	0.04
	90	0.12	0.06

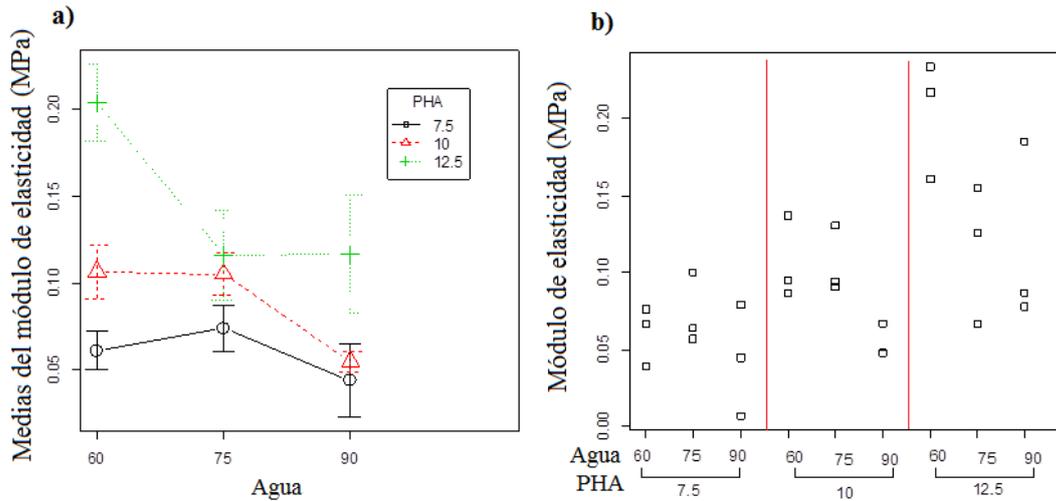


Fig. 463. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de módulo de elasticidad.

El histograma de la Fig. 47 presenta una distribución de los datos poco simétrica con un sesgo positivo (derecha), incluso en diagrama de cajas presenta un dato atípico correspondiente al punto 10 % PHA y 60 % agua y el gráfico de cuantiles tiene un dato fuera del intervalo de confianza lo que hace sospechar de una distribución no-normal de los datos, para corroborarlo se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk.

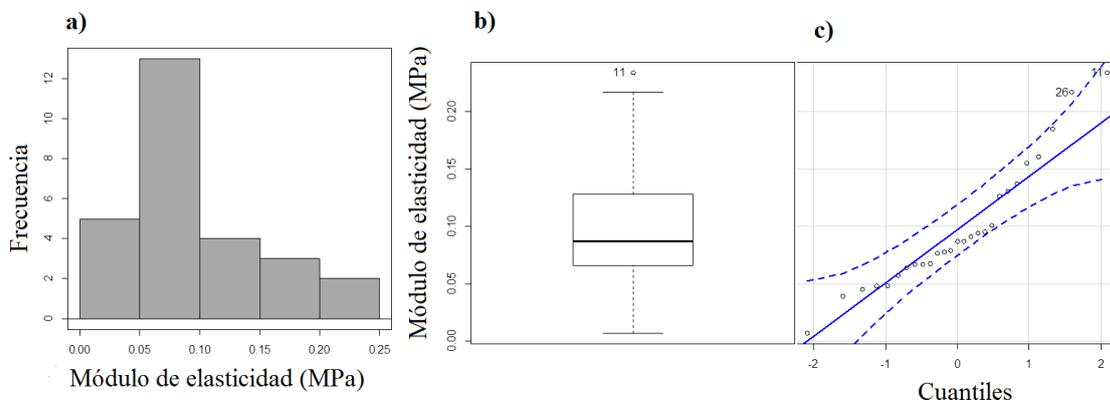


Fig. 47. Normalidad de los datos de módulo de elasticidad a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.

Para el método numérico se plantea hipótesis nula:

$$H_0 = \text{Las muestras tienen distribución normal}$$

Se tomó como valor de nivel de confianza: $\alpha=0.03$

El valor-p de ambas pruebas en la Tabla 23 es mayor que el valor de $\alpha= 0.03$, por tanto se acepta la hipótesis nula de que los datos tienen una distribución normal.

Tabla 23. Prueba de Shapiro-Wilk para corroborar la normalidad de los datos correspondientes al módulo de elasticidad.

Test de Shapiro-Wilk
Valor-p=0.04

Para verificar que los tratamientos tienen diferencias significativas con respecto a la variable respuesta se realiza un análisis ANOVA, cuyas hipótesis están planteadas en la metodología.

El valor de la suma de cuadrados de los residuales en la Tabla 24 no es menor que los demás valores de la columna, lo que significa que la diferencia en el efecto de los factores sobre la variable respuesta se debe a los factores evaluados y a la presencia de otras variables no controlables. Todos los valores- p de los factores son menores que 0.03 (valor de α), menos la interacción de los factores, entonces solo los factores individuales son significativos.

Tabla 24. Tabla ANOVA de los datos de módulo de elasticidad.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Agua	0.01	2	5.22	0.02
PHA	0.03	2	14.71	1.64×10^{-4}
Agua : PHA	0.01	4	2.08	0.13
Residuales	0.02	18		

Para validar la tabla ANOVA se deben corroborar los tres supuestos sobre los residuales detallados en la metodología, para estos el software R arrojó los resultados presentes en la Tabla 25:

Tabla 25. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de módulo de elasticidad.

Supuesto	Prueba	Valor-p	Conclusión
Normalidad	Shapiro-Wilk	0.84	Los residuales tienen una distribución normal
Homoscedasticidad	Bartlett	0.64	Las varianzas de los residuales son iguales
Independencia	Durbin-Watson	0.77	Los residuales son independientes

Análisis:

Los resultados de la tabla ANOVA permiten asegurar con un 97 % de confianza que los factores de forma independiente fueron decisivos en el comportamiento del módulo de elasticidad, a mayor cantidad de agua menor módulo de elasticidad debido a que en las zonas donde en un principio se aloja el agua carecen de soporte estructural en el ensayo mecánico, y a mayor cantidad de PHA mayor módulo de elasticidad debido a que el polímero constituye la estructura física del scaffold. El comportamiento obtenido tiene la misma tendencia que la resistencia máxima a la compresión, ya que el material se comporta con la misma tendencia durante todo el ensayo mecánico y el incremento progresivo de la diferencia de esfuerzo se debe a que a mayor compactación menos poros soportan el esfuerzo; por tanto la relación que tiene esta variable respuesta con las variables morfológicas es la misma que se analizó para la resistencia máxima

a la compresión, es decir, a mayor cantidad de material presente en el scaffold final, mayor porosidad y menor resistencia mecánica en general.

El comportamiento del nivel 7.5 % de PHA tiene un comportamiento ligeramente diferente a los demás niveles del experimento, sin embargo, en la resistencia máxima a la compresión este valor fue descartado.

En la literatura se reportan valores del módulo de elasticidad natural del cartílago desde 0.007 hasta 1.84 MPa [179], [180] dependiendo de la zona en que es medido, y los resultados del experimento oscilan entre 0.02 y 0.35 MPa, por tanto el material se encuentra dentro de un rango que le permite obtener un buen desempeño e indica que es posible personalizar la variable respuesta en un amplio rango de zonas en el tejido natural.

Desde el punto de vista mecánico, los resultados obtenidos son similares a los resultados reportados por la literatura como exitosos, ya que la resistencia mecánica final incluye invasión celular, matriz extracelular secretada y fluidos corporales que refuerzan la estructura sintética.

6.2.3. Pruebas de estabilidad

Aquí se detallan dos variables respuesta: porcentaje de pérdida de peso y porcentaje de incremento de peso, en dos pruebas: una prueba de degradación hidrolítica y una prueba de absorción.

a. Prueba de degradación hidrolítica

La prueba de degradación hidrolítica permite calcular la velocidad de degradación de la muestra tentativa en el cuerpo humano, para ello se sigue el protocolo descrito en la metodología, y se obtuvieron los datos presentados en la Tabla 26.

En la prueba de degradación se tiene como factor adicional el tiempo, así que pueden analizarse tres interacciones observables en la Fig. 48, la primera de ellas (a) corresponde a la relación PHA-agua donde se observan interacciones positivas, negativas e indefinidas ya que dependiendo del porcentaje de PHA presente en la muestra, la influencia del agua en la degradación varía sin tendencia definida, los factores analizados con respecto al tiempo presentan tendencias más claras, la interacción PHA-tiempo (b) presenta un solo par de barras de error solapadas, indicando que tienen diferencias significativas y se puede observar como la degradación tiende a aumentar en el tiempo, el valor del PHA inferior (7.5 %) fue el que mayor porcentaje de degradación presentó y el valor medio (10 %) el que presentó menor porcentaje y para el día veintiocho en la muestra de 12.5 % de PHA parece presentar una recuperación de la masa (posible deposición de sales) que no es posible determinar ya que las muestras experimentales fueron distintas para cada día, además las barras de error son significativas; con respecto a la relación agua-tiempo (c) las barras están muy solapadas impidiendo determinar diferencias significativas entre ellas, cabe rescatar que se evidencia un aumento en el porcentaje de degradación con respecto al tiempo.

Tabla 26. Datos obtenidos de degradación hidrolítica en los scaffolds.

Porcentaje de PHA	Porcentaje de agua	Valor promedio de porcentaje de degradación en el día 7	Desviación estándar	Valor promedio de porcentaje de degradación en el día 14	Desviación estándar
	60	30.22	4.35	51.29	4.61
7.5	75	21.30	16.02	33.06	12.62
	90	43.16	8.73	47.61	1.86
	60	2.71	0.79	4.34	1.56
10	75	1.04	0.48	6.28	2.47
	90	4.92	0.23	20.76	7.87
	60	27.40	2.66	48.07	1.47
12.5	75	19.14	6.83	37.16	15.77
	90	15.85	2.54	27.79	4.80

Porcentaje de PHA	Porcentaje de agua	Valor promedio de porcentaje de degradación en el día 21	Desviación estándar	Valor promedio de porcentaje de degradación en el día 28	Desviación estándar
	60	53.02	4.18	54.03	3.467
7.5	75	46.48	3.72	46.09	2.96
	90	55.43	6.05	51.13	1.44
	60	2.98	1.32	3.81	0.96
10	75	17.18	0.67	14.15	3.97
	90	11.79	0.69	14.63	10.88
	60	45.73	5.39	52.44	1.28
12.5	75	51.07	1.49	51.43	3.14
	90	39.92	3.88	6.44	2.15

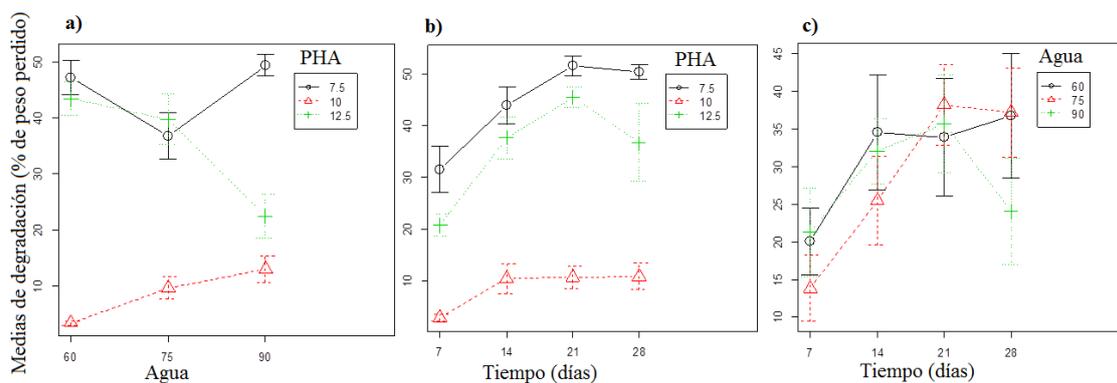


Fig. 48. Gráficos de medias de porcentaje de degradación, a) en el tiempo con respecto al factor PHA, b) en el tiempo con respecto al factor agua y c) del factor agua con respecto al factor PHA.

Con respecto al tiempo en la Fig. 49 se observa que ambos factores tuvieron un efecto que se hace menos evidente en las muestras con PHA 10 % debido a la semi-colinealidad de sus puntos y solapamiento de sus barras de error. En

general todas las unidades experimentales tienden a mostrar un aumento en la pérdida de masa en el tiempo, que parece estabilizarse a los veintiún días de exposición, esta estabilización puede deberse realmente a una deposición de sales en la superficie del material que tiende a ser mayor al 90 % de agua. El 10 % de PHA presenta un comportamiento diferente, donde las medidas de pérdida de masa son significativamente menores y no es tan claro el aumento de esta degradación en el tiempo.

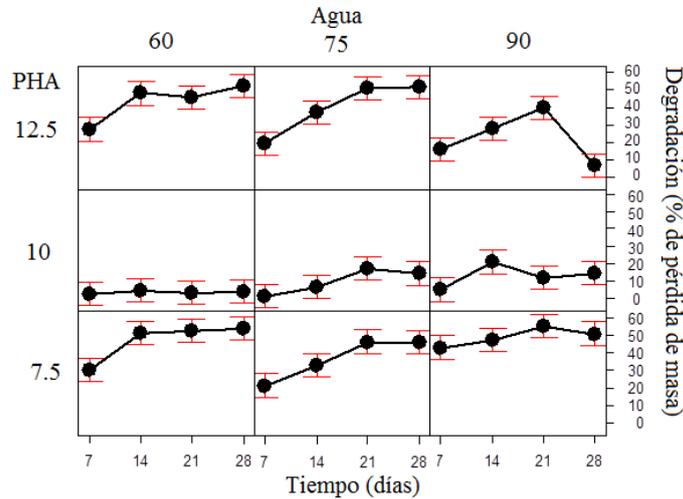


Fig. 49. Efecto de los factores en la variable respuesta de degradación de las unidades experimentales de forma individual con respecto al tiempo.

El diagrama de cajas (b) en la Fig. 50 presenta una distribución simétrica que puede corresponder a una distribución de los datos aparentemente normal, lo cual no se evidencia en el histograma (a), el cual presenta un valle en medio de los datos, la gráfica de cuantiles (c) presenta una gran cantidad de datos por fuera del intervalo de confianza lo cual es posible indicador de una distribución de datos no normal, para concluir sobre la normalidad se debe hacer una prueba numérica, para tal fin se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk.

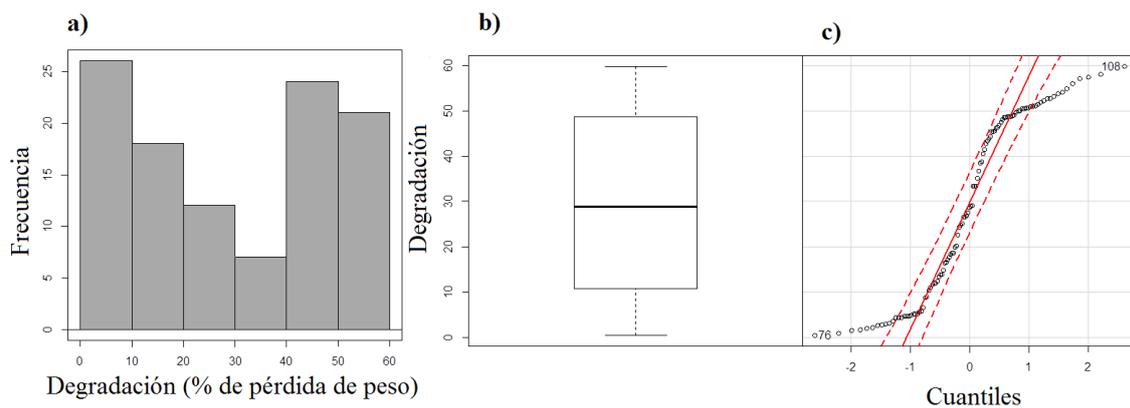


Fig. 50. Normalidad de los datos de degradación a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.

Para el método numérico se plantea hipótesis nula:

$$H_0 = \text{Las muestras tienen distribución normal}$$

Y se tomó como valor de nivel de confianza: $\alpha=0.03$

En la prueba de normalidad en la Tabla 27, el valor-p es menor que α , por tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no tienen una distribución normal. Para aceptar los datos arrojados por el ANOVA es necesario que los datos cumplan los supuestos, de no ser así se deben realizar otras pruebas que permitan determinar la validez de la prueba ANOVA.

Tabla 27. Prueba de normalidad para los datos de degradación.

Test de Shapiro-Wilk
Valor-p=2,08x10 ⁻⁰⁷

Para verificar que los tratamientos tienen diferencias significativas con respecto a la variable respuesta se realiza un análisis ANOVA, para el que se plantean dos hipótesis, la nula y la alterna

H₀= No existen diferencias entre los tratamientos

H₁= Al menos un par de tratamientos es diferente

En la Tabla 28, el valor de suma de cuadrados de los residuales es intermedio frente a los otros valores lo que indica que las diferencias entre las respuestas pueden deberse en algunos casos solo a los factores evaluados y en otros casos también a factores no controlables, sin embargo, casi todos los valores-p del ANOVA son inferiores a α , indicando que los factores y sus interacciones son significativamente diferentes, el factor agua es el único que arrojó un valor mayor que α , sin embargo, su interacción con otros factores si es significativa y por tanto es considerado de importancia en el conjunto de respuestas.

Tabla 28. Tabla ANOVA de los datos de degradación.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Agua	197.3	2	2.88	0.06
PHA	24712.1	2	361.01	2.2 x10 ⁻¹⁶
Tiempo	4754.7	3	46.31	2.2 x10 ⁻¹⁶
Agua : PHA	4441.9	4	32.44	1.87 x10 ⁻¹⁵
Agua : Tiempo	1577.1	6	7.68	2.15 x10 ⁻⁶
PHA : Tiempo	848.9	6	4.13	0.001
Agua : PHA : Tiempo	1488.0	12	3.62	0.0003
Residuales	2464.3	72		

Para validar la tabla ANOVA se deben corroborar los tres supuestos sobre los residuales detallados en la metodología, para estos el software R arrojó los resultados presentes en la Tabla 29:

En la Tabla 29 se presenta el valor-p del supuesto de independencia mayor que α por tanto se acepta la hipótesis nula y los residuales de los datos son independientes, pero no se cumplen los supuestos de distribución normal ni de varianzas iguales entonces se propuso la utilización de una prueba no para métrica denominada Wilcoxon detallada en la metodología cuyo resultado se presenta en la Tabla 30.

Tabla 29. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de degradación hidrolítica.

Supuesto	Prueba	Valor-p	Conclusión
Normalidad	Shapiro-Wilk	1.39×10^{-6}	Los residuales NO tienen una distribución normal
Homoscedasticidad	Bartlett	5.40×10^{-7}	Al menos dos varianzas de los residuales son distintas
Independencia	Durbin-Watson	0.98	Los residuales son independientes

La prueba de Wilcoxon en la Tabla 30 presentó un valor-p menor a 0.03 por tanto se rechaza la hipótesis nula y se determina que las medianas son diferentes y por tanto los valores obtenidos en la variable respuesta son significativos.

Tabla 30. Prueba no paramétrica de Wilcoxon para los residuales de degradación.

Prueba de Wilcoxon
Valor-p= 2.2×10^{-16}

Análisis:

La prueba Wilcoxon permite asegurar que los resultados obtenidos son confiables y la influencia de los factores es significativamente diferente sobre la variable respuesta. En el caso de la degradación se debe incluir un factor extra, ya que la prueba se realiza a lo largo del tiempo y esta variable influye en la gráfica de medias entre el PHA y el agua, por tanto esta es una posible razón para el comportamiento errático, donde dependiendo del valor de PHA la tendencia es positiva (10 %), negativa (12.5 %) o en forma de campana invertida (7.5 %), aun así, es de resaltar los bajos valores de degradación presentes (además de estables en el tiempo) a 10 % de PHA con respecto a los otros niveles, se podría asumir que existe un equilibrio químico que disminuye su velocidad de degradación directamente relacionado con el porcentaje de PHA (Fig. 48), este equilibrio puede deberse al área expuesta, donde el diámetro de los poros para este valor tiene campana invertida mostrando que a este valor de PHA ocurren fenómenos diversos cuando se varía el agua en el rango del experimento.

Después de la implantación, los scaffolds de PHA se degrada lentamente a la temperatura corporal y produce un metabolito no tóxico, secretado a través de la orina [157].

En la literatura se han encontrado valores de degradación del 60 % del material a los 56 días de exposición *in vivo* (ratones) [10], lo que veintidós días correspondería a aproximadamente y asumiendo una degradación lineal de 22 %, e *in vitro* valores entre 15 y 20 % para veintidós días [9], a los 21 días del experimento la única unidad experimental que se encuentra en ese rango es 10 % de PHA y 75 % de agua con un valor promedio de 17.18 %, unidad experimental que no ha sido descartada en los experimentos anteriores.

b. Prueba de absorción

Para las pruebas de absorción se siguió el protocolo descrito previamente en la metodología del cual se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 31.

Tabla 31. Datos obtenidos de absorción en los scaffolds.

Porcentaje de PHA	Porcentaje de agua	Valor promedio de porcentaje de absorción	Desviación estándar
7.5	60	575.93	9.19
	75	828.40	83.87
	90	1011.42	194.60
10	60	676.71	27.001
	75	980.95	83.75
	90	1274.07	140.11
12.5	60	1035.91	72.86
	75	827.52	122.19
	90	753.53	86.67

La tendencia de las medias en la Fig. 51 con respecto al agua es positiva para PHA 7.5 y 10 %, es decir, a medida que se incrementa el valor del agua se incrementa el valor de la variable respuesta (Absorción), sin embargo, para PHA 12.5 % ocurre lo contrario, parece ser que este porcentaje de PHA es tan alto que ya no permite una absorción de agua mayor, se observa que incluso a mayor cantidad de agua en la muestra que está asociada con mayor porosidad, la capacidad de absorción disminuye. Las barras de error no se solapan por lo tanto se puede inferir que los datos parecen tener diferencias significativas.

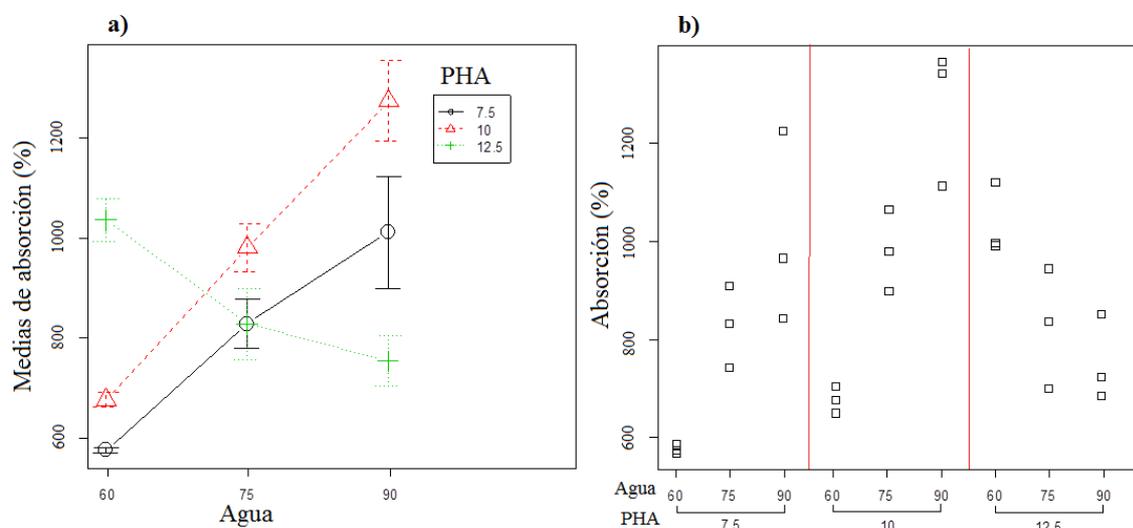


Fig. 51. a) Gráficos de medias y b) distribución de puntos de absorción.

El diagrama de caja en la Fig. 52 presenta una distribución de los datos aparentemente normal con un sesgo positivo (a la derecha) que es corroborado en el histograma, este también da cuenta de que la distribución de datos no es simétrica debido a la forma de la campana que se conforma en la gráfica, sin embargo, esto no significa que la distribución no sea normal, la gráfica de cuantiles no se presentan datos por fuera del intervalo de confianza, para concluir sobre la normalidad se debe hacer un test numérico.

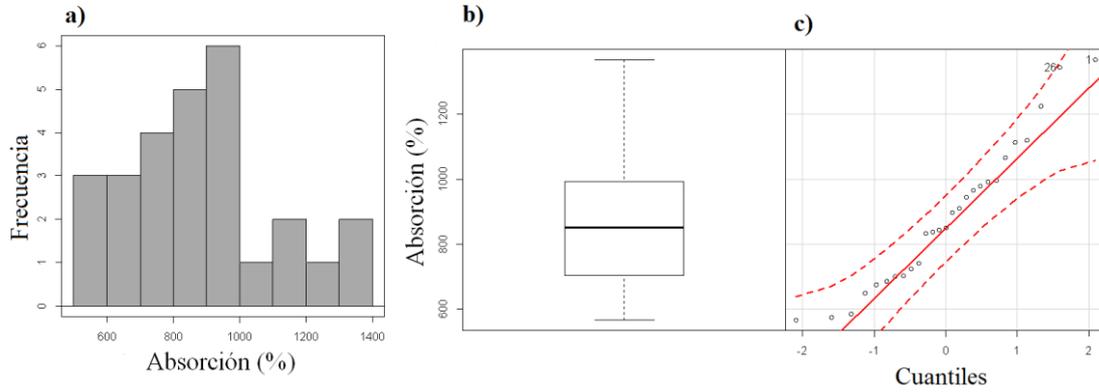


Fig. 52. Normalidad de los datos de absorción a) histograma, b) diagrama de cajas y bigotes, c) gráfico de cuantiles.

Para el método numérico se plantea hipótesis nula:

$$H_0 = \text{Las muestras tienen distribución normal}$$

Y se tomó como valor de nivel de confianza: $\alpha=0.03$

En la prueba presentada en la Tabla 32, el valor-p es menor que α , por tanto se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los datos no tienen una distribución normal.

Tabla 32. Pruebas de normalidad para los datos de absorción.

Test de Shapiro-Wilk	
Valor-p=0.25	

Para verificar que los tratamientos tienen diferencias significativas con respecto a la variable respuesta se realiza un análisis ANOVA, cuyas hipótesis están planteadas en la metodología.

El valor de la suma de cuadrados de los residuales presentado en la Tabla 33 es menor que la suma de cuadrados del factor agua y de la interacción de los factores, lo que significa que las diferencias obtenidas en la variable respuesta se debe a los factores evaluados y no a otros fenómenos no controlables, en el caso del factor PHA si existe influencia de factores no controlables.

Tabla 33. Tabla ANOVA de los datos de absorción.

Factores	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Agua	282082	2	12.68	0.0004
PHA	135266	2	6.08	0.01
Agua : PHA	668760	4	15.03	1.45×10^{-5}
Residuales	200222	18		

Todos los valores-p obtenidos en los factores y su interacción son menores que 0.03, por tanto su efecto sobre la variable respuesta se considera significativo.

Para validar la tabla ANOVA se deben corroborar los tres supuestos sobre los residuales detallados en la metodología, para estos el software R arrojó los resultados presentes en la Tabla 34.

Tabla 34. Validación de los supuestos de la tabla ANOVA para los datos de absorción.

Supuesto	Prueba	Valor-p	Conclusión
Normalidad	Shapiro-Wilk	0.73	Los residuales tienen una distribución normal
Homoscedasticidad	Bartlett	0.12	Las varianzas de los residuales son iguales
Independencia	Durbin-Watson	0.47	Los residuales son independientes

Análisis:

Los supuestos del ANOVA presentados en la Tabla 34, permiten concluir que ambos factores y su interacción tienen un efecto significativo en la absorción de agua de la muestra, como tendencia general se observa que a mayor cantidad de agua mayor absorción de agua se presenta, esto puede deberse a que a mayor cantidad de agua, mayor espacio físico existe dentro de los poros y por tanto pueden albergar mayor cantidad de agua, sin embargo, ocurre un efecto contrario con la mayor cantidad de polímero usado (12.5 %), donde a mayor cantidad de agua menor absorción ocurre, esto puede deberse a que la saturación del material no permite el ingreso de más agua dentro del scaffold, observando la Fig. 51, se aprecia que la tendencia contraria del nivel PHA 12.5 % tiene un descenso con una pendiente menor que el aumento de las otras gráficas, tanto que los últimos dos datos (75 y 90 % de agua) se solapan, por tanto si bien la tendencia es contraria, no es tan significativa.

Esta tendencia contraria encontrada en PHA 12.5 % puede deberse a las paredes del scaffold, ya que las micrografías SEM solo dan cuenta de la porosidad y la interconectividad de los poros en el interior de los scaffolds, es posible que a mayor cantidad de polímero más posibilidades hay de acumulación de este en el exterior de las muestras y el hecho de que ocurra con mayor frecuencia en el mayor porcentaje de agua puede explicarse debido a que en los resultados de diámetro de poro se encontró que el agua aumenta el tamaño de los poros, no su cantidad, favoreciendo la aparición de paredes de polímero más gruesas.

Es de resaltar que la integridad estructural de los scaffolds no se vio modificada durante el ensayo de absorción. Desde el punto de vista de la estabilidad del scaffold, se observan fenómenos diversos que no parecen estar relacionados entre sí, en la degradación se observan diferentes tendencias que dependen del porcentaje de PHA utilizado y en la absorción hay mayores valores de respuesta con el aumento de la cantidad de agua, menos en el PHA 12.5 % donde parece haber poco acceso a la porosidad interior del scaffold desde las paredes exteriores. El cartílago natural puede absorber hasta 400 % su volumen ya que está compuesto por 20 % de fase sólida y 80 % de fase líquida [11], la prueba se realizó con respecto al peso, así que es difícil de comparar, pero en la literatura se encuentran scaffolds con resultados exitosos y valores de absorción con respecto al peso alrededor de 1000 % [9] como las muestras de PHA medidas.

6.2.4. Análisis general de la caracterización de los scaffolds sin biofuncionalización

El promedio de todos los datos obtenidos en las seis pruebas de caracterización se compilaron y compararon con datos de los tejidos y de scaffolds sintéticos en las Tablas 35, 36 y 37.

Los datos promedios obtenidos de la caracterización morfológica (ver Tabla 35) arrojan porosidades que van desde 89 hasta 96 % aproximadamente y tamaños de poro promedio entre 65 y 94 μm , estos datos son similares o compatibles con los recopilados de la literatura del tejido nativo y los scaffolds sintéticos, por lo tanto, en estos ensayos todas las muestras son adecuadas para el reemplazo de cartílago.

Tabla 353. Comparación de los datos obtenidos con la literatura en los ensayos morfológicos.

Protocolo (%)		Porosidad (%)			Tamaño de poro (μm)			
PHA	Agua	Experimental	Tejido	Implante	Longitudinal	Transversal	Tejido	Implante
	60	94.46			65.55	74.39		
7.5	75	96.11			68.49	75.30		
	90	91.74	80 %		88.49	90.81	Los poros	
	60	92.78	líquido,	Alrededor	89.08	81.24	permiten el	Entre 30 y
10	75	94.46	20 %	de 80 %	73.34	73.83	paso	300 μm
	90	94.89	sólido	[181]	94.61	91.60	proteínas	[181]
	60	89.56	[11]		82.14	78.90	de 60 kDa	
12.5	75	92.58			82.24	78.28	[182]	
	90	93.94			79.78	70.79		

Los datos promedios obtenidos de la caracterización mecánica (ver Tabla 36) arrojan módulos de elasticidad promedio que van desde 0.0344 hasta 0.204 MPa, los cuales coinciden con algunas zonas del cartílago y con scaffolds sintéticos de otros autores. También se obtuvieron valores de resistencia máxima a la compresión promedio del 75 % entre 0.066 y 0.299 MPa, el tejido nativo tiene valores superiores; no obstante, algunos autores reportan valores inferiores con éxito, por lo tanto se decidió descartar los tratamientos para la aplicación de cartílago a aquellos que arrojaron los valores más bajos, marcándolos con rojo, según el rango reportado por Do Kyung [9], en este caso se marcan todos los niveles de PHA y el nivel PHA 10 % y agua 90 %.

Tabla 36. Comparación de los datos obtenidos con la literatura en los ensayos mecánicos.

Protocolo (%)		Comportamiento mecánico					
PHA	Agua	Módulo de Elasticidad			Resistencia máxima a la compresión (MPa)		
		Experimental	Tejido	Implante	Experimental	Tejido	Implante
7.5	60	0.06	Resistencia máxima de 0.57 MPa [180]	Aprox. 1070 ± 150 kPa [176]	0.15	Entre 0.5 y 7.7 MPa [9],	Entre 0.12 y
	75	0.07			0.07		0.14 MPa,
	90	0.04			0.12		con células [9]
10	60	0.11	Entre 0.007 y 1.8 MPa, según la zona del cartílago [179]	Aprox. 1070 ± 150 kPa [176]	0.25	1.8 MPa [176]	Desde 100
	75	0.10			0.22		KPa, hasta
	90	0.05			0.11		1.07 KPa, en
12.5	60	0.20			0.30		fractura [176]
	75	0.12			0.29		
	90	0.12			0.17		

Los datos promedios obtenidos de la caracterización de estabilidad (ver la Tabla 37) arrojan porcentajes de absorción entre 576 y 1274 % aproximadamente, según la cantidad de agua que puede albergar el cartílago, esta constituye aproximadamente 400 % (por debajo de los valores obtenidos) pero en los scaffolds sintéticos se pueden encontrar valores alrededor de 1000 %, por lo tanto todos los tratamientos son aceptables pero se ponen en negrilla los valores mayores como los mejores para la aplicación esperada. Los valores de degradación obtenidos para PHA 7.5 y 12.5 % son altos en comparación con el tejido y con los datos encontrados en la literatura, por lo tanto se da preferencia a los tratamientos fabricados con PHA 10 %, en este caso, y comparando con los resultados obtenidos en las pruebas anteriores, se continuó el proceso experimental con el scaffold PHA 10 % y agua 75 %, el resumen de la elección del scaffold está en la Fig.53.

Tabla 37. Comparación de los datos obtenidos con la literatura en los ensayos de estabilidad.

Protocolo (%)		Estabilidad					
PHA	Agua	Absorción (%)			Degradación a 21 días		
		Experimental	Tejido	Implante	Experimental	Tejido	Implante
7.5	60	575.93	El 80 % del cartílago es agua y el 20 % sólido, así que debe poder absorber hasta 400 % [11]	Entre 1030.68 y 1115.78 % [9]	45.89	60 % a los 56 días, prueba en ratones (22.5) [10]	Entre 15 y 20 % [9]
	75	828.40			46.48		
	90	1011.42			55.43		
10	60	676.71			2.98		
	75	980.95			17.18		
	90	1274.07			11.79		
12.5	60	1035.91			45.73		
	75	827.52			51.07		
	90	753.53			39.92		

Tratamientos		Caracterización					
PHA	Agua	Tamaño de poro	Porosidad	Resistencia mecánica	Módulo de elasticidad	Degradación	Absorción
7.5 %	60 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Insuficiente	—————	—————	—————
	75 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Insuficiente	—————	—————	—————
	90 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Insuficiente	—————	—————	—————
10 %	60 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente
	75 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Preferible	⇒ Preferible
	90 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Insuficiente	—————	—————	—————
12.5 %	60 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Insuficiente	—————
	75 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Insuficiente	—————
	90 %	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Suficiente	⇒ Insuficiente	—————

Fig. 53. Esquema de la elección del scaffold con las mejores propiedades para su aplicación en ingeniería de tejidos de cartílago articular. Autoría propia.

6.3. Biofuncionalización de los scaffolds

Después de la caracterización de los scaffolds y la elección del scaffold con las mejores propiedades para su potencial aplicación como cartílago articular (PHA 10 % y agua 75 %) se realizó la biofuncionalización a este único scaffold.

En la Fig. 54 se observa el esquema de la metodología de biofuncionalización la cual es una modificación del método propuesto por Masaeli [98] y sus colaboradores, inicialmente se realizó un ataque químico con NaOH (mejor conocido como hidrólisis alcalina) a diferentes concentraciones, ya que con la concentración propuesta por el autor se generaba un daño estructural tal que no era posible recuperar las muestras, este ataque permite la exposición de grupos carboxilo donde ocurrirá en una etapa posterior la unión del colágeno en la Fig.56 se puede observar el espectro de FTIR de muestras expuestas a diferentes concentraciones de NaOH. Después del ataque químico la muestra se lava, se seca y se pone en una solución buffer que permitió las subsecuentes reacciones químicas, en la solución buffer se puso EDAC que permite la activación de ácidos carboxílicos para la formación de amidas o ésteres además acopla los aminoácidos de los péptidos del colágeno, también se añadió Sulfo-NHS que permite aumentar el rendimiento de la reacción y disminuye las reacciones laterales.

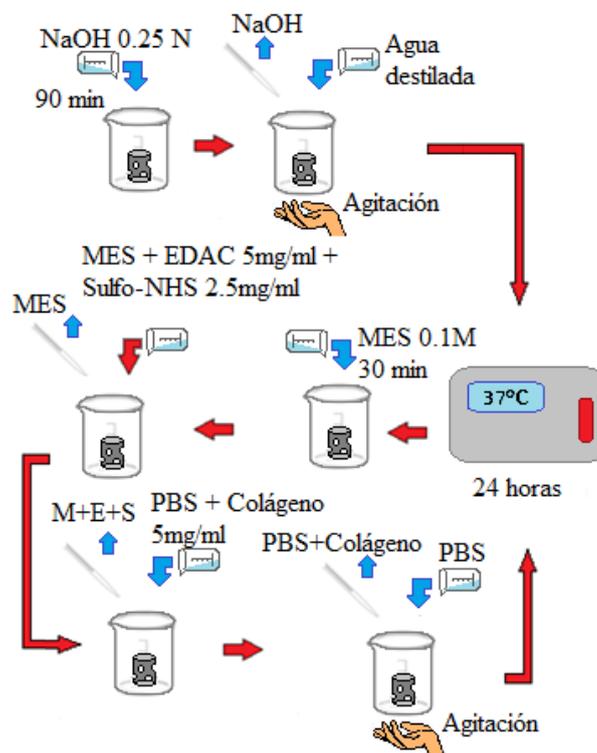


Fig. 544. Esquema metodológico de la biofuncionalización de los scaffolds de PHA. Autoría propia.

6.4. Análisis químico de los scaffolds

La caracterización del material polimérico se presenta en la sección de resultados 6.1., en la sección del análisis de FTIR se detalló la correspondencia de las bandas a los grupos funcionales presentes en el material, en esta sesión se presenta la comparación de los FTIR de los pasos realizados en la fabricación de los scaffolds.

En el espectro del scaffold sin lavar (b) en la Fig. 55 aparecen dos bandas nuevas con respecto al material polimérico (a) en 1512 cm^{-1} y en 1610 cm^{-1} , que parecen corresponder a un grupo funcional aromático tipo benceno, que puede provenir del tergitol en el proceso de fabricación del scaffold.

Una vez el scaffold fue lavado con etanol (c) desaparecieron las bandas 1512 cm^{-1} y 1610 cm^{-1} correspondientes al tergitol, corroborando el efecto del lavado referente a la eliminación de soluciones residuales en el proceso de fabricación del scaffold, para corroborar que los lavados no generaron residuos de etanol, se compararon las bandas de este FTIR (c) con el material polimérico (a) y no se encontraron bandas de alcohol primario, ni otro tipo de modificación en el espectro, por tanto, el alcohol de los lavados desapareció del scaffold completamente.

Para esterilizar el scaffold, se usó óxido de etileno, en el espectro (d) no se observan diferencias significativas entre el scaffold esterilizado y el scaffold lavado, excepto por la presencia de una banda mínima en 1500 cm^{-1} que puede corresponder a un metilo, pero su presencia es mínima y la literatura indica que la esterilización con óxido de etileno para dispositivos implantables que cumplan con la normatividad, no representa peligro alguno para el portador [183], [184].

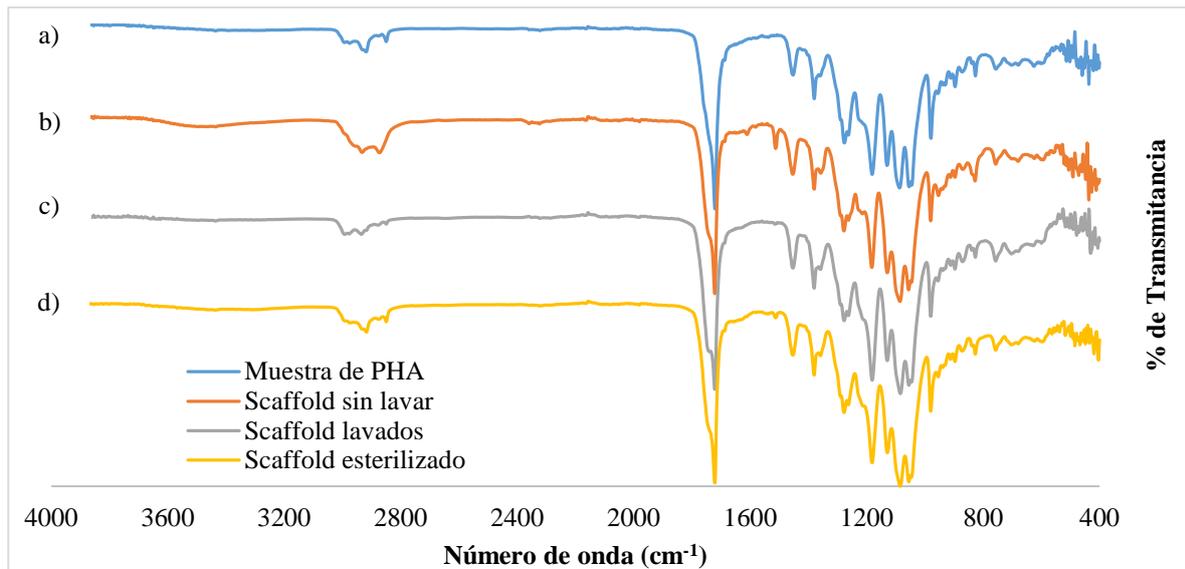


Fig. 55. Espectro FTIR de a) material polimérico, b) scaffold sin lavar, c) scaffold lavado con etanol y d) scaffold esterilizado con óxido de etileno.

Para garantizar la biofuncionalización del polímero debe existir un proceso de hidrólisis alcalina provocado por el ataque del NaOH, esta hidrólisis genera un anión carboxilato que no se aprecia en una banda diferente del grupo carbonilo en un espectro FTIR, pero la carga negativa del anión hace que los dos enlaces C-O implicados, sean equivalentes y en consecuencia aparecen dos bandas de absorción una de intensidad media en 1492 cm^{-1} y otra de intensidad fuerte en 1662 cm^{-1} [185], en el espectro de Fig. 56 se observa la aparición de una banda alrededor de 1630 cm^{-1} que crece a medida que aumenta la concentración del NaOH utilizado, que puede pertenecer a las bandas del anión carboxilato. La banda ancha alrededor de 3500 cm^{-1} puede corresponder a grupos OH, producto del corte de las cadenas poliméricas en la hidrólisis alcalina o al agua retenida en la muestra, las demás bandas expresan más que un crecimiento, un desplazamiento.

En la Fig. 57 se observa una comparación entre a) un scaffold de PHA y b) un scaffold sometido a un tratamiento con NaOH 0.25 N, como ya se explicó la diferencia más notable es la aparición de una banda alrededor de 1630 cm^{-1} que puede pertenecer a las bandas del anión carboxilato producto del ataque del NaOH, también es apreciable que dicha banda desaparece cuando c) el scaffold es biofuncionalizado, esta puede ser una evidencia que la deposición del colágeno en el anión carboxilato ya que lo enmascara en el espectro, y también se evidencia que la d) esterilización no genera la pérdida del colágeno, sin embargo, no se evidencia la presencia de aminas provenientes del colágeno.

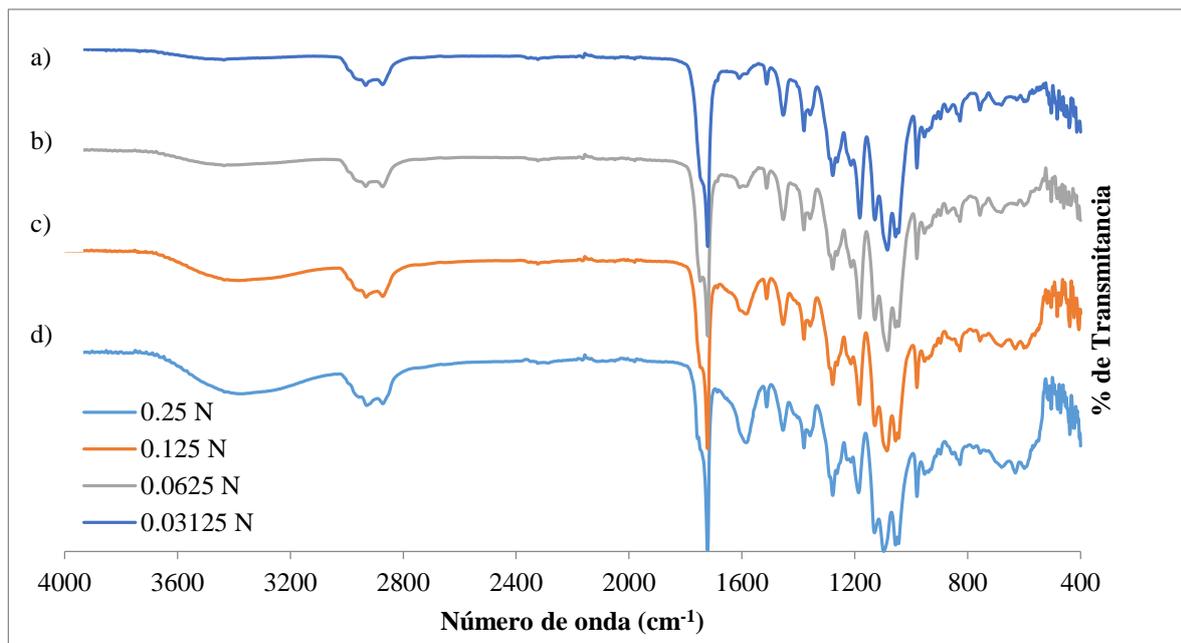


Fig. 56. Espectro FTIR de los scaffolds tratados con diferentes concentraciones de NaOH, a) a 0.03125 N, b) 0.0625 N, c) 0.125 N y d) 0.25 N.

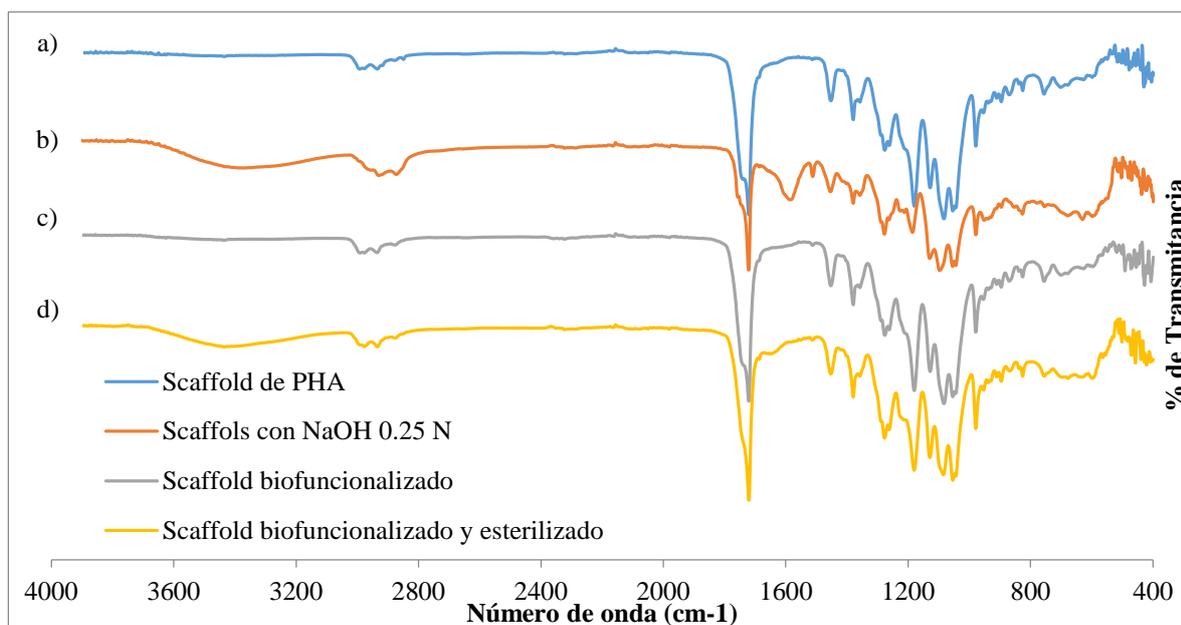


Fig. 57. Espectro FTIR de un scaffold c) biofuncionalizado y c) biofuncionalizado y esterilizado. Para comparar se trazan también los espectros de a) un scaffold de PHA y b) un scaffold sometido a un tratamiento de NaOH al 0.25 N.

6.5. Pruebas biológicas

Se realizaron varias pruebas previas a las entregadas en este texto para verificar la veracidad de los resultados e identificar puntos del proceso causantes de los mismos, los resultados de citotoxicidad se presentan como un porcentaje de viabilidad celular, donde el resultado obtenido en cada pozo se contrastó con el control negativo, el cual solo contenía células y medio de cultivo, los resultados se presentan en Fig. 58, y se observa que los scaffolds no superan el 10 % de viabilidad según la medida de absorbancia. El MTS es transformado en formazán por mitocondrias metabólicamente activas, esto significa que el resultado obtenido puede deberse a una inactivación celular mas no a una muerte celular, para verificarlo es necesario observar las células al microscopio, las fotografías se presentan en la Fig. 59.

Las fotografías de la Fig. 59 permiten observar un número significativo de células vivas en uno de los pozos en contacto con el extracto del pellet de PHA, lo cual coincide con la Fig. 58, en la fotografía correspondiente al scaffold sin biofuncionalizar no son apreciables las células vivas pero sí pudieron ser vistas en el microscopio por lo tanto parte del resultado de viabilidad celular corresponde a inactividad metabólica, de igual forma en la fotografía correspondiente al scaffold biofuncionalizado, si permite observar un número significativo de células vivas que parece indicar que la viabilidad real es un poco mayor a la reportada por el ensayo de MTS, aun así sigue siendo lo suficientemente baja para determinar que los scaffolds evaluados son citotóxicos.

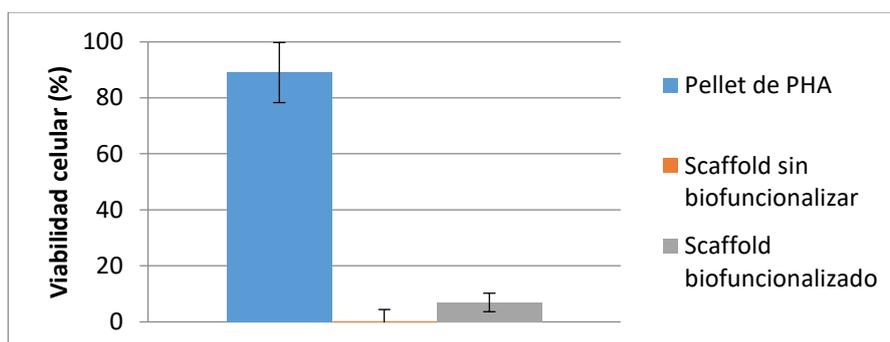


Fig. 58. Porcentaje de viabilidad celular de scaffolds de PHA.

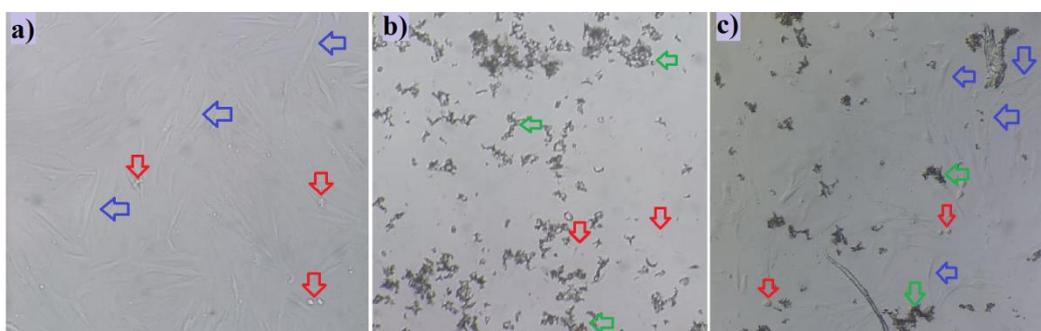


Fig. 59. Fotografías de viabilidad celular: a) pellet de PHA, b) scaffold sin biofuncionalizar y c) scaffold biofuncionalizado. Las flechas azules marcan células vivas, las rojas marcan células muertas y las verdes marcan desechos de los scaffolds. Cortesía:

Lenka Toro.

La evidencia del comportamiento citotóxico del scaffold es inesperada ya que no concuerda con la literatura, varios autores han utilizado solventes como el diclorometano para generar soluciones poliméricas y no reportan citotoxicidad en sus trabajos, tal es el caso de Althuri et al. [166] quienes para fabricar nanopartículas disolvieron PHB en diclorometano, luego hicieron una emulsión con esta solución y agua (en algunos tratamientos tienen PVA) y permitieron la evaporación del diclorometano solo usando agitación magnética, en los resultados de citotoxicidad no se encontraron reducciones de más del 10 % en la viabilidad celular de células no cancerosas, y los mayores descensos de viabilidad fueron adjudicados al medicamento que liberaban las nanopartículas y no a la composición de estas como tal.

Ma et al. [177] por su parte, diluyeron PHA, gelatina y PVA en diclorometano con diferentes concentraciones y utilizaron esta solución para fabricar scaffolds por electrohilado, en pruebas de contacto con células evidenciaron adhesión y proliferación de células madre mesenquimales.

Shishatskaya et al. [186] disolvieron PHA en diclorometano para obtener películas, la solución fue dejada en una cabina de flujo laminar por 72 h para evaporar el solvente y se evaluó la hemocompatibilidad de las películas, si bien no realizaron pruebas de citotoxicidad, utilizaron el reactivo MTT como verificador de estrés oxidativo para plaquetas y los resultados indican que estas células estaban viables durante el ensayo.

Otros autores han utilizado diclorometano para disolver otros polímeros y han reportado de igual forma que este reactivo no causo efectos adversos en la evaluación de citotoxicidad, tal es el caso de Pavón et al. [71] quienes disolvieron quitosano y PLLA en diclorometano para fabricar scaffolds por liofilización, en los resultados de citotoxicidad encontraron que la viabilidad celular evaluada en macrófagos peritoneales de hámster sembrados en los scaffolds es superior a 70 %, sin embargo, no ocurre lo mismo cuando usan células de osteosarcoma, finalmente adjudican este comportamiento a la naturaleza de las células utilizadas.

Los métodos que estos autores reportan para la eliminación o disminución del solvente son muy variados, van desde la volatilización del solvente sin condiciones especiales hasta la liofilización y no reportan inconvenientes de citotoxicidad con el diclorometano, en el presente trabajo se realizaron lavados previos a la fabricación de los scaffolds, liofilización, lavados posteriores, liofilización de segunda etapa y alta temperatura, no obstante, estos procesos no lograron reducir el efecto citotóxico.

6.6. Cromatografía de gases

Tras los resultados citotóxicos de las pruebas biológicas, se sospechó que en los scaffolds existían trazas de diclorometano que no pudieron ser extraídas en los lavados ni la liofilización y que no eran perceptibles en el FTIR, para verificarlo se realizó una cromatografía de gases donde se tomaron dos muestras, una de los pellets del polímero y otras de un scaffold realizado un año antes de la prueba y se quiso verificar si este reactivo aún se encontraba presente en muestras envejecidas para realizar una nueva prueba biológica, para ello se realizaron tres medidas con las dos muestras a saber:

Se pesaron aproximadamente 2 g del scaffold o de los pellets en un vial de head space (HS), luego se llevó a una temperatura de 60 °C durante 10 min, luego con una fibra de triple polaridad (CAR/PDMS/DVB) se realizó una micro estación en fase solida (SPME) durante 20 min, posteriormente se inyectó en el GC-FID. Se utilizó un cromatógrafo

Agilent 6890N con detector FID. El manejo de las señales se realizó en estación de datos G2070 ChemStation versión B.04.03, conectado a una impresora HP LaserJet 1020. Se utilizó una columna DB-5 de 30 m, 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 μm de espesor de película. Las condiciones del equipo fueron: detector: FID, Make Up: nitrógeno, 30 mL / min, gas de arrastre: hidrógeno, 40 mL / s, temperatura del detector: 250 $^{\circ}\text{C}$, temperatura del inyector: 270 $^{\circ}\text{C}$, programación del horno: el horno inicia a 40 $^{\circ}\text{C}$, sube a una velocidad de 30 $^{\circ}\text{C}$ / min hasta 150 $^{\circ}\text{C}$.

Para la tercera medida se agregó diclorometano a los pellets con el objetivo de correlacionar las columnas arrojadas por el equipo, también se hizo una de etanol y se encontró en la Fig. 60 que el scaffold presenta una pequeña señal en el mismo ciclo de tiempo que el diclorometano, así que se sospecha que los scaffolds aún conservan diclorometano después del procedimiento de liofilización y tras un año de envejecimiento.

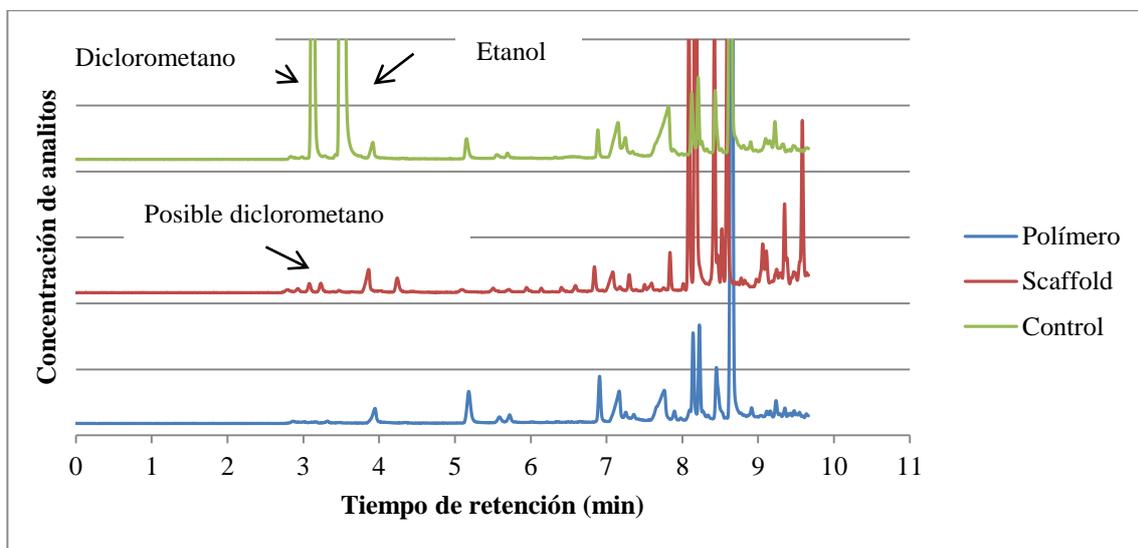


Fig. 60. Cromatografía de gases del polímero sin procesar, del scaffold de PHA y de una muestra control con

6.7. Propuesta para la eliminación de diclorometano

Debido a la necesidad de eliminar las trazas de diclorometano de los scaffolds y tras múltiples lavados con etanol que resultaron infructuosos se procedió a someter los scaffolds a una temperatura de 60 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h, debido a que en el ensayo de cromatografía de gases, los scaffolds fueron sometidos a 60 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min y se evidenció presencia de diclorometano en los gases generados por este. Una vez finalizado el proceso se esterizaron con óxido de etileno y se repitió la prueba de citotoxicidad.

6.8. Prueba de citotoxicidad cualitativa

Una vez los scaffolds se sometieron a un tratamiento térmico de 60 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h y se esterizaron con óxido de etileno se realizó una prueba de citotoxicidad siguiendo el protocolo descrito en la metodología, sin embargo, tras 24 horas de

exposición de las células con el extracto de los scaffolds, las células presentaron muerte celular, por lo que se decidió no hacer la prueba y tomar fotografías como evidencia de este resultado, presentado en la Fig. 61.

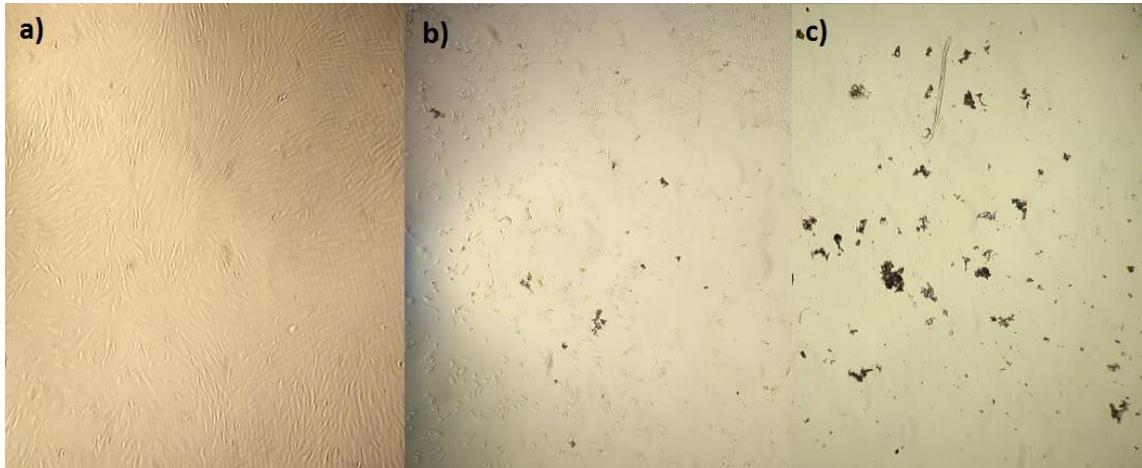


Fig. 61. Fotografías después de 24 h de exposición de fibroblastos humanos a a) medio de cultivo, b) 25 % de extracto y c) 100 % de extracto de scaffold de PHA. Cortesía: Lenka Toro.

El PHA es un polímero natural, con un enorme potencial en la industria médica ya que se degrada sin dejar residuos tóxicos como suele ocurrir con los polímeros sintéticos [59] y posee propiedades mecánicas similares al polipropileno [62] que aumenta sus potenciales aplicaciones y lo posiciona mecánicamente por encima de otros polímeros naturales como el quitosano [49], además posee propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad adecuadas para su uso como reemplazo de tejidos [63].

En el presente trabajo se utilizó PHA comercial de Sigma-Aldrich para fabricar scaffolds, se utilizó diclorometano para disolver el polímero como se encontró la literatura y como sugirió el investigador Gang Wu [187], vía correo electrónico y se empleó la técnica de liofilización debido a sus excelentes resultados en la fabricación de scaffolds porosos.

El PHA se caracterizó mediante SEM, EDS, FTIR, DRX, análisis térmico, viscosimetría y RMN, a través de estas pruebas se pudo determinar en rasgos generales que se trataba de una mezcla mixta de PHA y PLA con aditivos para permitir la extrusión del material, donde las cantidades fueron aproximadamente 50-50 de cada polímero, el peso molecular promedio fue de 220 kDa y el PHA presente parece ser específicamente PHB.

Una vez fabricado el scaffold se evaluaron propiedades morfológicas, mecánicas y de estabilidad, donde se encontraron condiciones morfológicas excelentes para la migración celular ya que los poros estaban interconectados y tenían un diámetro promedio entre 59.9 y 94.6 μm con una porosidad que variaba entre 89.6 y 96.1 %. A nivel mecánico se encontraron valores de resistencia máxima bajos en comparación con el tejido nativo pero similares a los reportados en la literatura como exitosos para scaffolds sintéticos, en este punto se descartaron algunos tratamientos que no concordaban con la literatura. Finalmente en las pruebas de estabilidad se obtuvieron excelentes resultados en la capacidad de absorción del scaffold, ya que el cartílago nativo puede albergar 400 % de solución acuosa con respecto a su contenido sólido y los scaffolds de PHA presentaron capacidades de absorción entre 575.9 y 1274 % (similares a las

reportadas en la literatura), en la prueba de degradación, un tratamiento presentó una velocidad de degradación adecuada (17 % en 21 días) que coincide con la literatura en la velocidad de regeneración de cartílago de ratón.

Dentro del proceso de biofuncionalización se utilizó una modificación del método propuesto por Masaeli et al. [98], donde los grupos carboxilo del polímero se exponen en la superficie para inmovilizar moléculas. La exposición de los grupos carboxilo pudo verificarse de manera efectiva con pruebas de FTIR, sin embargo, no pudo detectarse la inmovilización del colágeno, este fenómeno puede deberse a la naturaleza del colágeno disponible en el laboratorio, pero no se cuenta con las especificaciones de este.

Finalmente las pruebas de citotoxicidad indicaron que el polímero PHA tiene una viabilidad superior al 70 % y por lo tanto es adecuado para su uso como biomaterial pero al fabricar el scaffold, este presentó efectos citotóxicos sobre las células evaluadas, por lo tanto se concluye que la citotoxicidad proviene de los reactivos utilizados o del proceso empleado en la fabricación de los scaffolds, de esto se deduce que el posible causante de este fenómeno es el diclorometano utilizado como solvente, que aunque se esperaba que se volatilizara fácilmente debido a su naturaleza, pudo encontrarse indicios de su presencia en una prueba de cromatografía de gases, pero hasta el momento, los intentos por retirarlo han sido infructuosos. Es así, como continúa abierta una ventana de investigación con el objetivo de encontrar una estrategia para la eliminación del diclorometano de los scaffolds, de tal manera que puedan ser aprovechadas las demás propiedades que se encontraron en los scaffolds fabricados.

7. CONCLUSIONES

- El porcentaje de agua utilizado en las muestras fabricadas influyó en las propiedades morfológicas de los scaffolds, ya que a mayor cantidad de agua los poros tendieron a ser más grandes, esto debido posiblemente a que el tergitol alcanzó un punto límite de disolución y el agua agregada no pudo generar nuevas burbujas, pero si aumentar el tamaño de las existentes.
- El tamaño de los poros promedio varió entre 59 μm y 94 μm , lo cual es suficiente para la migración de condrocitos ya que estos tienen diámetros que varían entre 5 y 30 μm .
- El porcentaje de agua también influyó en las propiedades mecánicas de los scaffolds de PHA, en general a mayor cantidad de agua menor resistencia mecánica, esto se explica ya que los sitios donde se almacena el agua se convierten en poros tras la liofilización, por tanto son sitios que disminuyen la resistencia mecánica de los scaffolds. A nivel morfológico los scaffolds ofrecieron una porosidad y tamaños de poro con potencialidad para la migración celular e intercambio de nutrientes y desechos, sin importar el tratamiento realizado.
- El porcentaje de PHA es un factor que no tuvo un efecto significativo sobre la porosidad del scaffold por sí solo, pero si fue significativo para el control del tamaño de los poros, en este caso la cantidad de PHA fue inversamente proporcional al tamaño de los poros ya que una mayor cantidad de material generó la aparición de más paredes dentro de los scaffolds.
- Los porcentajes de porosidad obtenidos fueron superiores a 89 % en todos los tratamientos, haciendo que los scaffolds sean adecuados como sustitutos de cartílago articular, ya que el tejido nativo puede contener hasta el 80 % de solución acuosa.
- En general a mayor cantidad de PHA y menor cantidad de agua presente en los scaffolds, mayor fue la resistencia mecánica ofrecida, esto se debe a que la resistencia mecánica está relacionada con la presencia y tamaño de los poros, por ello se observa un comportamiento contrario al observado en la caracterización morfológica.
- Si bien la resistencia mecánica obtenida (0.066 MPa a 0.298 MPa) fue baja en comparación con los valores encontrados en el tejido, es similar a los valores reportados en la literatura como apropiados para un scaffold sintético sin células.
- Los resultados de la estabilidad del material en un medio acuoso no presentaron una tendencia clara, es apreciable que en el tiempo se presenta una mayor degradación que aparentemente se estabiliza alrededor de los veintidós días de exposición de la prueba, sin embargo, no es claro el efecto de los factores de forma individual, parece ser que el efecto del factor agua cambia en cada nivel del factor PHA. El comportamiento puede ser dependiente de fenómenos de equilibrio y desequilibrio químico, de la morfología de los scaffolds y de una posible deposición de sales sobre las muestras, producto de la solución tampón utilizada en la degradación y esto haya enmascarado los resultados.
- El mejor scaffold obtenido para la aplicación de reemplazo de cartílago articular fue el tratamiento 10 % de PHA y 75 % de agua, la decisión fue tomada basándose en que cumpliera con los requerimientos del scaffold para su aplicación, así: morfológicamente estaba dentro del rango adecuado de tamaño de poro y porosidad, mecánicamente exhibía valores bajos no obstante, correspondientes con los requisitos de los scaffold sintéticos

que reporta la literatura, y en las pruebas de estabilidad, fue el tratamiento que más cerca estuvo de la velocidad de degradación de los scaffolds sintéticos reportados.

- Se propuso un método para la biofuncionalización de los scaffolds con miras en el mejoramiento de la adhesión y proliferación celular, el cual inició con una reacción química para exponer grupos carboxilo que fue verificada a través de espectros de FTIR, este ataque es superficial pero el volumen y la porosidad de la muestra permitió que en NaOH penetrara en los scaffolds y generara un daño estructural, por lo que fue necesario disminuir la concentración del NaOH para garantizar la estabilidad estructural de las muestras. El proceso de biofuncionalización finaliza con la deposición de colágeno a través de una activación de los grupos carbonilo y el acoplamiento de las amidas, donde el espectro FTIR evidenció el acoplamiento de moléculas en los grupos funcionales expuestos, sin embargo, no evidenció la presencia de colágeno.
- Se evaluó la biocompatibilidad *in vitro* de los scaffolds antes y después de la biofuncionalización, ambos tipos de scaffolds dieron resultados citotóxicos debido a la presencia de diclorometano en las muestras, comprobando por cromatografía de gases, debido a la presencia de este reactivo no fue posible verificar el efecto de la biofuncionalización en la biocompatibilidad.
- El uso del agua como solvente no solo contribuyó con la porosidad y el tamaño de los poros, también facilitó el proceso de fabricación ya que permitió aumentar el punto de congelamiento de la solución, facilitando el proceso de liofilización.
- Los lavados de los scaffolds una vez fabricados contribuyeron con la eliminación de los reactivos utilizados (diclorometano y tergitol), si bien no fue suficiente, se pudo comprobar en el FTIR que la cantidad de estos reactivos disminuyó.

8. AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar por reconocer a mis padres, mi hermana y mi esposo el esfuerzo económico, el tiempo dedicado y la infinita paciencia que tuvieron durante todo este proceso de aprendizaje y desarrollo académico.

Infinitas gracias a mi tutora Claudia Patricia Ossa Orozco, quien más que un apoyo académico ha sido una consejera espiritual, una amiga y una confidente, nuestra relación se convirtió en personal y siempre estaré agradecida por eso.

Agradezco al grupo de BIOMAT y a la Universidad de Antioquia por ser los patrocinadores del proyecto y por permitirme desarrollarlo.

Los integrantes de BIOMAT tienen un lugar muy especial en este agradecimiento, todos estuvieron presentes y siempre prestos para ayudarme, ellos guiaron mi camino en los momentos más difíciles del proceso, a Marcela Escobar por su interés y sus consejos, a Ana Torres por sus puntos de vista, a Laura Osorio por estar siempre dispuesta a darme una mano, por las células, el MTS y los contactos que hacía para facilitarme la vida.

A mis compañeros de posgrado Mateo Escobar, Juan Arenas, Giovanni Cuervo, Carlos Murillo y Francisco Campuzano por las tardes de debate académico, tanta tertulia intelectual terminó enriqueciendo mi trabajo y mi vida académica.

A las que se fueron antes de que terminara, su presencia en el comienzo de esta carrera fue el primer peldaño de este camino, Lindsey Quintero, Maritza Buitrago y Jazmín González quien además se convirtió en consejera, confidente y en palabras de aliento cada que las necesité.

A los estudiantes de pregrado, que siempre se acercaron con infinitas ganas de ayudar y aprender, que siempre estuvieron dispuestos a dar una mano.

A Dayana Meza por las largas horas en el SEM tomando fotografías y analizándolas.

A CIDEMAT por los servicios de FTIR, DSC y TGA, especialmente a Manuel Zapata y Harol Torres

A CIENMATE por el análisis de peso molecular

Al grupo de Catalizadores y Adsorbentes por el análisis de DRX

Al profesor Elkin Galeano, no solo por el análisis de RMN sino por su ayuda para resolver las dificultades con las pruebas finales. De igual forma quiero agradecerle al profesor Julián Zapata por los ensayos de Cromatografía de gases y sus consejos.

Al grupo de Materiales Poliméricos por las continuas sesiones de compresión en la máquina universal de ensayos.

A Luz Marina y su grupo GITTC y a Lenka Toro y su esposo David Arboleda por los ensayos biológicos, sus consejos y apoyo.

Al grupo de Bioprocesos por ser nuestro grupo hermano y facilitarnos sus espacios.

Y a todos aquellos que no menciono pero que hicieron parte de este proceso, sufrido pero hermoso.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ministerio de Salud y protección social., “Sala situacional de las personas con discapacidad (PCD),” Gobierno de Colombia, 2018. [Online]. Available: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/PS/sala-situacional-discapacidad-junio-2018.pdf>.
- [2] E. C. Chan, “Sustitutos de tejido óseo,” *Orthotips*, vol. 10, no. 4, pp. 208–217, 2014.
- [3] N. Zapata, N. Zuluaga, S. Betancur, and L. López, “Cultivo de tejido cartilaginoso articular: Acercamiento conceptual,” *Rev. Esc. Ing. Antioquia*, vol. 8, 2007.
- [4] F. Vilchez Cavazos et al., “Lesiones condrales de rodilla tratadas con trasplante de condrocitos autólogos en una matriz tridimensional : Evaluación clínica a un año de evolución,” *Trauma Fund Mapfre*, vol. 21, no. 1, pp. 15–19, 2010.
- [5] C. Navarro Hernández et al., “Proyecto multidisciplinario para la fabricación de prótesis ortopédicas de bajo costo,” *Ideas Concyteg*, vol. 6, no. 72, pp. 788–798, 2011.
- [6] C.-L. Dong et al., “The cytocompatibility of polyhydroxyalkanoates coated with a fusion protein of PHA repressor protein (PhaR) and Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val (KQAGDV) polypeptide.,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 9, pp. 2593–9, Mar. 2012.
- [7] M. You et al., “Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide.,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 9, pp. 2305–13, Mar. 2011.
- [8] T. H. Ying et al., “Scaffolds from electrospun polyhydroxyalkanoate copolymers: Fabrication, characterization, bioabsorption and tissue response,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 10, pp. 1307–1317, 2008.
- [9] D. K. Kim, J. In Kim, B. R. Sim, and G. Khang, “Bioengineered porous composite curcumin/silk scaffolds for cartilage regeneration,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 78, pp. 571–578, 2017.
- [10] N. E. Cedeño Lamus, J. L. Acosta Collado, and N. Antoniadis Petrakis, “Análisis histológico de los injertos de cartílago autólogos envueltos en fascia,” *Cirugía Plástica Ibero-Latinoamericana*, vol. 37, no. 2, 2011.
- [11] Sociedad Española de Reumatología, *Artrosis. Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento*. 2010.
- [12] A. C. Rios, D. Hotza, G. V Salmoria, and M. C. Fredel, “Fabricación de andamios de hidroxiapatita por impresión tridimensional,” *Rev. Lat. Metal. y Mater.*, vol. 34, no. 2, pp. 262–274, 2013.

- [13] National Institutes of Health, "Clinical Applications of Biomaterials," in NIH Consensus Development Conference, 1982.
- [14] J. A. Pérez González, "Síntesis de biovidrios por la técnica de sol-gel con incorporación de metales y estudio de sus propiedades antibacteriales," Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, 2012.
- [15] B. Ratner, A. Hoffman, F. Schoen, and J. Lemons, *Biomaterials Science. An Introduction to materials in medicine*. Estados Unidos, 1996.
- [16] E. Montufar, "Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa," Tesis Doctoral, Biomaterials, Implants i Enginyeria de Teixits, Politècnica de Catalunya, 2010.
- [17] F. Burny, M. Donkerwolcke, and D. Muster, "Biomaterials education: a challenge for medicine and industry in the late 1990s," *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 199, no. 1, pp. 53–59, Aug. 1995.
- [18] J. M. Soto Castaño, "Ingeniería biomédica. Historia en construcción," *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 3, no. 5, pp. 28–30.
- [19] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 3rd ed. Waltham, USA, 2013.
- [20] Colaboradores de Mimetis, "Las 4 generaciones de biomateriales de regeneración ósea," Blog - Noticias, 2017. [Online]. Available: <https://www.mimetikoss.com/blogs/blog-biomimetico/cuarta-generacion-de-biomateriales-que-significa>.
- [21] J. I. González, "Producción y caracterización de cuerpos porosos de espumas de Hidroxiapatita sintética para fines de implante biomédico," Tesis de Maestría, Ingeniería de Materiales, Universidad de Antioquia, 2007.
- [22] B. Pérez Rojo, "Biomateriales: Aplicación a cirugía y ortopédica," Trabajo de grado, Departamento de Mecánica, Universidad Carlos III de Madrid, 2010.
- [23] M. E. Reyes Melo and M. Hinojosa Rivera, "Estructura de sólidos amorfos," *Ingenierías*, vol. III, no. 9, pp. 7–14.
- [24] J. Park and R. Lakes, "Biomaterials: An Introduction," Springer, vol. 515, 2007.
- [25] G. Pacheco, N. C. Flores, and R.-S. Romina, "Bioplásticos," *BioTecnología*, vol. 18, no. 2, pp. 27–36, 2014.
- [26] L. A. García, J. A. Novoa Betancur, A. M. Franco Ramírez, and L. M. Higuera Arboleda, "Estudio de la síntesis de biopolímeros de origen microbiano," *Rev. QUID*, vol. 25, pp. 69–78, 2015.
- [27] H. S. Villada, H. A. Acosta, and R. J. Velasco, "Biopolímeros naturales usados en empaques

biodegradables,” *Temas Agrar.*, vol. 12, no. 2, pp. 5–13, 2007.

- [28] M. G. Rojas Cortés, B. M. Vallejo Díaz, and J. E. Perilla, “Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico,” *Rev. Ing. e Investig.*, vol. 28, no. 1, pp. 57–71, 2008.
- [29] P. Hernández, “Medicina regenerativa y células madre. Mecanismos de acción de las células madre adultas,” *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. y Hemoter.*, vol. 25, no. 1, 2009.
- [30] D. Morales Navarro, “Ingeniería tisular como puntual de la medicina regenerativa en estomatología,” *Rev. Cubana Estomatol.*, vol. 51, no. 2, pp. 206–223, 2014.
- [31] P. R. Cortez Tornello, J. I. Pastore, D. S. Comas, A. Bouchet, A. Gustavo, and T. R. Cuadrado, “Análisis estructural de poros en matrices poliméricas para ingeniería de tejidos utilizando Morfología Matemática y Reconstrucción 3D,” *2nd Int. Symp. Innov. Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, 2011.
- [32] A. C. Colorado, C. A. Agudelo, and M. E. Moncada A, “Análisis de biomateriales para uso en ingeniería de tejido de piel : revisión,” *Rev. Ing. Biomédica*, vol. 7, no. 14, pp. 11–23, 2013.
- [33] G. Scionti, “Evaluación de las propiedades biomecánicas de tejidos artificiales elaborados con biopolímeros para su utilización en ingeniería tisular,” Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, 2014.
- [34] H.-H. Jin et al., “In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/chitosan-alginate composite scaffolds for bone tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 5, pp. 1079–85, Dec. 2012.
- [35] E. Khor, *Chitin: fulfilling a biomaterials promise*. 2001.
- [36] P. A. Leite Lima, C. X. Resende, G. D. De Almeida Soares, K. Anselme, and L. E. Almeida, “Preparation, characterization and biological test of 3D-scaffolds based on chitosan, fibroin and hydroxyapatite for bone tissue engineering,” *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 5, pp. 3389–95, Aug. 2013.
- [37] R. Sastre, *Biomateriales*, CYTED. España, 2004.
- [38] J. G. Cho Hong, “NUS Tissue Engineering Programme,” National University Health System, 2017. [Online]. Available: <http://www.nuhs.edu.sg/research/programmatic-research/som-registered-programmes/nus-tissue-engineering-programme.html>.
- [39] S. Barbanti, C. Zavaglia, and E. Duek, “Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos,” *Polímeros Ciência e Tecnol.*, vol. 15, no. 1, pp. 13–21, 2005.
- [40] V. Mkhabela and S. S. Ray, “Biodegradation and bioresorption of poly(ϵ -caprolactone) nanocomposite scaffolds,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 79, pp. 186–92, Aug. 2015.
- [41] B. Tesfamariam, “Bioresorbable vascular scaffolds: Biodegradation, drug delivery and vascular

remodeling,” *Pharmacol. Res.*, vol. 107, pp. 163–171, Mar. 2016.

- [42] J. Weng and M. Wang, “Producing chitin scaffolds with controlled pore size and interconnectivity for tissue engineering,” *J. Mater. Sci. Lett.*, vol. 20, no. 15, pp. 1401–1403, 2001.
- [43] M. Navarro Toro, “Desarrollo y caracterización de materiales biodegradables para regeneración ósea,” Tesis Doctoral, Departament de Ciència dels Materials i Enginyeria Metal·lúrgica, Universitat Politècnica de Catalunya, 2005.
- [44] S. García, “Referencias históricas y evolución de los plásticos,” *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 10, no. 1, pp. 71–80, 2009.
- [45] G. Carramiñana Pellerejo, “Historia de los barnices para instrumentos musicales de cuerda. Estado del Arte y reflexiones,” Tesis de Maestría, Ciencia y Restauración del patrimonio Histórico-Artístico, Universidad Politécnica de Valencia, 2011.
- [46] M. A. Lizarbe, “Sustitutos de tejidos: de los biomateriales a la ingeniería tisular,” *Real Acad. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.*, vol. 101, no. 1, pp. 227–249, 2007.
- [47] S. Russell and M. D. Gonnering, “Fostering Innovation,” *Ophthal Plast Reconstr Surg*, vol. 30, no. 6, p. 449, 2014.
- [48] C. F. Santa and B. L. López Osorio, “Materiales Poliméricos En Nanomedicina: Transporte Y Liberación Controlada De Fármacos,” *Rev. la Acad. Colomb. Ciencias Exactas, Físicas y Nat.*, vol. 37, no. 142, pp. 115–124, 2013.
- [49] L. F. Suárez, J. Tulande, J. H. Mina, and J. Peñaranda, “Desarrollo de apósitos de quitosano para su posible aplicación en la regeneración de tejido apitelial,” *Rev. Colomb. Mater.*, vol. 5, pp. 56–63, 2013.
- [50] A. Villanueva Tairo, “Desarrollo de armazones (scaffolds) a partir de poli(ácido láctico) (PLA) y polietilenglicol (PEG) utilizando la técnica de modelado por deposición fundida (FDM) empleada en impresión 3D,” Tesis de Maestría, Ingeniería y Ciencia de los Materiales, Pontificia Universidad Católica del Perú, 2016.
- [51] S. Martínez Díaz, “Reparació de lesions condrials mitjançant suports macroporosos biodegradables tridimensionals de policaprolactona, estudi experimental en un model animal,” Tesis Doctoral, Departamento de Cirugía, Universitat Autònoma de Barcelona, 2014.
- [52] M. L. Lastra, M. S. Molinuevo, and M. S. Cortizo, “Biocompatibilidad de matrices basadas en polifumaratos para regeneración del tejido óseo-cartilaginoso,” *Investig. Joven*, vol. 1, p. 2014, 2014.
- [53] A. B. Paes Martí, “Membranas electrohiladas de ácido poliláctico para la liberación de proteínas como ayuda a la cicatrización,” Trabajo de grado, Biotecnología, Universitat Politècnica de València, 2016.

- [54] V. Bolívar Arroyo, A. Raya Villarraso, and J. Garrido Gómez, "Lesiones del ligamento cruzado anterior. Nuevas opciones de tratamiento mediante ingeniería de tejidos," *Actual. Medica*, vol. 99, no. 793, pp. 157–161, 2014.
- [55] G. Vilariño Feltrer, "Conductos de ácido hialurónico para el crecimiento axonal guiado," Tesis Doctoral, Programa en Tecnologías para la Salud y el Bienestar, Universidad Politécnica de Valencia, 2015.
- [56] G. M. Raghavendra, T. Jayaramudu, K. Varaprasad, R. Sadiku, S. S. Ray, and K. Mohana Raju, "Cellulose-polymer-Ag nanocomposite fibers for antibacterial fabrics/skin scaffolds.," *Carbohydr. Polym.*, vol. 93, no. 2, pp. 553–60, Apr. 2013.
- [57] Anónimo, "What is a Polymer?," M.Barnwell Services Limited, 2018. [Online]. Available: <http://www.barnwell.co.uk/what-is-a-polymer/>.
- [58] R. F. Canadas et al., "Polyhydroxyalkanoates: waste glycerol upgrade into electrospun fibrous scaffolds for stem cells culture.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 71, pp. 131–40, Dec. 2014.
- [59] D. Segura, R. Noguez, and G. Espín, "Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables," *Biotecnología*, vol. 14, pp. 361–372, 2007.
- [60] A. de Almeida, J. Ruiz, N. López, and J. Pettinari, "Bioplásticos: Una alternativa ecológica," *Rev. Química Viva*, vol. 3, no. 3, 2004.
- [61] P. Fairley, "A bioplastic goes commercial," *MIT Technol. Rev.*, 2007.
- [62] Y. González García, J. C. Contreras Meza, O. González Reynoso, and J. A. Córdova López, "Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano," *Rev. Int. Contam. Ambient.*, vol. 29, no. 1, pp. 77–115, 2013.
- [63] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, no. 8–9, pp. 762–798, Aug. 2007.
- [64] R. S. Sandhu and M. Shakya, "Comparative Study of Synthetic Plastics and biodegradable plastics," *Glob. J. Bio-Science Biotechnol.*, vol. 8, no. 1, pp. 107–112, 2019.
- [65] B. Johnston et al., "The microbial production of Polyhydroxyalkanoates from Waste polystyrene fragments attained using oxidative degradation," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 9, 2018.
- [66] A. Anjum, M. Zuber, K. M. Zia, A. Noreen, M. N. Anjum, and S. Tabasum, "Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 89, pp. 161–174, 2016.
- [67] J. Gonzalez Ausejo et al., "A comparative study of three-dimensional printing directions: The degradation and toxicological profile of a PLA/PHA blend," *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 152, no. 2018,

pp. 191–207, 2018.

- [68] H. Y. Li, H. Li, B. J. Wang, Q. Gu, Z. Q. Jiang, and X. D. Wu, “Synthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitin nanocrystals composite scaffolds for tissue engineering,” *Chinese Chem. Lett.*, vol. 25, no. 12, pp. 1635–1638, 2014.
- [69] Z. Kai, D. Ying, and C. Guo-Qiang, “Effects of surface morphology on the biocompatibility of polyhydroxyalkanoates,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 16, no. 2, pp. 115–123, 2003.
- [70] M. A. Sabino, M. Loaiza, J. Dernowsek, R. Rezende, and J. V. L. Da Silva, “Técnicas para la fabricación de andamios poliméricos con aplicaciones en ingeniería de tejidos,” *Rev. Latinoam. Metal. y Mater.*, vol. 37, no. 2, pp. 120–146, 2017.
- [71] J. J. Pavón Palacio, A. Pesquet, M. Echeverry Rendón, and S. M. Robledo Restrepo, “Procesamiento, caracterización y ensayos biológicos de scaffolds poliméricos naturales y sintéticos para ingeniería de tejido óseo y cartilaginoso,” *Rev. Politécnica*, vol. 10, no. 19, pp. 9–19, 2014.
- [72] J. González Ocampo, D. M. Sierra Escobar, and P. C. Orozco Ossa, “Métodos de fabricación de cuerpos porosos de hidroxiapatita , revisión del estado del arte,” *Rev. ION*, vol. 27, no. 2, pp. 55–70, 2014.
- [73] M. Rincón, A. Rodríguez, M. E. Londoño, and A. Echavarría, “Fabricación y caracterización de una matriz tridimensional de hidroxiapatita macroporosa para aplicación en ingeniería de tejidos óseos,” *Rev. Esc. Ing. Antioquia*, no. 7, pp. 87–95, 2007.
- [74] P. C. Caracciolo, F. A. Buffa, and G. A. Abraham, “Matrices poliuretánicas nanofibras obtenidas por el proceso de electrospinning,” *Encuentro jóvenes Investig. en Cienc. y Tecnol. Mater.*, pp. 16–17, 2008.
- [75] L. M. Sánchez Duque, L. Rodriguez, and M. López, “Electrospinning: La era de las nanofibras,” *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 14, no. 1, pp. 10–27, 2014.
- [76] L. Jiang, Y. Li, X. Wang, L. Zhang, J. Wen, and M. Gong, “Preparation and properties of nano-hydroxyapatite/chitosan/carboxymethyl cellulose composite scaffold,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 74, no. 3, pp. 680–684, Nov. 2008.
- [77] A. P. Hollander and H. P. V., *Biopolymer methods in tissue engineering*, vol. 238. 2004.
- [78] G. Khang, M. Suk Kim, and H. Lee, “A manual of biomaterials/Scaffold fabrication technology,” *Manuals Biomed. Res.*, vol. 4, 2007.
- [79] A. Teimouri, M. Azadi, R. Emadi, J. Lari, and A. N. Chermahini, “Preparation, characterization, degradation and biocompatibility of different silk fibroin based composite scaffolds prepared by freeze-drying method for tissue engineering application,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 121, pp. 18–29,

Nov. 2015.

- [80] H. Chang et al., "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 47, no. 7, pp. 533–539, 2014.
- [81] B. Pérez Rojo, "Biomateriales: Aplicación a cirugía ortopédica y traumatológica," 2010.
- [82] S. Gomes, I. B. Leonor, J. F. Mano, R. L. Reis, and D. L. Kaplan, "Natural and genetically engineered proteins for tissue engineering," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 37, pp. 1–17, 2012.
- [83] S. E. Kim et al., "The effect of immobilization of heparin and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) to titanium surfaces on inflammation and osteoblast function," *Biomaterials*, vol. 32, pp. 366–373, 2011.
- [84] G. Li, P. Yang, Y. Liao, and N. Huang, "Tailoring of the Titanium Surface by Immobilization of Heparin/Fibronectin Complexes for Improving Blood Compatibility and Endothelialization: An in Vitro Study," *Biomacromolecules*, vol. 12, pp. 1155–1168, 2011.
- [85] S. Bauer, J. Park, A. Pottrof, Y.-Y. Song, M. K. Von der, and P. Schmuki, "Covalent functionalization of TiO₂ nanotube arrays with EGF and BMP-2 for modified behavior towards mesenchymal stem cells," *Integr. Biol.*, vol. 3, pp. 927–936, 2011.
- [86] L. L. Y. Chiu and M. Radisic, "Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues.," *Biomaterials*, vol. 31, no. 2, pp. 226–41, Jan. 2010.
- [87] X. Hu, K. G. Neoh, J. Zhang, E. T. Kang, and W. Wang, "Immobilization strategy for optimizing VEGF's concurrent bioactivity towards endothelial cells and osteoblasts on implant surfaces," *Biomaterials*, vol. 33, pp. 8082–8093, 2012.
- [88] C. Lorenz et al., "Coating of Titanium Implant Materials with Thin Polymeric Films for Binding the Signaling Protein BMP2," *Macromol. Biosci.*, vol. 11, pp. 234–244, 2011.
- [89] C. K. Poh, Z. Shi, T. Y. Lim, K. G. Neoh, and W. Wang, "The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro," *Biomaterials*, vol. 31, pp. 1578–1585, 2010.
- [90] M. Sasaki, M. Inoue, Y. Katada, and T. Taguchi, "The effect of VEGF-immobilized nickel-free high-nitrogen stainless steel on viability and proliferation of vascular endothelial cells," *Colloids Surf., B*, vol. 92, pp. 1–8, 2012.
- [91] C. Herranz-Diez et al., "Bioactive compounds immobilized on Ti and TiNbHf: AFM-based investigations of biofunctionalization efficiency and cell adhesion," *Colloids Surf., B*, vol. 136, pp. 704–711, 2015.
- [92] H. Schliephake, C. Bötzel, A. Förster, B. Schwenzer, J. Reichert, and D. Scharnweber, "Effect of oligonucleotide mediated immobilization of bone morphogenic proteins on titanium surfaces.,"

Biomaterials, vol. 33, no. 5, pp. 1315–22, Feb. 2012.

- [93] Y. Liu, X. Shen, H. Zhou, Y. Wang, and L. Deng, “Chemical modification of chitosan film via surface grafting of citric acid molecular to promote the biomineralization,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 370, pp. 270–278, May 2016.
- [94] A. R. Sadeghi, S. Nokhasteh, A. M. Molavi, M. Khorsand-Ghayeni, H. Naderi-Meshkin, and A. Mahdizadeh, “Surface modification of electrospun PLGA scaffold with collagen for bioengineered skin substitutes,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 66, pp. 130–137, Sep. 2016.
- [95] J. Borges, J. M. Campina, H. K. S. Souza, M. P. Goncalves, and A. F. Silva, “Aggregation-induced conformational transitions in bovine [small beta]-lactoglobulin adsorbed onto open chitosan structures,” *Soft Matter*, vol. 8, pp. 1190–1201, 2012.
- [96] J. N. Talbert and J. M. Goddard, “Enzymes on material surfaces,” *Colloids Surf., B*, vol. 93, pp. 8–19, May 2012.
- [97] M. Martinelli, P. Froimowicz, M. Calderon, and M. Strumia, “Materiales poliméricos funcionalizados. Parte I: Síntesis y polimerización de monómeros funcionalizados,” *Rev. Iberoam. Polímeros*, vol. 4, no. 4, pp. 30–47, 2003.
- [98] E. Masaeli et al., “Peptide functionalized polyhydroxyalkanoate nanofibrous scaffolds enhance Schwann cells activity,” *Nanomedicine*, vol. 10, no. 7, pp. 1559–69, Oct. 2014.
- [99] F. Kessler et al., “Biodegradation improvement of poly(3-hydroxy-butyrate) films by entomopathogenic fungi and UV-assisted surface functionalization,” *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 130, pp. 57–67, Jan. 2014.
- [100] J. W. Page, “Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 103, no. 2.4, pp. 149–157, 1992.
- [101] S. Fidler and D. Dennis, “Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 103, no. 2–4, pp. 231–235, 1992.
- [102] J. M. L. Dias, A. Oehmen, L. S. Serafim, P. C. Lemos, M. A. M. Reis, and R. Oliveira, “Metabolic modelling of polyhydroxyalkanoate copolymers production by mixed microbial cultures,” *BMC Syst. Biol.*, vol. 2, no. May, 2008.
- [103] L. Bélard, F. Poncin-Epaillard, P. Dole, and L. Avérous, “Plasma-polymer coatings onto different biodegradable polyesters surfaces,” *Eur. Polym. J.*, vol. 49, no. 4, pp. 882–892, Apr. 2013.
- [104] E. García, “Modificación superficial de materiales poliméricos mediante fuentes de plasma frío,” Universidad Carlos III de Madrid, 2012.
- [105] Y. Satoh, N. Minamoto, K. Tajima, and M. Munekata, “Polyhydroxyalkanoate Synthase from

Bacillus sp. INTO05 Is Composed of PhaC and PhaR,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 94, no. 4, pp. 343–350, 2002.

- [106] R. Carpine et al., “Genetic engineering of *Synechocystis* sp. PCC6803 for poly- β -hydroxybutyrate overproduction,” *Algal Res.*, vol. 25, no. February, pp. 117–127, 2017.
- [107] G. W. Haywood, “The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 57, no. 1, pp. 1–6, 1989.
- [108] D. R. Williams, A. J. Anderson, E. A. Dawes, and D. F. Ewing, “Production of a co-polyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from succinic acid by *Rhodococcus ruber* biosynthetic considerations,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 40, no. 5, pp. 717–723, 1994.
- [109] E. Y. Lee, “Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by newly isolated *Agrobacterium* sp. SH-1 and GW-014 from structurally unrelated single carbon substrates,” *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 79, no. 4, pp. 328–334, 1995.
- [110] Y. Poirier, “Synthesis of high-molecular-weight poly([r]-(-)-3-hydroxybutyrate) in transgenic *Arabidopsis thaliana* plant cells,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 17, no. 1, pp. 7–12, 1995.
- [111] D. S. Syromotina et al., “Oxygen and ammonia plasma treatment of poly(3-hydroxybutyrate) films for controlled surface zeta potential and improved cell compatibility,” *Mater. Lett.*, vol. 163, pp. 277–280, Jan. 2016.
- [112] H. Arikawa, S. Sato, T. Fujiki, and K. Matsumoto, “A study on the relation between poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases or oligomer hydrolases and molecular weight of polyhydroxyalkanoates accumulating in *Cupriavidus necator* H16,” *J. Biotechnol.*, vol. 227, pp. 94–102, Jun. 2016.
- [113] M. Hyakutake et al., “Carboxy-terminal modification of polyhydroxyalkanoate (PHA) via alcoholysis reaction catalyzed by Class IV PHA synthase,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 117, pp. 90–96, Jul. 2015.
- [114] A. Bera, S. Dubey, K. Bhayani, D. Mondal, S. Mishra, and P. K. Ghosh, “Microbial synthesis of polyhydroxyalkanoate using seaweed-derived crude levulinic acid as co-nutrient,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 487–94, Jan. 2015.
- [115] C. Kourmentza and M. Kornaros, “Biotransformation of volatile fatty acids to polyhydroxyalkanoates by employing mixed microbial consortia: The effect of pH and carbon source,” *Bioresour. Technol.*, vol. 222, pp. 388–398, Dec. 2016.
- [116] Y. Dong, P. Li, C. Chen, Z. Wang, P. Ma, and G.-Q. Chen, “The improvement of fibroblast growth on hydrophobic biopolyesters by coating with polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with cell adhesion motif RGD,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 34, pp. 8921–30, Dec. 2010.

- [117] H. Xie, J. Li, L. Li, Y. Dong, G.-Q. Chen, and K. C. Chen, "Enhanced proliferation and differentiation of neural stem cells grown on PHA films coated with recombinant fusion proteins," *Acta Biomater.*, vol. 9, no. 8, pp. 7845–7854, Aug. 2013.
- [118] D. S. Syromotina et al., "Surface wettability and energy effects on the biological performance of poly-3-hydroxybutyrate films treated with RF plasma.," *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, vol. 62, pp. 450–7, May 2016.
- [119] M. González-Torres et al., "Surface modification of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by direct plasma-radiation-induced graft polymerization of N-hydroxyethyl-acrylamide," *Mater. Lett.*, vol. 175, pp. 252–257, Jul. 2016.
- [120] Y. T. Tai, C. P. Foong, N. Najimudin, and K. Sudesh, "Discovery of a new polyhydroxyalkanoate synthase from limestone soil through metagenomic approach.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 121, no. 4, pp. 355–64, Apr. 2016.
- [121] P. Höfer, P. Vermette, and D. Groleau, "Production and characterization of polyhydroxyalkanoates by recombinant *Methylobacterium extorquens*: Combining desirable thermal properties with functionality," *Biochem. Eng. J.*, vol. 54, no. 1, pp. 26–33, Mar. 2011.
- [122] S. Nkrumah-Agyeefi and C. Scholz, "Chemical modification of functionalized polyhydroxyalkanoates via 'Click' chemistry: A proof of concept.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 95, pp. 796–808, Feb. 2017.
- [123] K. Zhao, Y. Deng, J. Chun Chen, and G.-Q. Chen, "Polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds with good mechanical properties and biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 1041–1045, 2003.
- [124] D. Shum-Tim et al., "Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer," *Ann Thorac Surg*, vol. 68, no. 6, pp. 2298–304; discussion 2305, 1999.
- [125] P. Lemechko et al., "Designing exopolysaccharide-graft-poly(3-hydroxyalkanoate) copolymers for electrospun scaffolds," *React. Funct. Polym.*, vol. 73, no. 1, pp. 237–243, Jan. 2013.
- [126] M. H. Ross and W. Pawlina, "Tejido cartilaginoso," in *Histología. Texto y atlas color con biología celular y molecular*, 5th ed., Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, 2088, pp. 198–208.
- [127] U. Welsch, "Tejido cartilaginoso," in *Histología*, 2nd ed., München, Alemania: Editorial Médica Panamericana, 2010, pp. 127–131.
- [128] F. S. Silberman and O. Varaona, "Tejido cartilaginoso," in *Ortopedia y traumatología*, 3rd ed., Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2010, pp. 7–9.
- [129] Universidad Complutense Madrid, "Cartílago," *Mi museo de Histología Veterinaria. Salón de Tejidos*. [Online]. Available: <http://veterinaria.ucm.es/cartilago>.

- [130] M. M. Reverté Vinaixa, "Tratamiento de los defectos del cartílago articular en la rodilla," Tesis Doctoral, Departament de Cirurgia Universitat, Universidad Autónoma de Barcelona, 2015.
- [131] A. Álvarez López, C. Ortega González, Y. García Lorenzo, and J. M. Díaz Ruíz, "Microfracturas por vía artroscópica en pacientes con lesiones de cartílago de rodilla," *Rev. Arch. Médico Camagüey*, vol. 18, no. 1, pp. 55–68, 2014.
- [132] L. A. Gómez Carlín and C. A. Gutiérrez Parada, "Osteocondritis de tobillo. ¿Las microfracturas continúan siendo el estándar de oro?," *Orthotips*, vol. 12, no. 1, pp. 23–30, 2016.
- [133] A. Álvarez López, Y. García Lorenzo, G. López Lastre, and M. López lastre, "Lesiones del cartílago de la rodilla," *Rev. Arch. Médico Camagüey*, vol. 17, no. 1, pp. 103–113, 2013.
- [134] P. Cantó Loras, "Hidrogeles biodegradables para la regeneración de cartílago articular," Trabajo de grado, Escola Tècnica superior d'enginyeria agrònica i del medi natural, Universitat Politècnica de València, 2014.
- [135] M. M. Mata-Miranda, L. E. Paredes-González, C. M. Martínez-Martínez, and G. J. Vázquez-Zapién, "Implante de condrocitos autólogos con potencial en lesiones articulares," *Rev. Colomb. Ortop. y Traumatol.*, vol. 29, no. 1, pp. 28–35, 2015.
- [136] C. Sanjuán Fernández, "La microscopía electrónica de barrido SEM," *Patología + Rehabilitación + Construcción*. [Online]. Available: <https://www.patologiasconstruccion.net/2012/12/la-microscopia-electronica-de-barrido-sem-i-concepto-y-usos/>.
- [137] J. Goodge, "Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDS)," The Science Education Resource Center at Carleton College (SERC). [Online]. Available: https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/eds.html.
- [138] I. Gómez Pinilla and X. Arroyo Rey, "Difracción de Rayos x (DRX)," Universidad Complutense. Centro de asistencia a la investigación. [Online]. Available: <https://www.ucm.es/tecnicasgeologicas/difraccion-de-rayos-x-drx>.
- [139] J. L. Ruvalcaba Sil, "Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)," Análisis no destructivo para el estudio in situ del arte, la arqueología y la historia. [Online]. Available: http://www.fisica.unam.mx/andreahtecnicas_equipos/ftir.html.
- [140] F. Zuluaga, B. Insuasty, and B. Yates, *Análisis Orgánico Clásico y Espectral*. Cali: Universidad del Valle, 2000.
- [141] I. PerkinElmer, "A Beginner 's Guide," *Thermogravimetric Analysis (TGA)*, 2015. .
- [142] S. Suriñach, M. D. Baro, S. Bordas, N. Clavaguera, and M. T. Clavaguera-Mora, "La calorimetría diferencial de barrido y su aplicación a la Ciencia de Materiales," *Bol. la Soc. Española Cerámicos y*

Vidr., vol. 31, no. 1, pp. 11–17, 1992.

- [143] G. Pérez, “Espectrometría de resonancia magnética nuclear,” *Espectrometria.com*. [Online]. Available: https://www.espectrometria.com/espectrometra_de_resonancia_magntica_nuclear.
- [144] J. M. García García, “Desarrollo y modificación de biomateriales basados en poli (3-hidroxicanoatos) para aplicaciones biomédicas e ingeniería tisular,” Thesis doctoral, Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Universidad Autónoma de Madrid, 2012.
- [145] A. I. Cañas, “Plataformas de Quitosán obtenido a partir de hongo *Ganoderma lucidum* para crecimiento celular,” Universidad de Antioquia, 2011.
- [146] Merck, “Ficha de datos de seguridad.” pp. 1–30, 2006.
- [147] T. Kokubo and H. Takadama, “How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [148] World Trade Organization Technical Barriers to Trade (TBT) Committee, “ASTM F748-16 Standard Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices.” pp. 1–7, 2018.
- [149] International Organization for Standardization, “ISO 10993 Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.” pp. 1–42, 2009.
- [150] M. P. Arrieta, J. López, A. Hernández, and E. Rayón, “Ternary PLA–PHB–Limonene blends intended for biodegradable food packaging applications,” *Eur. Polym. J.*, vol. 50, pp. 255–270, Jan. 2014.
- [151] M. P. Arrieta, E. Fortunati, F. Dominici, J. López, and J. M. Kenny, “Bionanocomposite films based on plasticized PLA-PHB/cellulose nanocrystal blends,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 121, pp. 265–75, May 2015.
- [152] Y.-X. Weng, L. Wang, M. Zhang, X.-L. Wang, and Y.-Z. Wang, “Biodegradation behavior of P(3HB,4HB)/PLA blends in real soil environments,” *Polym. Test.*, vol. 32, no. 1, pp. 60–70, Feb. 2013.
- [153] M. P. Arrieta, E. Fortunati, F. Dominici, E. Rayón, J. López, and J. M. Kenny, “Multifunctional PLA-PHB/cellulose nanocrystal films: processing, structural and thermal properties,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 107, pp. 16–24, Jul. 2014.
- [154] M. P. Arrieta, J. López, E. Rayón, and A. Jiménez, “Disintegrability under composting conditions of plasticized PLA–PHB blends,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 108, no. 2014, pp. 307–318, 2014.
- [155] S. V. Naveen, I. K. P. Tan, Y. S. Goh, H. R. Balaji Raghavendran, M. R. Murali, and T. Kamarul, “Unmodified medium chain length polyhydroxyalkanoate (uMCL-PHA) as a thin film for tissue engineering application – characterization and in vitro biocompatibility,” *Mater. Lett.*, vol. 141, pp. 55–58, Feb. 2015.

- [156] M. H. Erbetta Leite, "Formulação e caracterização de matrizes de polihidroxibutirato para liberação controlada de fármacos," Tesis de Maestría, Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2004.
- [157] F. T. Zohora and A. Y. M. A. Azim, "Biomaterials as porous scaffolds for tissue engineering applications: A review," *Eur. Sci. J.*, vol. 10, no. 21, pp. 186–209, 2014.
- [158] C. Sanhueza, F. Acevedo, S. Rocha, P. Villegas, M. Seeger, and R. Navia, "Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 124, pp. 102–110, 2019.
- [159] W. M. Chávez Montes, "Estudio de las propiedades termomecánicas del nanocompuesto PLA/C30B con distintos pesos moleculares después de ser sometido a condiciones de intemperismo acelerado," 2016.
- [160] Q. Guan, "Fabrication and Characterization of PLA , PHBV and Chitin Nanowhisiker Blends, Composites and Foams for High Strength Structural Applications," Tesis de Maestría, Mechanical Engineering, University of Toronto, 2013.
- [161] M. R. Nanda, M. Misra, and A. K. Mohanty, "The effects of process engineering on the performance of PLA and PHBV blends," *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 296, no. 8, pp. 719–728, 2011.
- [162] G. Widmann, "Informaciones para los usuarios de los sistemas de termoanálisis METTLER TOLEDO." *UserCom*, pp. 1–20, 2001.
- [163] S. Dharmalingam, "Biodegradation and photodegradation of polylactic acid and polylactic acid/polyhydroxyalkanoate blends nonwoven agricultural mulches in ambient soil conditions," Tesis Doctoral, University of Tennessee, 2014.
- [164] K. Szuman, I. Krucińska, M. Boguń, and Z. Draczyński, "PLA/PHA-Biodegradable Blends for Pneumothermic Fabrication of Nonwovens," *Autex Res. J.*, vol. 16, no. 3, pp. 119–127, Jan. 2016.
- [165] R. Li et al., "Psychrotrophic *Pseudomonas mandelii* CBS-1 produces high levels of poly- β -hydroxybutyrate," *Springerplus*, vol. 2, no. 1:335, 2013.
- [166] A. Althuri, J. Mathew, R. Sindhu, R. Banerjee, A. Pandey, and P. Binod, "Microbial synthesis of poly-3-hydroxybutyrate and its application as targeted drug delivery vehicle," *Bioresour. Technol.*, vol. 145, pp. 290–296, 2013.
- [167] O. A. Vega Castro, "Extracción y caracterización estructural de un PHA, obtenido de residuos de cáscara de yuca y piña mediante procesos de fermentación; y su aplicación en la fabricación de fibras por electrospinning," 2016.
- [168] E. Taskin, N. Besirli, B. Hazer, and G. Cavus, "Synthesis of Some Novel Blends of Polylactide with Polylactide-b-Poly (ethylene glycol) Block Copolymers," *J. Macromol. Sci. Part A*, vol. 49, no. 2,

2012.

- [169] P. Singla, D. Berek, R. Mehta, and S. N. Upadhyay, "Microwave Assisted Synthesis of Poly(Lactic acid) and its Characterization using Size Exclusion Chromatography," *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem. A*, vol. 49, no. 11, 2012.
- [170] I. N. Gómez Miranda, "Curso: Diseño de experimentos," 2018.
- [171] J. C. Sánchez Naranjo, "Fisiología del condrocito articular," *Rev. Colomb. Reumatol.*, vol. 15, no. 1, pp. 21–33, 2008.
- [172] "Chapter 4. Structure - Properties of soft tissues articular cartilage," in *Structural biological materiales. Design and structure - Property relationships*, 2000, pp. 75–103.
- [173] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, and D. S. Kumar, "Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review," *Int. J. Polym. Sci.*, vol. 2011, no. ii, p. 19, 2011.
- [174] Z. Chen et al., "Laminated electrospun nHA/PHB-composite scaffolds mimicking bone extracellular matrix for bone tissue engineering," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 72, pp. 341–351, 2017.
- [175] M. M. Nava, L. Draghi, C. Giordano, and R. Pietrabissa, "The effect of scaffold pore size in cartilage tissue engineering," *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.*, vol. 14, no. 3, pp. e223–e229, 2016.
- [176] E. C. Beck, M. Barragan, M. H. Tadros, S. H. Gehrke, and M. S. Detamore, "Approaching the compressive modulus of articular cartilage with a decellularized cartilage-based hydrogel," *Acta Biomater.*, vol. 38, pp. 94–105, 2016.
- [177] M. X. Ma, Q. Liu, C. Ye, B. Grottkau, B. Guo, and Y. F. Song, "Preparation of P3HB4HB/(Gelatin + PVA) Composite Scaffolds by Coaxial Electrospinning and Its Biocompatibility Evaluation," *Biomed Res. Int.*, vol. 2017, p. 12, 2017.
- [178] J. Ramier et al., "Biocomposite scaffolds based on electrospun poly(3-hydroxybutyrate) nanofibers and electrosprayed hydroxyapatite nanoparticles for bone tissue engineering applications," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 38, no. 1, pp. 161–169, 2014.
- [179] A. J. Sánchez Egea, M. Valera, J. M. Parraga Quiroga, I. Proubasta, J. Noailly, and D. Lacroix, "Impact of hip anatomical variations on the cartilage stress: A finite element analysis towards the biomechanical exploration of the factors that may explain primary hip arthritis in morphologically normal subjects," *Clin. Biomech.*, vol. 29, no. 4, pp. 444–450, 2014.
- [180] A. D. Speirs, P. E. Beaulé, A. Huang, and H. Frei, "Properties of the cartilage layer from the cam-type hip impingement deformity," *J. Biomech.*, vol. 55, no. 2017, pp. 78–84, 2017.
- [181] J. Wu, J. Sun, and J. Liu, "Evaluation of PHBV/calcium silicate composite scaffolds for cartilage tissue engineering," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 317, no. 2014, pp. 278–283, 2014.

- [182] M. Quintero, J. Monfort, and D. R. Mitrovic, *Osteoartritis. Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento*. Panamericana, 2010.
- [183] M. Jacas Torné, E. Sánchez Noda, N. García Mesa, and D. Piña Ares, “Apósito biológico esterilizado con gas óxido de etileno,” *Rev Cuba. Ortop Traumatol*, vol. 25, no. 2, pp. 128–135, 2011.
- [184] L. P. López Anaya, “Óxido de etileno , utilización como agente esterilizante y riesgos para la salud del personal sanitario,” *CES Salud Pública.*, vol. 5, pp. 154–162, 2014.
- [185] Michigan State University, “The nature of vibrational spectroscopy,” Departamento de Química. [Online]. Available: <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/infrared/irspec1.htm>.
- [186] E. I. Shishatskaya, N. G. Menzyanova, and A. A. Shumilova, “The effect of the chemical composition and structure of polymer films made from resorbable polyhydroxyalkanoates on blood cell response,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 141, pp. 765–774, 2019.
- [187] Y. Ke, X. Y. Zhang, S. Ramakrishna, L. M. He, and G. Wu, “Reactive blends based on polyhydroxyalkanoates: Preparation and biomedical application,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 70, pp. 1107–1119, 2017.