UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Elaboración de andamios biológicos mediante lixiviación de microesferas para aplicaciones biomédicas

---

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación *"Elaboración de andamios biológicos a partir de polímeros naturales y un extracto de Clinopodium tomentosum (Kunth)",* aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2023-0205-R por el Consejo de Investigación e Innovación de la Universidad Técnica de Ambato.

Autor: Melissa Belen Freire Galarza

Tutor: Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

Ambato – Ecuador

Agosto - 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Ambato, 28 de junio de 2024

Firmado electrónicamente por:
LORENA DE LOS ANGELES NUNEZ VILLACIS

Dra. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

1804256905

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Melissa Belen Freire Galarza, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción de Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Melissa Belen Freire Galarza

1850089937

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Melissa Belen Freire Galarza

1850089937

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
ALEX FABIAN
VALENCIA SILVA

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
MANOELLA ALEJANDRA
SANCHEZ GARNICA

Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica

0604079871

Firmado electrónicamente por:
HELENA MARITZA DE
LA TORRE OLVERA

Dra. Helena Maritza De La Torre Olvera

1309651998

Ambato, 02 de agosto de 2024

DEDICATORIA

*A **Dios** y la **Virgen María** por ser fuente de fortaleza y sabiduría, por guiarme en cada paso de la vida y permitirme alcanzar este logro.*

*En memoria de mi padre **Luis Gilberto Freire Medina** mi más grande amor, mi héroe y ahora mi ángel. Por demostrarme de lo que es capaz el amor incondicional de un padre. Sé lo feliz que hubiese estado en este momento, pero también sé que en lo infinito del cielo está sonriendo y orgulloso de mi. Hoy, con lágrimas en los ojos y el corazón lleno de gratitud, le dedico esta tesis. Le extraño tanto y le honro en cada logro.*

*A mi querida madre **Mercedes,** mi ser de inspiración y motivación, por su amor infinito y por siempre creer en mí. Nunca se vaya de mi lado.*

*A mi hermano **Steven,** mi compañero de vida y amigo incondicional, por ser ese ejemplo de unidad y confianza.*

Melissa Belen Freire Galarza

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por la vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, por darme la capacidad de aprender y adentrarme en el conocimiento. Su fuerza y gracia ha sido luz en este caminar.

A mis amados padres. En especial a mi padre como no agradecerle todo su amor y esfuerzo que hoy se ven reflejados en este trabajo, gracias por quererme y cuidarme tanto hasta cuando la vida lo permitió, por confiar en mí y aunque ya no este físicamente aquí sé que sigue cuidándome y guiándome desde el cielo. A mi madre Mercedes gracias por todo su amor, dedicación y esfuerzo, que la vida me alcance para devolverle todo lo que hace por mí. A mi hermano por compartir este viaje llamado vida, por ser ese motor que me inspira a continuar. Gracias por todo y por tanto.

A mi tutora Dra. Lorena Núñez por confiar en mí, quién con su apoyo, conocimientos, enseñanzas y paciencia supo guiarme y motivarme en todo este proceso y permitirme llegar a esta instancia tan anhelada. Mi gratitud y admiración.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por abrirme sus puertas para formarme profesional y personalmente. Al docente Mg. Cristian Galarza por sus palabras de aliento y ayuda en los momentos difíciles.

A mis abuelitos, mis queridas tías y primos, gracias por estar siempre conmigo en los días buenos y malos, gracias por enseñarme el verdadero significado de la familia.

A mis amigos: Ani, Pame, Mica, Les, Eder, Jeni (mi amiguita de laboratorio), Kerly, Carito, Lenin, Michael, Anto, y como no a mi querida amiga-prima Naye, infinitas gracias por su amistad y su apoyo, por los momentos vividos en esta travesía, las anécdotas, las risas y por extender su mano cuando mi mundo se derrumbaba, son muchos los recuerdos que vivirán en mi corazón.

Que la vida les recompense todo lo que hacen por mí.

Melissa Belen Freire Galarza

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN iii
DERECHOS DE AUTOR iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA vi
AGRADECIMIENTO ii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS iii
ÍNDICE DE FIGURAS vi
INDICE DE TABLAS vii
INDICE DE ANEXOS viii
GLOSARIO ix
RESUMEN EJECUTIVO x
ABSTRACT xi
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO 1
1.1. Antecedentes investigativos 1
1.1.1. Planteamiento del problema y justificación 1
1.1.2. Ingeniería de tejidos (IT) 2
1.1.2.1. Ingeniería de tejido óseo (ITO) 3
1.1.3. Componentes necesarios para la ingeniería de tejidos 4
1.1.3.1. Células 5
1.1.3.2. Factores de crecimiento 6
1.1.3.3. Andamios 7
1.1.4. Biomateriales para la elaboración de andamios biológicos 7
1.1.4.1. Biopolímeros 7
1.1.4.1.1. Biopolímeros naturales 8
1.1.4.1.2. Biopolímeros sintéticos 10
1.1.5. Fabricación de andamios biológicos 12
1.1.5.1. Métodos convencionales 12
1.1.5.2. Métodos avanzados 13
1.1.6. Propiedades y características de andamios biológicos 14
1.1.6.1. Propiedades morfológicas y mecánicas 14
1.1.6.2. Propiedades biológicas 15
1.2. Objetivos 16
1.2.1. Objetivo General 16

1.2.2. Objetivo Específicos 16
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA 17
2.1. Materiales 17
2.1.1. Reactivos 17
2.1.2. Material fungible 18
2.1.3. Equipos de laboratorio 18
2.2. Métodos 19
2.2.1. Fabricación andamios biológicos con biopolímeros por el método de lixiviación de microesferas 19
2.2.1.1. Preparación de las microesferas de gelatina 19
2.2.1.2. Preparación de las soluciones poliméricas 19
2.2.1.3. Fabricación de los andamios por lixiviación de microesferas 19
2.2.2. Caracterización los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y mecánicas 20
2.2.2.1. Evaluación morfológica 20
2.2.2.2. Evaluación de la porosidad 21
2.2.2.3. Evaluación de la tasa de trasmisión de vapor de agua (WVTR) 21
2.2.2.4. Evaluación mecánica 22
2.2.3. Evaluación de los andamios fabricados mediante pruebas biológicas in vitro 22
2.2.3.1. Evaluación de la capacidad de absorción de agua 22
2.2.3.2. Evaluación de la biodegradabilidad 22
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 24
3.1. Análisis y discusión de los resultados 24
3.1.1. Fabricación de andamios biológicos con biopolímeros por el método de lixiviación de microesferas 24
3.1.1.1. Preparación de las microesferas de gelatina 24
3.1.1.2. Fabricación de andamios biológicos por lixiviación de microesferas 25
3.1.2. Caracterización de andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y mecánicas 28
3.1.2.1. Evaluación morfológica 29
3.1.2.2. Evaluación de la porosidad 33
3.1.2.3. Evaluación de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) 35
3.1.2.4. Evaluación mecánica 37
3.1.3. Evaluación de los andamios fabricados mediante pruebas biológicas in vitro 42
3.1.3.1. Evaluación de la capacidad de absorción de agua. 42
3.1.3.2. Evaluación de la biodegradabilidad. 44
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 50

4.1. Conclusiones 50
4.2. Recomendaciones 52
MATERIALES DE REFERENCIA 53
Referencias Bibliográficas 53
ANEXOS 64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes principales de la ingeniería de tejido óseo 4
Figura 2. Desacetiliación de la quitina en la producción de quitosano 9
Figura 3. Síntesis de la Policaprolactona (PCL) 11
Figura 4. Elaboración de andamios por lixiviación de porógenos 13
Figura 5. Proceso de elaboración de andamios biológicos de quitosano y policaprolactona por lixiviación de microesferas de gelatina 20
Figura 6. Micrografías SEM de microesferas de gelatina 24
Figura 7. ABs obtenidos por lixiviación de microesferas de gelatina 27
Figura 8. Micrografías SEM de los ABs a los 30 minutos del proceso de lixiviación 28
Figura 9. Micrografías SEM de la superficie de los ABs 30
Figura 10. Micrografías SEM del corte de los ABs 31
Figura 11. Porcentaje de porosidad de los ABs 34
Figura 12. Tasa de trasmisión de vapor de agua (WVTR) de los ABs 36
Figura 13. Evaluación de las propiedades mecánicas de lo ABs por ensayo de tracción 39
Figura 14. Evaluación de las propiedades mecánicas de lo ABs por dureza shore 41
Figura 15. Capacidad de absorción de agua de los ABs 43
Figura 16. Biodegradabilidad de los ABs en fluido corporal simulado (SBF) 46
Figura 17. Biodegradabilidad de los ABs en plasma sanguíneo humano 47

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Composición de las soluciones poliméricas 25
Tabla 2 Pesos de los andamios antes y después de lixiviar 26

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Preparación de microesferas de gelatina 64
Anexo 2 Preparación de las soluciones poliméricas 64
Anexo 3 Elaboración de andamios por lixiviación de microesferas 65
Anexo 4 Evaluación de las propiedades morfológicas 65
Anexo 5 Evaluación de las propiedades mecánicas 66
Anexo 6 Evaluación de la capacidad de absorción de agua 66
Anexo 7 Evaluación de la biodegradabilidad 67
Anexo 8 Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de porosidad 68
Anexo 9 Datos obtenidos para la determinación de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) 68
Anexo 10 Datos obtenidos para la determinación de las pruebas mecánicas (ensayo de tracción) 68
Anexo 11 Datos obtenidos para la determinación de las pruebas mecánicas (dureza shore) 69
Anexo 12 Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de capacidad de absorción de agua 69
Anexo 13 Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de biodegradabilidad en SBF 72
Anexo 14 Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de biodegradabilidad en plasma sanguíneo 74
Anexo 15 Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la porosidad 76
Anexo 16 Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR) 77
Anexo 17 Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de las propiedades mecánicas (ensayo de tracción) 78
Anexo 18 Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de las propiedades mecánicas (dureza shore) 82
Anexo 19 Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la capacidad de absorción de agua 84
Anexo 20 Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la biodegradabilidad en SBF 85
Anexo 21 Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la biodegradabilidad en plasma sanguíneo 86

GLOSARIO

AB: Andamio Biológico

ABs: Andamios Biológicos

IT: Ingeniería de tejidos

ITO: Ingeniería de tejido óseo

ECM: Matriz extracelular

MSC: Células madre mesenquimales

ESC: Células madre embrionarias

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas

BMP: Proteínas morfogénicas óseas

GF: Factores de crecimiento

PCL: Policaprolactona

PLA: Ácido poliláctico

PLGA: Poli(ácido láctico-co-glicólico)

PGA: Ácido poliglicólico

PGE: Polietilenglicol

Q: Quitosano

PBS: Tampón fosfato sódico

SBF: Fluido corporal simulado

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido

RESUMEN EJECUTIVO

Los defectos óseos son uno de los principales problemas de salud global, la escasez de sustitutos convencionales para tratar esta deficiencia supone una desventada clínica, es así como la ingeniería de tejido óseo (ITO) mediante la combinación de células, factores de crecimiento y andamios, ha surgido como una alternativa prometedora en la regeneración de tejidos funcionales. En este estudio se elaboraron andamios biológicos (ABs) de quitosano y policaprolactona (PCL) mediante lixiviación de microesferas de gelatina en diferentes concentraciones de 25, 50 y 75 por ciento con el fin de evaluar su incidencia sobre las propiedades morfológicas, mecánicas y biológicas. Se obtuvieron andamios macro y microporosos (90 a 600 micrómetros), los andamios con una mayor concentración de microesferas presentaron una porosidad de 85.29 por ciento, resultando ser más favorables sobre las demás propiedades de los ABs, con una tasa de trasmisión de vapor de agua de 117.18 gramos por metro cuadrado en 24 horas, una capacidad de absorción de agua del 249.02 por ciento y una biodegradabilidad del 31.09 y 54.41 por ciento en fluido corporal simulado (SBF), y plasma sanguíneo respectivamente, difiriendo únicamente en las propiedades mecánicas con un módulo de elasticidad de 386.70 kilopascales, que indicó una menor rigidez del material. Los ABs resultantes demostraron propiedades adecuadas que pueden ser aplicados en ITO, dependiendo de las características, andamios con una mayor porosidad para huesos esponjosos y de rápida integración celular, y andamios de menor porosidad para huesos densos que requieran mayor resistencia mecánica.

Palabras Clave: Ingeniería de tejido óseo (ITO), andamios biológicos, biopolímeros, quitosano, policaprolactona (PCL), lixiviación, microesferas, biodegradabilidad.

ABSTRACT

Bone defects are one of the main global health problems, and the scarcity of conventional substitutes to treat this deficiency is a clinical disadvantage. Thus, bone tissue engineering (BTE) through the combination of cells, growth factors and scaffolds has emerged as a promising alternative in the regeneration of functional tissues. In this study, chitosan and polycaprolactone (PCL) biological scaffolds (ABs) were prepared by leaching gelatin microspheres at different concentrations of 25, 50 and 75 percent in order to evaluate their impact on morphological, mechanical and biological properties. Macroporous and microporous scaffolds (90 to 600 micrometers) were obtained, the scaffolds with a higher concentration of microspheres presented a porosity of 85.29 percent, proving to be more favorable on the other properties of the ABs, with a water vapor transmission rate of 117. 18 grams per square meter in 24 hours, a water absorption capacity of 249.02 percent and a biodegradability of 31.09 and 54.41 percent in simulated body fluid (SBF), and blood plasma respectively, differing only in mechanical properties with a modulus of elasticity of 386.70 kilopascals, which indicated a lower stiffness of the material. The resulting ABs demonstrated suitable properties that can be applied in ITO, depending on the characteristics, scaffolds with higher porosity for spongy bones and rapid cell integration, and scaffolds with lower porosity for dense bones requiring higher mechanical strength.

Keywords: Bone tissue engineering (BTE), biological scaffolds, biopolymers, chitosan, polycaprolactone (PCL), leaching, microspheres, biodegradability.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Planteamiento del problema y justificación

El daño o perdida de tejidos y órganos son uno de los principales problemas de salud global **(Sharma et al., 2019)**. Hasta la actualidad se han empleado tratamientos que incluyen dispositivos mecánicos, terapia con medicamentos y trasplantes (xenotrasplantes y humanos), siendo este última, la práctica más común realizada tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo **(Abbasian et al., 2019)**. En el Ecuador para el año 2022 se encontraban 1827 personas inscritas en la lista de espera y se realizaron trasplantes de órganos, tejidos y células a 597 pacientes **(Espinel et al., 2023).** La razón principal que contribuye a estas estadísticas es la insuficiencia de tejidos y órganos donados, además de las complicaciones postoperatorias y rechazos inmunogénicos existentes **(Kupiec-Weglinski, 2022).**

Los tejidos y órganos están constituidos por componentes celulares y una matriz extracelular (ECM). La ECM proporciona un ambiente funcional, regular e integral y se compone de proteínas fibrosas, glicoproteínas adhesivas y glucosaminoglicanos **(Jo et al., 2021).** Una de las proteínas más abundantes de la ECM es el colágeno que representa aproximadamente una cuarta parte de la masa proteica del cuerpo humano, siendo el Tipo I el más frecuente en tejidos conectivos y de soporte como los huesos, piel, tendones y ligamentos **(Brudnicki et al., 2022).** Estos componentes están sujetos a sufrir cambios y perdidas en su estructura, presentando una capacidad terapéutica escasa, lo que conducen al desarrollo de lesiones y enfermedades cancerígenas, fibroproliferativas y ortopédicas **(Arseni et al., 2018).**

El tejido óseo representa un papel importante en el mantenimiento y protección de los demás órganos y tejidos **(Ansari, 2019).** El daño y desgaste de este tejido se da en consecuencia de infecciones, traumatismos accidentales y causas patológicas, afectando a más de 200 millones de personas a nivel mundial **(Wu et al., 2020).** Actualmente el tratamiento para las deficiencias del tejido se centra en injertos de naturaleza autóloga y alogénica, sin embargo, el uso de estos injertos supone riesgos de desarrollar respuestas inmunes, suministros inadecuados, procedimientos adicionales **(Abdelaziz et al., 2023).** Por lo que en la actualidad las enfermedades, defectos y escasez de sustitutos óseos que imiten

las propiedades físicas y biológicas del tejido sano siguen siendo uno de los principales desafíos clínicos, científicos y socioeconómicos **(Xue et al., 2022).**

Por tanto, la ingeniería de tejidos (IT), como un enfoque multidisciplinario se ha destinado a construir y reconstruir órganos y tejidos tanto blandos como duros, al combinar células con andamios biológicos que actúen como ECM sintética al imitar la ECM nativa, permitiendo la adhesión, proliferación y crecimiento celular al adicionar factores de crecimiento **(Iijima & Otsuka, 2020).** Es así como, en las últimas décadas la ingeniería de tejido óseo (ITO) ha surgido como un enfoque prometedor en la reparación de defectos en el tejido óseo con el propósito de reducir los riesgos y complicaciones relacionados con los tratamientos convencionales **(Abdelaziz et al., 2023).** Los andamios biológicos como componentes esenciales en la ingeniería de tejidos proporcionan un microambiente adecuado para la proliferación y diferenciación celular, además de tener la misma función de la ECM, permiten mantener la unión celular proporcionando una estructura física y de soporte al tejido **(Schmidt et al., 2021).** Siendo los biopolímeros el material más prometedor en la elaboración de andamios biológicos en ingeniería de tejidos óseos **(Jeyachandran & Cerruti, 2023).** Estos polímeros pueden ser de origen natural como el quitosano, colágeno, celulosa, fibroína de seda, gelatina y elastina, que poseen alta biocompatibilidad y biodegradabilidad, y de forma sintética como la policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliglicólico (PGA) y polietilenglicol (PGE) que se caracterizan por sus excelentes propiedades mecánicas y estructuras personalizadas **(Donnaloja et al., 2020),** permitiendo simular las condiciones ideales del tejido huésped, de forma que se replique con precisión *in vitro* la arquitectura del tejido natura similar a lo que ocurre *in vivo* **(Abdelaziz et al., 2023).**

Consecuentemente, el presente trabajo pretende combinar biopolímeros como estrategia en la elaboración de andamios biológicos altamente porosos por el método de lixiviación de microesferas para imitar la matriz extracelular y seleccionar aquellas estructuras de soporte que presenten características multifuncionales para la regeneración de tejidos.

1.1.2.Ingeniería de tejidos (IT)

La ingeniería de tejidos (IT) es un campo multidisciplinario que busca asociar los principios de ingeniería y ciencias biológicas con el objetivo de restaurar, mantener y potenciar la funcionalidad de

tejidos y órganos deteriorados **(Schmidt et al., 2021).** El término IT se introdujo por primera vez en 1987, con el fin de combinar la medicina regenerativa con la tecnología, la ciencia de los materiales, métodos químicos, físicos y biológicos que introduzcan la interacción entre células y materiales con los procesos regenerativos de un tejido en específico, superando las limitaciones de las terapias convencionales como la deficiencia de dispositivos, órganos y tejidos funcionales como sustitutos en organismos vivos, además de ser un potencial científico, ético y económico **(Abdelaziz et al., 2023).**

La IT es considerada una herramienta de vital importancia en la medicina regenerativa, mediante la manipulación celular, la ciencia de los materiales y la bioingeniería se ha permitido el diseño, construcción y desarrollo de estructuras destinadas a regenerar y repara tejidos biomiméticos, como la piel, óseos, musculares, nerviosos, cardiacos, de cartílago, ligamentos y tendones, entre otros **(B. Guo & Ma, 2018).** Es asi que la IT comprende el desarrollo de células, andamios biológicos y factores de crecimiento a fin de proporcionar un sustituto biológico que sea estructural, mecánica y biológicamente funcional a un tejido **(Caddeo et al., 2017).** Elaborar estas estructuras requiere de cierta complejidad, por tanto, es necesario tener en cuenta las características específicas del tejido que se pretende imitar, de forma que esta ECM sintética actúe como una ECM del tejido nativo **(Sharma et al., 2019).**

Los andamios deben presentar compatibilidad tanto con las células específicas del tejido como con el entorno nativo, por tanto los diferentes tejidos y órganos necesitaran de diseños y materiales únicos, ya sea con biopolímeros naturales como el colágeno, quitosano, gelatina, que se caracterizan por poseer un alto grado de biocompatibilidad y biodegradabilidad, o de forma sintética como la PCL, PLA, PGA, PLGA, PGE, que presentan excelentes características mecánicas, por lo que su fabricación dependerá de las características morfológicas, mecánicas y biológicas requeridas de modo que puedan diferenciarse, proliferar y organizarse en el tejido u órgano deseado **(Kumar & Jacob, 2022).**

1.1.2.1. Ingeniería de tejido óseo (ITO)

El tejido óseo constituye el tejido más grande del cuerpo humano incluye funciones de estructura, protección y unión para demás tejidos **(Ansari, 2019).** Este tejido posee una estructura orgánica-inorgánica compleja, la matriz orgánica que corresponde del 20 al 30% está compuesta principalmente colágeno del tipo I y la matriz inorgánica que consta de 45 a 60% de minerales inorgánicos y cristales de hidroxiapatita (HA) y un 10 a 20% de agua **(Abdelaziz et al., 2023).**

Los defectos óseos se dan en consecuencia de: traumatismos, enfermedades congénitas y metabólicas, infecciones, tumores y trastornos de desarrollo que afectan a su estructura y composición **(Xu et al., 2024).** La capacidad que posee este tejido para autoregenerarse es mínima, hasta la actualidad, su reconstrucción y recompensación se ha basado en trasplantes de injerto óseo autólogo, alogénico y xenogénico, sin embargo, estos tratamientos presentan sus propias limitaciones **(Filippi et al., 2020).**

La ingeniería de tejido óseo (ITO) ha surgido como una estrategia innovadora en el campo de la medicina regenerativa, mediante la investigación y desarrollo de biomateriales que promuevan la regeneración de tejidos defectuosos, el combinar andamios biológicos con células especializadas del tejido y factores de crecimiento son el punto de partida en el desarrollo de estructuras tridimensionales avanzadas que faciliten la reparación del tejido óseo **(Xu et al., 2024).**

1.1.3.Componentes necesarios para la ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos comprende el uso de andamios, células y factores de crecimiento, siendo los componentes principales y más importantes de esta estrategia regenerativa, en ingeniería de tejido óseo se han utilizado diferentes tipos de andamios y estrategias que permitan mejorar el tratamiento frente a los daños de este tejido **(Figura 1) (Fernandez-Yague et al., 2015).**

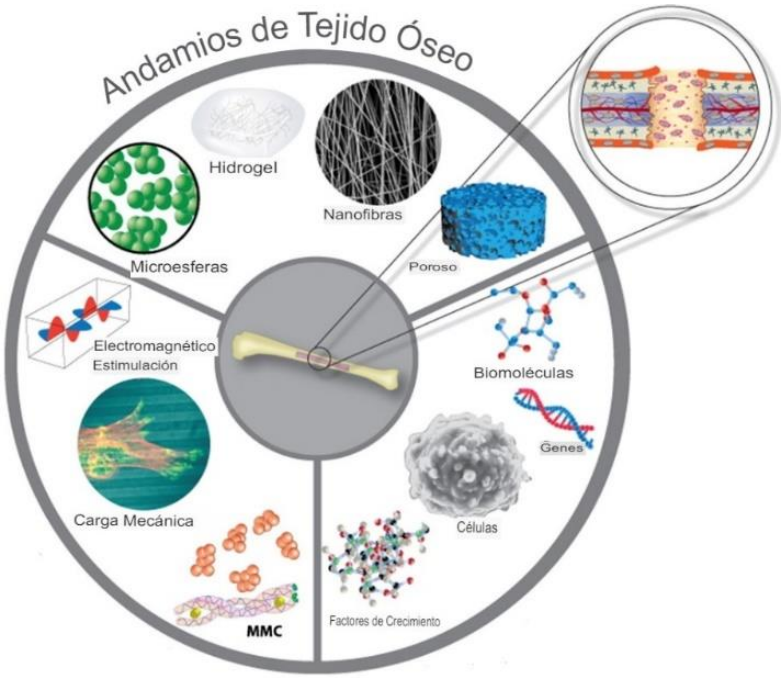


Figura 1. *Componentes principales de la ingeniería de tejido óseo*

Nota: Adaptado de: Enfoques biomiméticos en ingeniería de tejido óseo: integración de estrategias biológicas y fisicomecánicas **(Fernandez-Yague et al., 2015).**

1.1.3.1. Células

Las células representan la fuente principal en la regeneración de tejidos, estas son implantadas en una estructura denominada andamio de modo que puedan proliferar y diferenciarse en un tejido nuevo **(Gautam & Ambwani, 2019).** La elección de la fuente y el número de células depende del modelo y características del tejido nativo que se busca replicar **(Moysidou et al., 2021).** En ingeniería de tejidos se han empleado tanto células diferenciadas somática y células indiferenciadas como las células madre, adultas y fetales **(Kwon et al., 2018).**

Las células óseas son el componente principal en el funcionamiento de los huesos, desde actividades mecánicas, sintéticas y metabólicas, siendo los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos las células implicadas en la estructura y regeneración ósea **(Ansari, 2019).** Hasta la actualidad en ITO se ha hecho uso de células diferenciadas como los osteoblastos y osteoclastos, y células indiferenciadas como las células madre mesenquimales (MSC), las células madre embrionarias (ESC) y las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), siendo las más prometedoras para la regeneración de este tejido **(L. Guo et al., 2021).** La elección de la fuente celular dependerá de factores como: uso de células autólogas o alogénicas, disponibilidad, capacidad de diferenciación, tasa de proliferación y la posibilidad de inmunogenicidad **(Kargozar et al., 2019).**

Las células completamente diferenciadas han sido utilizadas en estudios relacionados con la citocompatibilidad y el potencial osteogénico, sin embargo, han presentado proliferación *in vitro* restringida, considerándose un impedimento para usos *in vivo*, por lo que sus aplicaciones se basan principal en la evaluación funcional de biomateriales **(Kargozar et al., 2019).** Es asi que el uso de células madre gracias a su potencial terapéutico se han considerado una fuente más fiable y adecuada para la regeneración ósea, incluyen las células madre mesenquimales (MSC) que pueden aislarse de diversas fuentes como el tejido adiposo, las amígdalas y la médula ósea, además de que poseen una capacidad de diferenciación ilimitada en linajes de células como osteoblastos, condrocitos, miocitos y adipocitos, siendo las células madre derivadas de la médula ósea las más investigadas y utilizadas **(Perez et al., 2018).** Asi mismo las células madre embrionarias (ESC) han demostrado capacidad de diferenciación en linajes especializados del hueso, sin embargo, la formación de tumores en uno de los

principales inconvenientes con el uso de este tipo de células **(Kargozar et al., 2019).** Las células pluripotentes inducidas (iPSC) con consideradas un gran potencial en la medicina regenerativa, ya que tiene la capacidad mayor de diferenciarse en osteoblastos además de formar material mineralizado similar al hueso **(Perez et al., 2018).**

1.1.3.2. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento (GF) son moléculas de señalización implicados en varios procesos biológicos, derivan de diferentes tipos de células como los fibroblastos, macrófagos, etc., desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de estímulos celulares que promueven la proliferación, diferenciación y migración celular, fundamental en la curación de heridas y respuestas inmunitarias **(Ren et al., 2020).**

En ingeniería de tejidos los factores de crecimiento son necesarios para crear vínculos bioquímicos entre las células y su entorno, facilitando la reconstrucción del tejido nativo, además de promover la proliferación y diferenciación celular en la reparación y regeneración de tejidos **(Guan et al., 2020).** En la IT se han estudiado y probado una amplia variedad de GF como son los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), factores de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y familias del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) **(Z. Wang et al., 2017).**

Dentro de la ITO los principales reguladores de la regeneración ósea incluyen el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor de crecimiento transformante β1 (TGF-β1) y las proteínas morfogénicas óseas (BMP) **(Perez et al., 2018).** Estas últimas han sido reconocidas como la familia de factores más eficientes en el tratamiento de regeneración ósea, las BMP-2 aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) son consideradas como un excelente inductor de la diferenciación de células mesenquimales en células osteoblásticas, responsables de la formación de nuevo tejido óseo **(Oliveira et al., 2021**).

1.1.3.3. Andamios

Los andamios biológicos (AB) son estructuras porosas tridimensionales que proporciona soporte e imitan el microambiente apropiado de la ECM, creando un entorno favorable al suministrar nutrientes y factores de crecimiento permitiendo la propagación, proliferación y diferenciación celular **(Abbasi et al., 2020).** Los andamios deben poseer propiedades físicas, biológicas, químicas y mecánicas apropiadas, de forma general deben ser biocompatibles, biodegradables y no tóxicos que permitan el trasporte de nutrientes, fluidos corporales, trasferencia de señales bioquímicas, que modulen el comportamiento celular **(Ansari, 2019).** Estas estructuras deben ser diseñadas y elaboradas de forma que repliquen con precisión *in vitro* la arquitectura del tejido natura similar a lo que ocurre *in vivo* **(Z. Wang et al., 2017).** Por tanto, la elección del material dependerá de las condiciones fisiológicas y fisiopatológicas del modelo de tejido que se busca imitar **(Moysidou et al., 2021).**

En ITO se requiere de la fabricación de estructuras complejas ideales y dinámicas que además se deben considerar las propiedades bioactivas y mecánica óptimas como la porosidad, rigidez, topología, etc., que permitan estimular la proliferación celular y la diferenciación osteogénica **(Lee et al., 2022).**

1.1.4.Biomateriales para la elaboración de andamios biológicos

Los biomateriales son componentes que interactúan con los sistemas biológicos, deben cumplir con las características generales de los andamios, así como con las características específicas del sitio nativo que se busca replicar o reparara **(Krishani et al., 2023).** Actualmente existe una amplia gama de materiales para la fabricación de andamios que se pueden adaptar a requisitos específicos **(Moysidou et al., 2021).** Según su composición los andamios biológicos pueden fabricarse como cerámicas, metales, vidrio, hidrogeles y biopolímeros **(Nikolova & Chavali, 2019).**

1.1.4.1. Biopolímeros

Los biopolímeros son materiales versátiles y prometedores en la elaboración de andamios biológicos, permiten tener un control en las características morfológica, mecánicas, biocompatibles y

biodegradables, importante para proporcionar un entorno de soporte tridimensional en el crecimiento celular y la regeneración de tejidos **(Perez-Puyana et al., 2020).**

1.1.4.1.1. Biopolímeros naturales

Los biopolímeros naturales son macromoléculas provenientes de fuentes naturales como animales, plantas, algas u otros microorganismos, según su estructura se pueden clasificar como proteínas y polisacáridos, son usados ampliamente en ingeniería de tejidos debido a sus excelentes propiedades biomiméticas, bioactivas y remodelación natural **(Adel et al., 2022).** Sus principales ventajas se centran en la biocompatibilidad, biodegradabilidad y la semejanza estructural, sin embargo, pueden presentar problemas de contaminación bacteriana, escaza resistencia mecánica y reacciones inmunogénicas **(Reddy et al., 2021).** Los biopolímeros naturales preferidos en ITO son proteínas como el colágeno, gelatina y fibroína de seda, y polisacáridos como el quitosano, celulosa, alginato y ácido hialurónico, gracias a su gran similitud con la ECM, mayor biocompatibilidad, excelente biodegradabilidad y no toxicidad **(L. Guo et al., 2021).**

El quitosano es un polisacárido natural derivado de la desacetilación de la quitina **(Figura 2)**, proveniente de los exoesqueletos de crustáceos y paredes de hongos **(Ressler, 2022).** Químicamente es un polímero lineal compuesto por unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina, unidas por enlaces glicosídicos β(1-4). El grado de desacetilación hace referencia a las diferentes formas del quitosano, donde si la cantidad de N-acetil-D-glucosamina es >50 % se considera como quitina, mientras que la cantidad de D-glucosamina es >50 % se considera como quitosano, presentando un rango de desacetilación de 50-95%, y un peso molecular que oscila entre 300 y 1000 kD **(Gholap et al., 2024).** La solubilidad del quitosano puede depender del grado de desacetilación y el peso molecular, cuanto menor es la de desacetilación el peso molecular es mayor, proporcionando mayor estabilidad química y resistencia mecánica, generalmente el quitosano es soluble en disolventes con pH por debajo de 6, como el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido láctico, siendo el ácido acético el más utilizado, y es insoluble en soluciones neutras o básicas **(Ressler, 2022).**

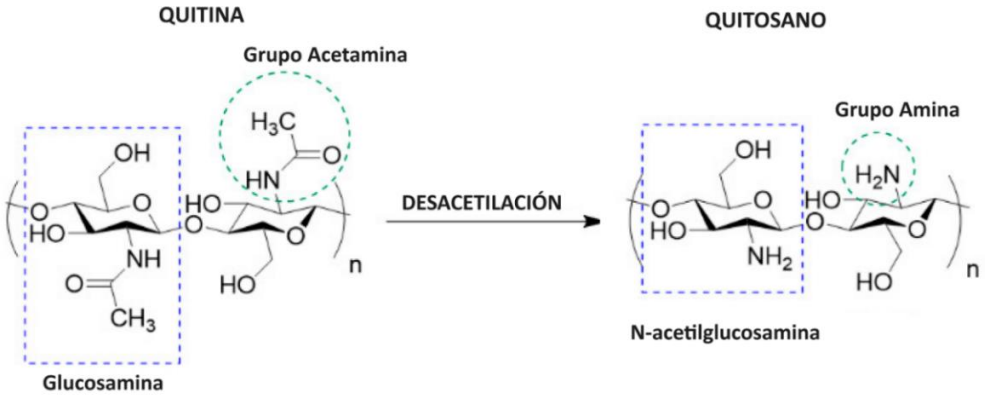


Figura 2. *Desacetiliación de la quitina en la producción de quitosano*

Nota: Adaptado de: Biomateriales a base de quitosano para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo **(Ressler, 2022).**

El quitosano por su naturaleza catiónica presenta propiedades biocompatibles, biodegradables y actividad antimicrobiana **(Gholap et al., 2024).** La alta biocompatibilidad del quitosano se debe a la gran similitud del polímero con los glucosaminoglicanos presentes en la matriz celular de los tejidos y se puede relacionar con el grado de desacetilación, al tener un valor alto la carga positiva del quitosano aumenta lo que promueve la interacción con varias moléculas y membranas celulares cargadas negativamente **(Fourie et al., 2022).** La degradación del quitosano se puede dar de forma química o enzimática, *in vivo* el quitosano es degradado por varias proteasas principalmente lisozima, que conduce a la formación de oligosacáridos no tóxicos que se pueden incorporar a las vías metabólicas o excretarse. La tasa de degradación está relacionada con el grado de desacetilación, a un grado alto la degradación será más lenta, y a un grado bajo la degradación será más rápida **(Croisier & Jérôme, 2013).** Las propiedades antimicrobianas características del quitosano se deben principalmente a sus cargas catiónicas, que mediante mecanismos de acción del quitosano se inhibe el crecimiento bacteriano, el mecanismo más común es la unión del quitosano a la pared celular de carga negativa ocasionando la rotura de la membrana celular, seguido de la unión al ADN inhibiendo la replicación, seguidamente de la muerte celular **(Ressler, 2022).** El quitosano también posee propiedades hemostáticas implicadas en la cicatrización de heridas además de promover la infiltración y migración de macrófagos y neutrófilos **(Fourie et al., 2022).**

El quitosano presenta gran cantidad de características osteoconductoras favorables por lo que es altamente considerado en ITO, sin embargo, presenta limitaciones respecto a sus características

mecánicas por lo que es posible combinar con otros polímeros que permita mejorar sus propiedades **(Croisier & Jérôme, 2013).**

1.1.4.1.2. Biopolímeros sintéticos

Los biopolímeros sintéticos son polímeros artificiales fabricados a partir de monómeros derivados del petróleo **(Ramirez et al., 2018).** Presentan estructuras y propiedades personalizadas, predecibles y reproducibles, incluida una alta pureza, buenas propiedades físicas, mecánicas y tasa de degradación, de fácil procesamiento y modificación en su composición química, cristalinidad y peso molecular con el fin de lograr características específicas **(Donnaloja et al., 2020).** Los polímeros comúnmente utilizados en ITO son la policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA), Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), ácido poliglicólico (PGA) y polietilenglicol (PGE) **(Abdelaziz et al., 2023).** De forma general los polímeros sintéticos presentan propiedades bioactivas reducidas debido a su superficie hidrofóbica **(Asti & Gioglio, 2014).** Por tanto, es favorable combinar con otros materiales como los polímeros sintéticos.

La policaprolactona (PCL) es un poliéster alifático, se sintetiza mediante la polimerización de apertura de anillo del monómero cíclico ε-caprolactona en presencia de iniciadores o catalizadores, o por policondensación **(Figura 3) (Siddiqui et al., 2018).** Tiene un punto de fusión entre 59 y 64°C, un peso molecular que varía de 3000 a 80.000 g/ml y una temperatura de transición vítrea de -60°C que caracteriza a su estructura semicristalina, alcanzando un estado gomoso y una alta tenacidad **(Dwivedi et al., 2020).** La PCL es soluble en disolventes orgánicos como el cloroformo, diclorometano, dimetilformamida (DMF), benceno y tolueno **(Siddiqui et al., 2018).** El ácido acético también es considerado un disolvente "verde" gracias a sus características de baja toxicidad y capacidad para interactuar con los grupos funcionales presentes en el polímero **(Gholipour Kanani & Bahrami, 2011).**



Figura 3. *Síntesis de la Policaprolactona (PCL)*

Nota: Adaptado de: Avances recientes en policaprolactona para la administración de fármacos contra el cáncer **(Bhadran et al., 2023).**

La PCL en condiciones biológicas, se puede degradar hidrolítica o enzimáticamente y dependerá del peso molecular, cristalinidad, pH y temperatura. **(Dwivedi et al., 2020).** La degradación con enzimas se produce en los extremos de la cadena de la PCL por medio de la ruptura de los enlaces éster en monómeros u oligómeros, las enzimas más utilizadas son las lipasas **(Obisesan et al., 2023).** La degradación hidrolítica se da por la presencia de enlaces éster, la absorción de moléculas de agua corta estos enlaces lo que conduce a la ruptura de las cadenas poliméricas resultando en la formación de oligómeros y monómeros como el ácido carboxílico (caproico), además, debido a la naturaleza hidrófoba del PCL por la presencia de cinco restos -CH_2 como unidades repetidas, la tasa de absorción del agua es limitada, por lo que la degradación hidrolítica tarda de 2 a 3 años en completarse a diferencia de la degradación enzimática que se da en menor tiempo **(Obisesan et al., 2023; Woodruff & Hutmacher, 2010).** Además, la PCL exhibe excelentes propiedades mecánicas y biocompatibilidad adecuada para tejido duros y blandos, sin embargo, su principal inconveniente es que presenta bioactividad reducida como la ausencia de sitios de reconocimiento que minimizan la afinidad y adhesión celular, hidrofobicidad alta que impide la penetración de las células en la estructura, por lo que es posible combinar con otros biopolímeros incluido el quitosano como una estrategia que permita superar estas limitaciones y mejorar sus características **(Suamte et al., 2023).**

Es uno de los polímeros utilizados ampliamente en varias aplicaciones biomédicas como administración de fármacos e ingeniería de tejidos, en ITO es preferido debido a sus características no toxicas, mecánicas, tiempo de degradación y biocompatibilidad con gran variedad de tejidos **(Dwivedi et al., 2020).**

1.1.5.Fabricación de andamios biológicos

La fabricación de andamios depende de las propiedades y características que se busca replicar. Actualmente existen técnicas convencionales y avanzadas que buscan producir estructuras tridimensionales **(Collins et al., 2021).** Para andamios porosos dirigidos a ITO se han empleado métodos como la liofilización, espuma de gas, impresión 3D, fundición con solventes lixiviación de partículas, para andamios fibrosos se ha utilizado métodos como el electrohilado **(Dwivedi et al., 2020).**

1.1.5.1. Métodos convencionales

Entre los enfoques convencionales para la elaboración de andamios biológicos se incluyen la liofilización, espuma de gas, electrohilado, fundición con solvente y lixiviación de partículas **(Kumar & Jacob, 2022).** La liofilización consiste en congelar la solución polimérica a una temperatura muy baja solidificando el agua en forma de hielo, seguida de la sublimación a través de un vacío y finalmente el secado de la muestra aplicando ligera elevación de la temperatura, resultado en una estructura seca con tamaño de poro de 20 y 200 μm con aproximadamente un 90% de porosidad **(Collins et al., 2021).** La espuma de gas comienza comprimiendo polímeros biodegradables sumergidos en agua usando un gas inerte como el dióxido de carbono o el nitrógeno hasta este completamente saturado con burbujas de gas, creando estructuras esponjosas con un tamaño de poro promedio de 30 a 700 μm y una porosidad de alrededor del 85%.**(Abdelaziz et al., 2023).** El electrohilado implica una solución polimérica cargada en una jeringa que bajo la acción de voltajes se extraen fibras a escala nanométrica **(Collins et al., 2021).**

Lixiviación de porógenos

En ITO la porosidad es un factor clave en el diseño de estructuras, una porosidad adecuada permitirá el crecimiento correcto del tejido y la difusión de nutrientes, esta técnica permite producir andamios con un grado de porosidad elevado y controlado **(Adel et al., 2022).** Consiste en preparar una solución polimérica con un disolvente adecuado junto con porógenos, se deja evaporar el disolvente y posteriormente el porógeno se lixivian en agua destilada dejando la matriz polimérica altamente porosa e interconectada **(Abdelaziz et al., 2023).** Los porógenos utilizados son partículas solubles como el NaCl, $NaHCO_3$, hielo, parafina o microesferas de gelatina que se pueden adaptar en diferentes tamaños

y concentraciones. Generalmente se combinan con la fundición de solventes para obtener una estructura tridimensional con poros interconectados **(Dwivedi et al., 2020).**

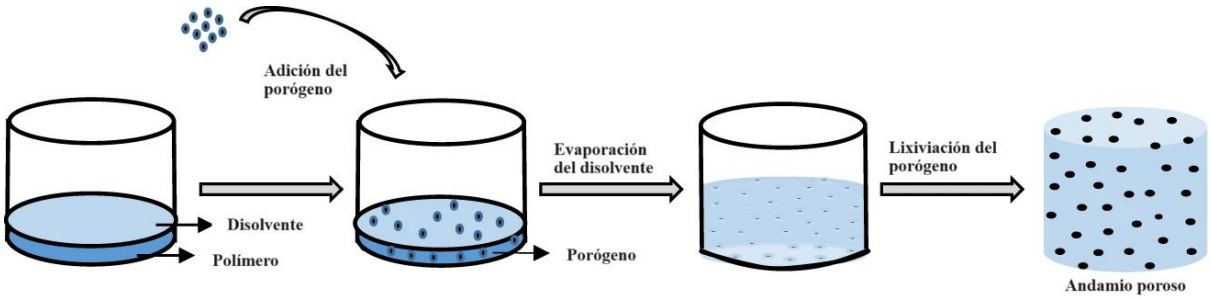


Figura 4. *Elaboración de andamios por lixiviación de porógenos*

Nota: Proceso de fabricación de andamios porosos mediante la técnica de lixiviación de porógenos. Adaptado de: Técnicas de fabricación involucradas en el desarrollo de soportes compuestos para aplicaciones de ingeniería de tejido óseo **(Murugan & Parcha, 2021).**

Microesferas de gelatina

La gelatina por sus excelentes propiedades, biocompatibles, biodegradables, baja inmunogenicidad y facilidad de manipulación se ha considerado como un potencial material biomédico **(Dong et al., 2021).** Hasta la actualidad se han usado en forma de nanopartículas, agente de recubrimiento, porógenos o en mezclas poliméricas **(Su & Wang, 2015).** Como microesferas en la administración de fármacos actúan como vehículos de entrega y liberación controlada que encapsulan el medicamento sea proteínas, ácidos nucleicos e incluso células **(Dong et al., 2021).** En ingeniería de tejidos actúan como porógeno en la elaboración de andamios, además de ser un agente de modificación de la superficie mejorando significativamente la adhesión y proliferación celular **(Tang et al., 2012).**

1.1.5.2. Métodos avanzados

Los métodos avanzados se basan en la creación de prototipos mediante programas de diseño asistido por computadora y extrucción **(Kumar & Jacob, 2022).** Entre las estrategias que permiten imitar la estructura del tejido óseo se encuentran la impresión 3D, la sinterización selectiva por láser (SLS), la electroescritura por fusión (MEW). La impresión 3D permite crear estructuras multicapa al distribuir

sustancias de carga como matrices, biomoléculas y células con propiedades controlables **(Song et al., 2023).** La tecnología SLS utiliza rayos láser que fusionan y unen partículas en polvo para obtener una estructura porosa multicapa tridimensional y multifuncional **(Adel et al., 2022).** La electroescritura por fusión (MEW) combina el electrohilado en solución y la impresión 3D para ensamblar con precisión fibras de pequeño diámetro **(Song et al., 2023).**

1.1.6.Propiedades y características de andamios biológicos

1.1.6.1. Propiedades morfológicas y mecánicas

En ITO es necesario considerar las propiedades morfológicas y mecánicas que garanticen una regeneración tisular efectiva **(Lee et al., 2022).** El tamaño de los poros asi como la porosidad son parámetros que determinan el grado de infiltración alcanzable y su resistencia mecánica, el tamaño de los poros presenta una relación inversamente proporcional a la resistencia a la comprensión y tracción de estas estructuras, por tanto, es sumamente importante la elección adecuada del tamaño de los poros **(Krishani et al., 2023).** Además, son factores clave en la migración y proliferación celular, la difusión de nutrientes, oxígeno y productos metabólicos, esencial en la viabilidad celular y vascularización **(Lutzweiler et al., 2020).** Los andamios porosos permiten una fijación celular más estable y mejor osteointegración con el hueso huésped, el tamaño mínimo de poro comúnmente utilizados en ITO es de 100 μm y el tamaño máximo es de 900 μm, el rango ideal se encuentran de 250 a 500 μm **(Koushik et al., 2023).** Un tamaño de poro de 100 μm permite la difusión de nutrientes| y la migración celular (infiltración de osteoblastos), con un rango de 200 a 400 se mejora la vascularización, se logra la interacción célula-célula, la migración y proliferación celular, y un tamaño mayor a 500 además de la interacción célula-célula permite la adhesión celular **(Lee et al., 2022).** El porcentaje de porosidad adecuado oscila entre el 50 y 90% dependiendo del rendimiento mecánico que se requiera, una porosidad mayor de a 65% permite una mayor infiltración de ECM, sin embargo, reducen la capacidad estructural del andamio **(Koushik et al., 2023).**

La arquitectura de los andamios tanto el tamaño, la geometría de poro como el porcentaje de porosidad influyen en las características mecánicas, la rigidez y la permeabilidad **(Koushik et al., 2023).** Es importante que el andamio pueda soportar fuerzas múltiples como la comprensión, elasticidad, tensión, resistencia, rigidez, etc., parámetros que influyen en la adhesión focal celular y la diferenciación osteogénica, permitiendo que se generen señales basadas en la fuerza **(Lee et al., 2022).**

1.1.6.2. Propiedades biológicas

Un andamio ideal para ITO debe presentar propiedades biológicas como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad y no toxicidad **(Abdelaziz et al., 2023).** La biocompatibilidad determina la capacidad que tiene el andamio de lograr una respuesta en el cuerpo vivo, el material del andamio permitirá que las células puedan adherirse a la superficie, proliferar y formar EMC sin desencadenar respuesta del cuerpo extraño cuando se implanta. Los andamios biocompatibles permiten la comunicación entre células, la proliferación y diferenciación sin causar ningún efecto citotóxico y respuestas inmunes mínimas, **(Deb et al., 2018).**

La biodegradabilidad es la capacidad que tiene el andamio para ser degradado ya sea por acción enzimática o por hidrólisis **(Abdelaziz et al., 2023).** La biodegradabilidad es una propiedad clave en BTE, la tasa de degradación debe ser ajustable de forma que las células crezcan con el tiempo y reemplacen el andamio o la construcción sin interferir con otros tejidos u órganos y sin productos de degradación tóxicos **(Krishani et al., 2023).**

La bioactividad se define como la capacidad para interactuar favorablemente con el entorno biológico **(Collins et al., 2021).** En BTE un andamio es considerado bioactivo cuando exhibe cierto grado de osteoconductividad, es decir que tenga la capacidad de sintetizar nuevo tejido óseo tanto en la superficie como en los poros, que además estimulen la vascularización facilitando el intercambio de nutrientes, desechos y oxígeno, además poseen un grado de osteoinductividad, es decir que tenga la capacidad de para atraer células progenitoras que promuevan su diferenciación en células osteogénicas mediante señalizaciones biomoleculares **(Abdelaziz et al., 2023).**

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Elaborar andamios biológicos mediante lixiviación de microesferas para aplicaciones biomédicas.

1.2.2. Objetivo Específicos

- Fabricar andamios biológicos con biopolímeros por el método de lixiviación de microesferas.

- Caracterizar los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y mecánicas.

- Evaluar los andamios fabricados mediante pruebas biológicas *in vitro*.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Los recursos empleados en la ejecución del presente trabajo de investigación (reactivos, material fungible y equipos de laboratorio), se enlistan a continuación:

2.1.1.Reactivos

- Ácido acético glacial (CH_3COOH)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de potasio (KCl)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO3)
- Fosfato dipotásico (K2HPO4 3H2O)
- Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl2 6H2O)
- Ácido clorhídrico (HCl) 1.0M
- Cloruro de calcio (CaCl2)
- Tris(hidroximetil)aminometano
- Alcohol deshidratado
- Aceite Mineral
- Etanol 96%
- Gelatina
- Quitosano
- Policaprolactona (PCL)
- Pastillas de PBS
- Span 80
- Agua destilada
- Agua desionizada

2.1.2.Material fungible

- Vasos de precipitación, 50, 100, 250, 1000 mL
- Placas Petri de plástico
- Pipeta Pasteur
- Placas de 24 Pocillos
- Probeta 10, 50 mL
- Tubos Falcon
- Magnetos
- Bisturí
- Jeringas
- Paquete de guantes quirúrgicos
- Micropipetas de 20-200 µL, 1000 -5000 µL
- Frascos de vidrio de tapa azul de 500 mL
- Papel aluminio
- Papel filtro

2.1.3.Equipos de laboratorio

- Balanza Analítica (Precisa, XB220A)
- Plancha de calentamiento (IKA, C-MAG HS7)
- Incubadora (Memmert, IN30)
- Campana Extractora de gases (NOVATECH)
- pH metro (Mettler Toledo, Seven Compact)
- Autoclave (HIRAYA MA, HV-110)
- Centrífuga (HETTICH, ROTINA 380)
- Refrigerador
- Desecador
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) (VEGA3 TESCAN)
- Máquina universal de ensayo (Shimadzu, AGS-50kNX)
- Durómetro Shore D (TYP-100D)

2.2. Métodos

2.2.1. Fabricación andamios biológicos con biopolímeros por el método de lixiviación de microesferas

2.2.1.1. Preparación de las microesferas de gelatina

Se prepararon microesferas de gelatina mediante le método de emulsión agua en aceite (W/O). Brevemente se preparó una solución de gelatina al 20%, se añadió en aceite mineral bajo agitación magnética. La emulsión se enfrió en un baño de hielo y se lavó con una solución de etanol para deshidratar las microesferas producidas y eliminar la fase oleosa **(Anexo 1).** Se secaron y se almacenaron a temperatura ambiente para posteriormente ser usadas como porógenos **(Chen et al., 2017).**

2.2.1.2. Preparación de las soluciones poliméricas

Para la preparación de las soluciones poliméricas se utilizó quitosano de la marca Chemsavers con 90% de desacetilación y policaprolactona (PCL) de la marca Sigma-Aldrich. Se disolvió la PCL a una concentración del 10 % en ácido acético bajo agitación magnética hasta que esté bien disuelta y alcance una coloración transparente, seguidamente se añadió quitosano a una concentración del 2 % en agitación hasta obtener una mezcla completamente homogénea **(Anexo 2) (Ehterami et al., 2018; Sun et al., 2009).**

2.2.1.3. Fabricación de los andamios por lixiviación de microesferas

Se añadió las microesferas de gelatina a la solución polimérica en concentraciones de 25%, 50% y 75%, se mezclaron hasta que queden bien distribuidas, se vertió en moldes, se evaporo el disolvente de las muestras. Para lixiviar las microesferas de gelatina se sumergieron las muestras en agua destilada, se secaron a temperatura ambiente y se colocaron en un desecador hasta su posterior caracterización

(Anexo 3). (Kiran et al., 2015; Zhao et al., 2020). Se obtuvieron tres andamios porosos diferentes que fueron analizados, morfológica, mecánica y biológicamente.

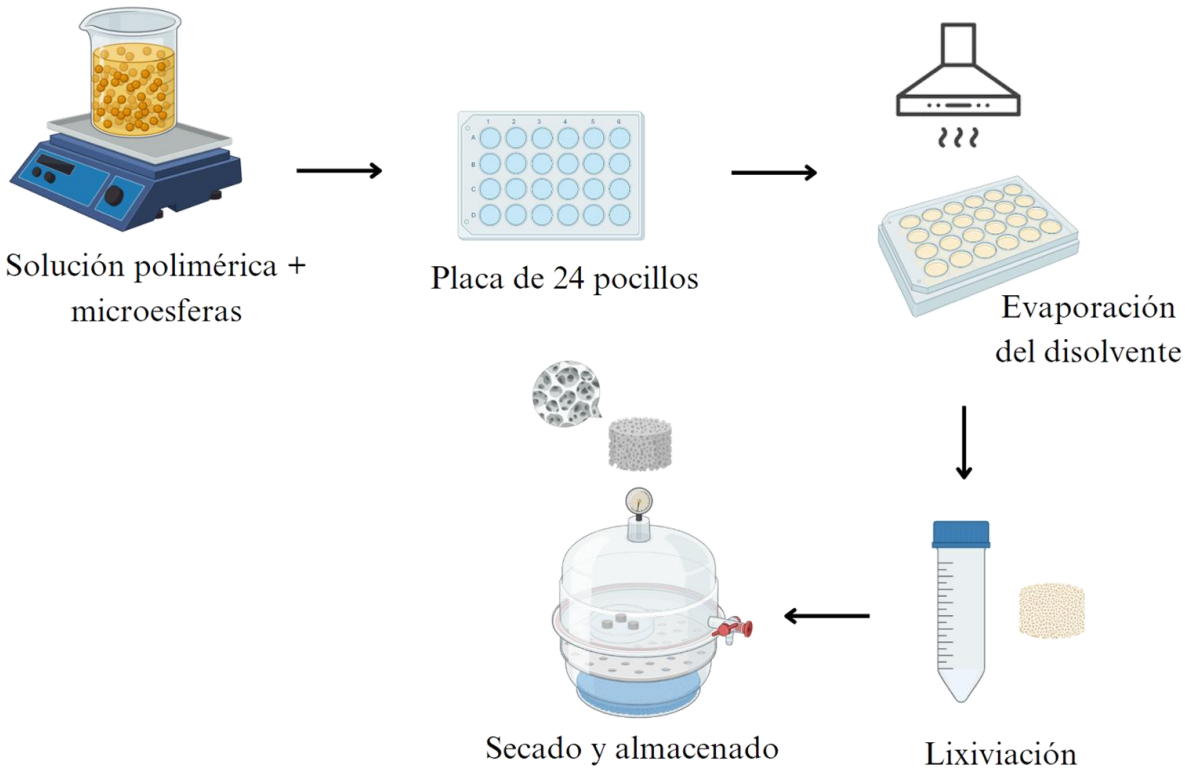


Figura 5. *Proceso de elaboración de andamios biológicos de quitosano y policaprolactona por lixiviación de microesferas de gelatina*

2.2.2.Caracterización los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y mecánicas

2.2.2.1. Evaluación morfológica

El análisis morfológico se realizó mediante microscopia electrónica de barrido (SEM). Se tomaron pequeños trozos del andamio, se colocaron en la platina de muestras y se analizó el corte y la superficie **(Anexo 4A).** Las morfología y diámetro de los poros se obtuvieron mediante imágenes SEM en una escala de 500 um **(Poddar et al., 2021).**

2.2.2.2. Evaluación de la porosidad

La porosidad se determinó mediante el método de desplazamiento del líquido, se midió el peso inicial del andamio (Wi), seguidamente se sumergieron en 1mL de alcohol deshidratado durante un periodo de 48 horas, transcurrido este tiempo se volvieron a pesar las muestras (Wf) **(Anexo 4B).** Se calculó la porosidad en base a la siguiente ecuación **(Yazdanian et al., 2023).**

$$\boldsymbol{Porosidad}(\%) = \frac{(Wf\ -\ Wi)\ \rho_b}{(Wf\ *\ \rho_b) + (\rho_a - \rho_b)W_0}\ *\ 100 \qquad (1)$$

Donde:

ρ_b: Densidad del alcohol deshidratado

ρ_b: Densidad de los biopolímeros

2.2.2.3. Evaluación de la tasa de trasmisión de vapor de agua (WVTR)

La tasa transmisión de vapor de agua (WVTR), se evaluó en referencia a la metodología mencionada por **(Bahadoran et al., 2020).** En el cual las muestras se colocaron en la abertura de recipientes de tubos de hemolisis con un diámetro igual a 13 mm, contenidos de 10 mL de agua destilada, se registraron los pesos iniciales (Wi), posteriormente los recipientes se colocaron en una incubadora a 37°C durante 24h, se volvió a registrar la pérdida de peso (Wf) **(Anexo 4C)**. La tasa de transmisión de vapor de agua se calculó con la siguiente ecuación **(Bahadoran et al., 2020).**

$$\boldsymbol{WVTR} = \frac{(Wi - Wf)}{A * 24}\ g/m^2h \qquad (2)$$

Donde:

A: área de la abertura del tubo de hemolisis

2.2.2.4. Evaluación mecánica

Se evaluó la resistencia a la tracción de acuerdo con la norma ASTM D638, se cortaron muestras del andamio en probetas y se conectaron a la máquina universal de ensayo **(Anexo 5A)**, con una velocidad de extensión de 1 mm/min y una longitud de calibre de 100 mm, se registró la resistencia a la tracción, la deformación y el módulo de elasticidad **(Bombaldi de Souza & Moraes, 2022).** La dureza shore se evaluó utilizando un durómetro clásico **(Anexo 5B) (Di Maro et al., 2024).**

2.2.3.Evaluación de los andamios fabricados mediante pruebas biológicas *in vitro*

2.2.3.1. Evaluación de la capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción del agua se determinó por medio del grado de hinchamiento. Se colocó una muestra del material del andamio seco de peso conocido (Wi) en 2mL de solución PBS durante un tiempo de 6h a temperatura ambiente, se registró el peso húmedo (Wf) en intervalos de 30 minutos **(Anexo 6).** La cantidad de agua retenida se calculó mediante la siguiente ecuación **(Bahadoran et al., 2020).**

$$\boldsymbol{Capacidad\ de\ absorción}(\%) = \frac{(Wf - Wi)}{Wi} * 100 \qquad (3)$$

2.2.3.2. Evaluación de la biodegradabilidad

La biodegradabilidad se determinó mediante la inmersión de las muestras de andamios en plasma sanguíneo y fluido corporal simulado (SBF) con concentraciones de iones similares al plasma sanguíneo **(Anexo 7)**. El SBF se preparó siguiendo la metodología de **Kokubo & Takadama (2006),** para lo cual en 70 ml de agua destilada a 36.5°C ± 0.1 en agitación magnética se disolvió NaCl (0.8035 g), $NaHCO_3$ (0.0355 g), KCl (0.0225 g), $K_2HPO_4\ _3H_2O$ (0.0231 g), $MgCl_2\ _6H_2O$ (0.0311 g), HCl 1.0M (3.9ml), $CaCl_2$ (0.0072 g) en el respectivo orden dejando disolver completamente cada uno antes de agregar el siguiente, se añadió agua hasta un total de 90 mL, hasta el momento el pH de la solución es 2.0 ± 1.0, se ajustó el pH a 7.4 con Tris (0.6118) g y HCl 1.0 M (0–0.5 mL) y finalmente se aforó a 100 mL.

Se sumergieron los andamios previamente pesados (Wi) en plasma sanguíneo y solución SBF, se incubaron a una temperatura de 37°C durante un periodo de 6, 12, 16, 22 y 29 días, en cada intervalo de tiempo se pesaron las muestras (Wf), se lavaron con etanol y se remplazaron las soluciones. La biodegradabilidad se calculó mediante la siguiente ecuación **(Melnik et al., 2019; Pipattanawarothai et al., 2017).**

$$\boldsymbol{Tasa\ de\ degradación}\ (\%) = \frac{(Wi\ -\ Wf)}{Wi} * 100 \qquad (4)$$

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Fabricación de andamios biológicos con biopolímeros por el método de lixiviación de microesferas

3.1.1.1. Preparación de las microesferas de gelatina

Se prepararon microesferas de gelatina por el método de emulsión agua en aceite (W/O) **(Anexo 1)**. En la **Figura 6,** se presentan micrográficas SEM correspondientes a las microesferas de gelatina obtenidas, presentaron un tamaño de partícula uniforme, morfología esférica y superficie lisa, y un rango de diámetro de 100-600 µm **(Figura 6A)**, también se obtuvieron microesferas con tamaños <100 µm **(Figura 6B)**. Los diámetros de las microesferas determinan la distribución del tamaño y la interconectividad de los poros del andamio. La velocidad de agitación, la concentración del tensioactivo y el disolvente de extracción controlan el tamaño, morfología y superficie de las microesferas **(Peng et al., 2012).**

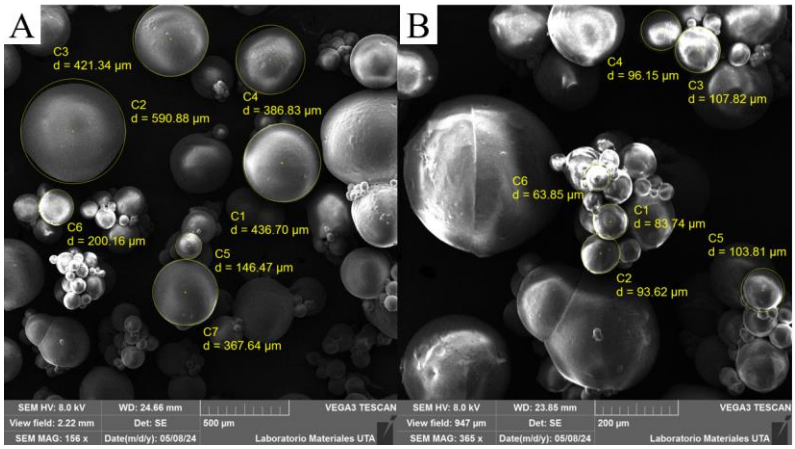


Figura 6. *Micrografías SEM de microesferas de gelatina*

Nota: Se observan microesferas de gelatina ligeramente dispersas de superficie lisa con un rango de diámetro entre 100 y 600 µm (A), microesferas de diámetro <100 µm (B).

Las microesferas de gelatina son utilizadas convenientemente como porógenos en la preparación de andamios biológicos, además de que permiten crear estructuras porosas interconectadas, actúan como agentes modificadores de la superficie mejorando la biocompatibilidad de la estructura con el entorno celular **(Tang et al., 2012).**

3.1.1.2. Fabricación de andamios biológicos por lixiviación de microesferas

Se fabricaron andamios porosos compuestos de PCL/Quitosano por el método de lixiviación de porógenos, se utilizaron microesferas de gelatina en diferentes concentraciones con un rango de tamaño de 100-600 µm con el fin de evaluar la incidencia de la porosidad en las propiedades del andamio. Las concentraciones de las soluciones poliméricas de PCL, quitosano y microesferas de gelatina preparadas **(Anexo 2)** se especifican en la **Tabla 1**, y se utilizó ácido acético al 80% como disolvente. La PCL y el quitosano son polímeros de composición química diferentes, considerándose al ácido acético como un solvente adecuado para ambos polímeros obteniendo mezclas completamente homogéneas, además de que presentan baja toxicidad en comparación con disolvente orgánicos usados comúnmente para la PCL **(Wan et al., 2009).** El quitosano como biopolímero natural con excelentes características biológicas, y la PCL por sus propiedades mecánicas han sido utilizados en varias investigaciones de regeneración del tejido óseo. La adición de quitosano en andamios de PCL como revestimiento de superficies y como mezcla mejora significativamente las propiedades biológicas y físicas, atribuyéndose además al quitosano como un excelente portador de factores de crecimiento (**Cui et al., 2017).**

Tabla 1

Composición de las soluciones poliméricas

ABs	Concentración de PCL	Concentración de Quitosano	Concentración de microesferas de gelatina
1	25%	2.5%	25%
2	25%	2.5%	50%
3	25%	2.5%	75%

Nota: La concentración de microesferas corresponde al peso total de PCL y quitosano

Cada una de las mezclas poliméricas se vertieron en placas de 24 pocillos **(Anexo 3),** se evaporó el disolvente y se lixiviaron las microesferas en agua destilada teniendo como resultado los andamios

mostrados en la **Figura 7,** con un espesor de 4 mm y un área de 428.83 mm^2**.** El proceso de lixiviación depende de las propiedades del porógeno teniendo en consideración el tiempo, la temperatura y el disolvente adecuado que permita su eliminación total del armazón, un tiempo de lixiviación más corto podría disminuir significativamente el grado de degradación del andamio en el proceso de lixiviación lo que influye en sus propiedades mecánicas y comportamiento celular **(Liang et al., 2018).** El agua destilada es un disolvente adecuado para lixiviar microesferas de gelatina además de que no afectan ni modifican las propiedades poliméricas del andamio, el tiempo óptimo para lixiviar este porógeno varia de 12 a 48 horas **(L. Wang et al., 2015),** en comparación con otros porógenos comúnmente usados como las partículas de sal que han presentado un tiempo de lixiviación de hasta 72 horas **(Ruiz et al., 2021),** o microesferas de parafina con un tiempo de lixiviación de 48 horas a 37°C utilizando hexano como disolvente **(Poddar et al., 2021).** En el estudio de **Tang et al. (2012)** se utilizaron plantillas de microesferas de gelatina como porógeno en la fabricación de andamios de poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para la regeneración osteocondral, después de las 12 horas de lixiviación en agua destilada caliente evidenciaron que aún existían moléculas de gelatina atrapadas en la matriz PLGA, sin embargo, esto favoreció la proliferación y migración de osteoblastos, evitando efectos adversos en las células. La gelatina, biopolímero natural formado del rompimiento de la triple hélice del colágeno presenta excelentes propiedades biocompatibles biodegradables y no antigenicidad **(Dong et al., 2022),** poniendo en evidencia las ventajas de utilizar microesferas de gelatina como porógenos en la fabricación de andamios porosos para tejido óseo. En la **Tabla 2,** se muestra que el peso de los ABs después del proceso de lixiviación disminuyó considerablemente, lo cual evidencia la eliminación de las microesferas de gelatina de la matriz polimérica.

Tabla 2

Pesos de los andamios antes y después de lixiviar

Tipo de AB	Peso antes de lixiviar (g)	Peso después de lixiviar (g)	Peso perdido (g)
Q/PCL – 25% de Microesferas	0.3173	0.2621	0.0552
Q/PCL – 50% de Microesferas	0.3774	0.2586	0.1188
Q/PCL – 75% de Microesferas	0.5291	0.2397	0.2894

Los resultados obtenidos muestran que los ABs antes del proceso de lixiviación presentaron una coloración amarillenta por la presencia de microesferas de gelatina, una menor concentración denotó una coloración ligera, mientras que a una mayor concentración la coloración era más intensa **(Figura**

7A, B, C), posterior al proceso de lixiviación los ABs con las tres concentraciones distintas de microesferas de gelatina presentaron una coloración blanquecina **(Figura 7D, E, F),** esto debido a la ausencia de las microesferas en la estructura. Sin embargo, la textura y rigidez era diferentes, los ABs 25% Microesferas mantenían una forma circular simétrica, con textura lisa y una estructura más rígida y dura, los ABs 50% Microesferas presentaron una forma menos simétrica de estructura rígida, y textura ligeramente rugosa, mientras que los ABs 75% Microesferas mostraron una forma circular asimétrica de estructura blanda y textura rugosa. En la **Tabla 2,** se muestra que el peso de los ABs después del proceso de lixiviación disminuyó considerablemente, lo cual evidencia la eliminación de las microesferas de gelatina de la matriz polimérica.



Figura 7. *ABs obtenidos por lixiviación de microesferas de gelatina*

Nota: Andamios biológicos de quitosano y policaprolactona obtenidos por lixiviación con microesferas de gelatina de 4 mm de espesor y 428.83 mm^2 de área, (A, B, C) ABs antes del proceso de lixiviación, (D, E, F) ABs después del proceso de lixiviación, (A y D) ABs 25% Microesferas, (B y E) ABs 50% Microesferas, (C y F) 75% Microesferas.

Es aspecto superficial de los andamios también influye en el comportamiento celular. Una estructura más rugosa mejora la unión, proliferación y diferenciación de las células formadoras del tejido óseo, además de regular la capacidad de los osteoblastos en la síntesis y secreción de factores que favorecen la osteogénesis **(Bombaldi de Souza & Moraes, 2022).** En el estudio de **Kim & Kim (2015)** se sembraron células madre mesenquimales humanas (hMSC) en andamios de PCL con una rugosidad alta, los resultados mostraron que la superficie con mayor rugosidad condujo una viabilidad celular y

capacidad osteogénica superior en comparación con el crecimiento de células cultivada en control de placa de cultivo.

En la **Figura 8** como pruebas preliminares se observan micrografía SEM correspondiente a los ABs 30 minutos después del proceso de lixiviación **(Anexo 3C)**, la **Figura 8A** correspondiente a los ABs 25% Microesferas muestra una estructura con porosidad mínima, en la **Figura 8B** de los ABs 50% Microesferas aún se pueden apreciar microesferas presentes en la estructura, la **Figura 8C** de los ABs 75% Microesferas muestran una estructura compacta con microesferas presentes, sin embargo pasado las 24 horas de lixiviación se evidenció que el ABs Q/PCL-75% Microesferas presentaron una estructura muy frágil con incidencia a la degradación en el proceso de lixiviación.

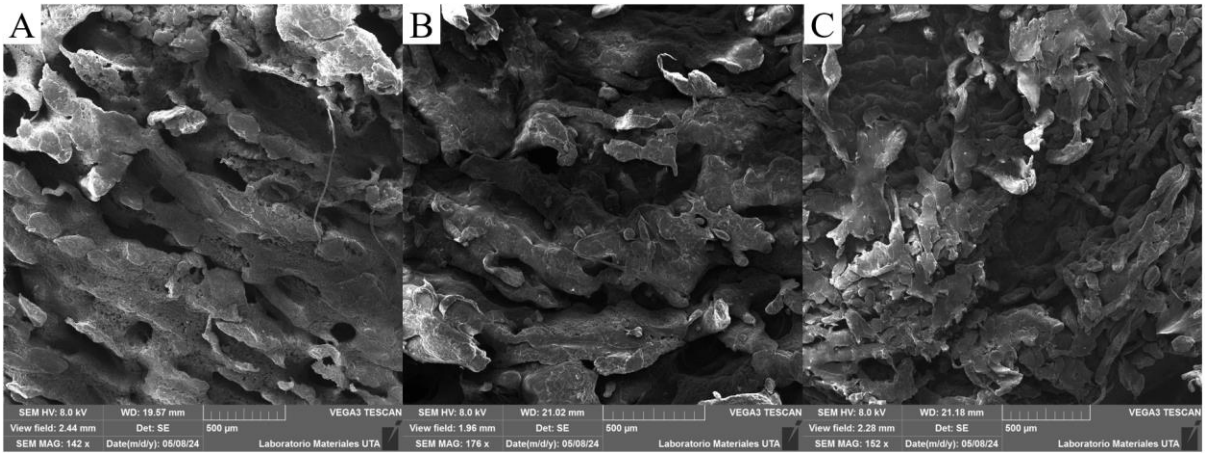


Figura 8. *Micrografías SEM de los ABs a los 30 minutos del proceso de lixiviación*
Nota: Andamios biológicos a los 30 min de lixiviación, (A) ABs Q/PCL- 25% Microesferas, (B) Q/PCL 50% Microesferas, (C) ABs Q/PCL 75% Microesferas.

Se obtuvieron andamios de quitosano y policaprolactona (PCL) mediante la técnica de lixiviación de microesferas de gelatina, la variación de concentración de porógenos resultaron en estructuras favorables con diferentes porosidades que fueron caracterizadas morfológica, mecánica y biológicamente, de forma que puedan ser aplicados en ingeniería de tejido óseo adaptándolos a requerimientos específicos.

3.1.2.Caracterización de andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y mecánicas

3.1.2.1. Evaluación morfológica

La estructura y morfología del andamio incluido la arquitectura, porosidad, tamaño, forma y distribución de los poros, influye directamente en el desempeño del armazón, crecimiento, migración y proliferación celular, así como en el trasporte de oxígeno y nutrientes **(Bombaldi de Souza & Moraes, 2022).** La distribución del tamaño y conectividad de los poros es controlada por el tamaño y proporción del porógeno, de forma que estimule la formación del tejido nuevo. Los tamaños de poros comúnmente utilizados en andamios ITO varían entre 100 y 900 µm, sin embargo, un rango de tamaño óptimo de 250 a 500 µm es preferido para el crecimiento celular interno, poros con tamaños extremadamente grandes pueden reducir la resistencia del andamio y afectar su capacidad estructural, mientras que poros extremadamente pequeños inducen a la condrogénesis desencadenando en la formación de tejidos cartilaginosos en lugar de tejido óseo **(Koushik et al., 2023).**

Se presentan micrografías SEM que evidencian la morfología de los ABs a diferentes concentraciones de microesferas de gelatina. Se observó macroporos y microporos con un rango de tamaño de 90 a 600 µm y una morfología de poro irregular. En la **Figura 9** se ilustran micrografías correspondientes a la superficie de los andamios, mientras que en la **Figura 10** se presenta el corte. Los ABs Q/PCL 25% Microesferas denotan una morfología lisa con un tamaño de poro entre 191.75 y 435.97 µm, un tamaño promedio de 302.10 µm y una interconectividad baja **(Figuras 9A, D; 10A, D.** Los ABs Q/PCL 50% Microesferas presentaron un tamaño de poro entre 107.55 y 633.19 µm y un promedio de 279 µm, con una distribución uniforme de los poros **(Figuras 9 B, E; 10 B, E).** Mientras que los ABs Q/PCL 75% Microesferas, presentaron un tamaño de poro entre 167.17 y 561.11 µm y un promedio de 290 µm con una morfología rugosa e interconectividad elevada **(Figuras 9C, F; 10 C, F).**

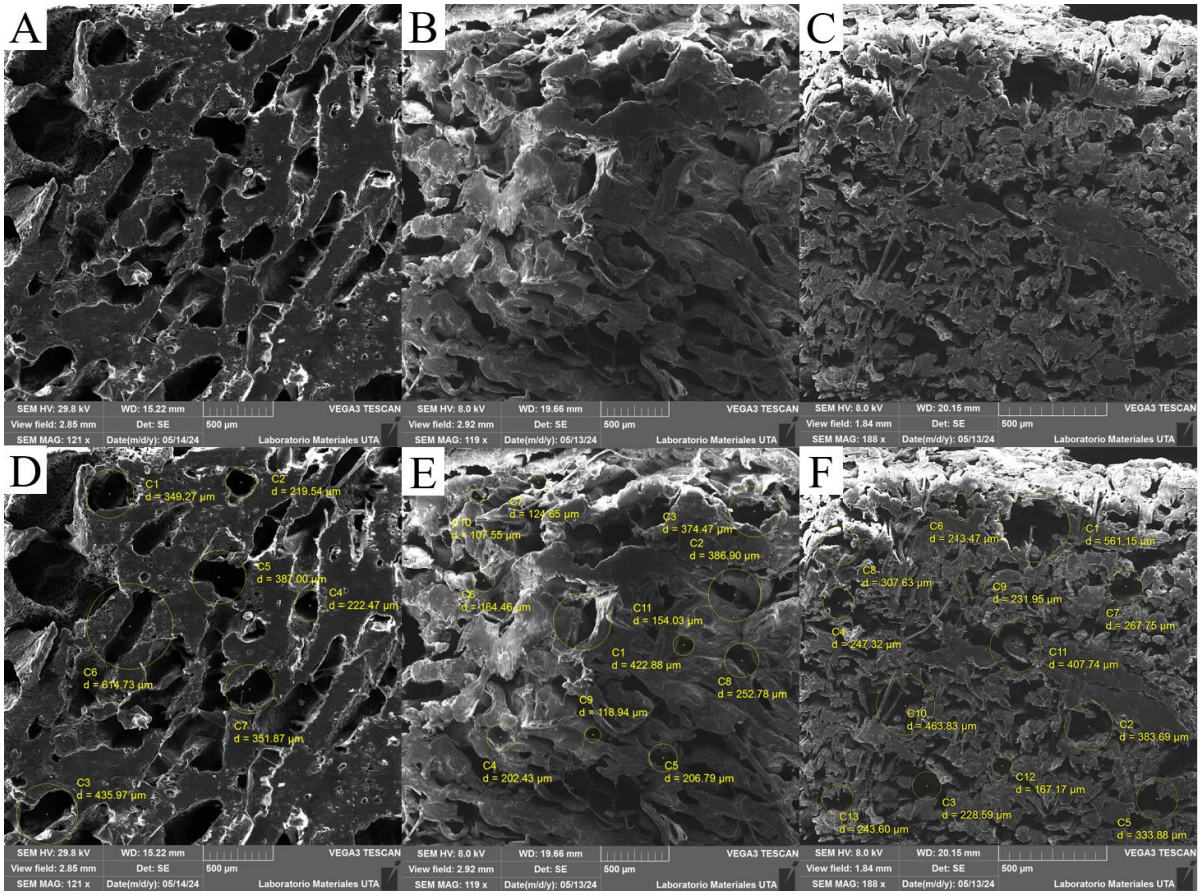


Figura 9. *Micrografías SEM de la superficie de los ABs*

Nota: Morfología SEM de la superficie de andamios biológicos de quitosano y PCL obtenidos por lixiviación con microesferas de gelatina, (A y D) ABs 25% Microesferas, (B y E) ABs 50% Microesferas, (C y F) 75% Microesferas (D, E, F) tamaño de poros de los ABs.

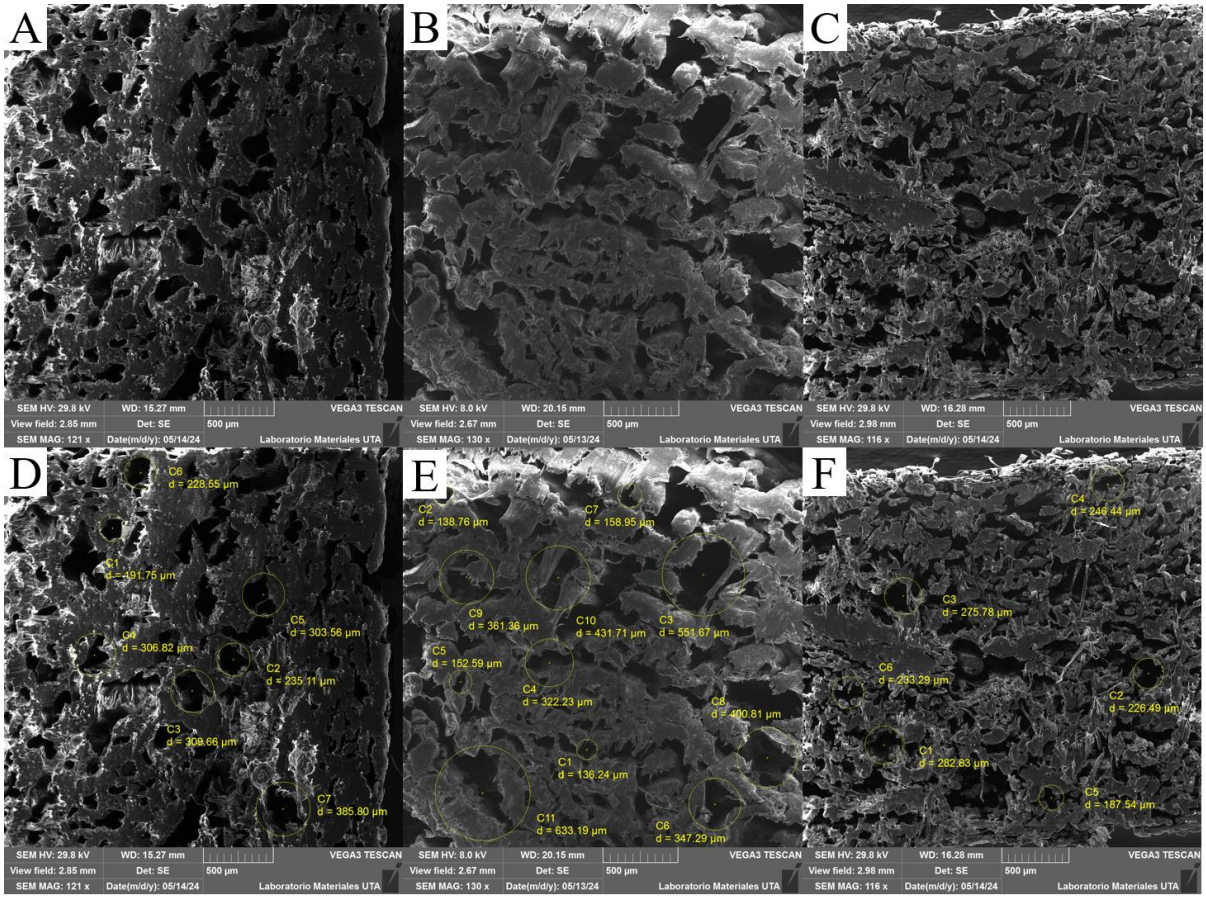


Figura 10. *Micrografías SEM del corte de los ABs*

Nota: Morfología SEM del corte de andamios biológicos de quitosano y PCL obtenidos por lixiviación con microesferas de gelatina, (A y D) ABs 25% Microesferas, (B y E) ABs 50% Microesferas, (C y F) 75% Microesferas, (D, E, F) tamaño de poros de los ABs.

Los andamios con macroporos promueven la formación del tejido óseo y la vascularización, las células de osteoblastos (10 a 50 µm de tamaño) prefieren un tamaño de poro de 250 a 350 µm para la regeneración del hueso mineralizado, la infiltración de macrófagos y células involucradas en la colonización, migración, eliminación de desechos y bacterias, mientras que la presencia de microporos (≤150 µm) proporcionan una mayor superficie estimulando el intercambio iónico y la adsorción de proteínas óseas. **(Pei et al., 2023).** Diferentes tamaños de poro permiten la unión de diferentes tipos de células en andamios de PCL, tamaños de poro entre 380 a 405 µm permite la proliferación de condrocitos y osteoblastos, los fibroblastos prefieren un tamaño de poro de 186 a 200 µm, mientras que un tamaño de 400 µm favorece la angiogénesis y mejora la capacidad de formación de hueso en los andamios **(Dwivedi et al., 2020).**

El tamaño de los poros obtenidos para los ABs quitosano/PCL son comparables con andamios para tejido óseo obtenidos en investigaciones similares. En el estudio de **Zhao et al. (2020)** se elaboraron andamios de colágeno y PCL con tamaños de poro que oscilaban de 250-500 μm, mediante lixiviación de partículas de sal. **Ruiz et al. (2021)** fabricaron andamios con β-fosfato tricálcico por lixiviación de partículas de sacarosa en diferentes concentraciones, los tamaños de poro obtenidos se encontraban en un rango de 90 a 600 μm, además presentaron una morfología irregular. **Tang et al. (2012)** produjeron andamios a base de PLGA para la regeneración osteocondral, utilizando de microesferas de gelatina de tamaño creciente graduado como porógeno, obtuvieron tamaños de poros pequeños (80-200 μm), poros intermedios, (200-350) μm y poros grandes (350-450 μm).

La interconectividad entre los poros es un factor importante en la proliferación y crecimiento celular, además de que mejora la distribución del espacio para promover la formación del tejido homogéneo **(Bombaldi de Souza & Moraes, 2022).** La interconectividad de los poros en los andamios obtenidos muestra una relación directamente proporcional a la cantidad de microesferas de gelatina usadas como porógenos, siendo los ABs con 25% de microesferas el que mostro menor interconectividad y los ABs con 75% de microesferas los que mostraron mayor interconectividad **(Figuras 9 y 10).** En el estudio de **Agrawal et al. (2000)** se investigaron la influencia de diferentes proporciones sal (porógeno): polímero en el grado de porosidad y permeabilidad, identificaron que una mayor de proporción del porógeno conduce a una mayor interconectividad, es así que la cantidad de porógeno en el polímero determina las interconexiones que se forman en las regiones donde existe cercanía entre los porógenos como un indicador de la interconectividad en los poros.

La heterogeneidad en los poros proporciona propiedades fisiológicas y estructurales únicas a los andamios ITO con múltiples características críticas para la curación ósea. El tejido óseo presenta una estructura organizada jerárquicamente, el hueso cortical más denso y el hueso trabecular esponjoso que consiste en una red más abierta ocupada por vasos sanguíneos y médula ósea **(Koushik et al., 2023).** La porosidad graduada permite que el andamio imite de manera más precisa la estructura y las propiedades mecánicas del hueso natural, en donde tanto el tamaño de los poros como la porosidad tienden a cambiar entre el hueso cortical y el hueso trabecular **(Abbasi et al., 2020).**

De acuerdo con los resultados obtenidos, los ABs Q/PCL 75% Microesferas presentan una mayor cantidad de macroporos y microporos con una interconectividad alta y una superficie rugosa adecuada proliferación y crecimiento celular. Los ABs Q/PCL 50% Microesferas tienen una estructura menos porosa, con una menor interconectividad y superficie menos rugosa, mientras que los ABs Q/PCL 25%

Microesferas presentaron menor cantidad de macro y microporos con una interconectividad baja y una superficie lisa, no obstante, la aplicación de cada tipo de andamios dependerá de las características del tejido óseo que se busca restaurar.

3.1.2.2. Evaluación de la porosidad

El porcentaje de porosidad en los andamios indica los espacios libres que posee la estructura, esta propiedad influye directamente con las propiedades mecánicas y biológicas. La porosidad permite la migración y proliferación de las células madre mesenquimales (MSC) y los osteoblastos responsables de la formación del tejido óseo **(Zhou et al., 2023a).** Los andamios utilizados en ITO presentan porosidad entre del 50% y 90%, un porcentaje de porosidad alto (>65%), proporciona un espacio superficial más grande lo que permite una mayor infiltración celular con la ECM, sin embargo, reduce su capacidad estructural, mientras que una porosidad inferior al 65% proporciona mayor resistencia mecánica, no obstante, se reduce la capacidad de interacción y propagación de las células en la ECM **(Koushik et al., 2023).**

La evaluación de la porosidad en los tres tipos de ABs se determinó mediante el método del desplazamiento del líquido **(Anexo 4B),** se utilizó alcohol deshidratado como solución apolar capaz de infiltrarse por todos los poros presentes en el andamio sin ocasionar hinchamientos ni contracciones y sin inferir en las propiedades del material **(Loh & Choong, 2013).**

En la **Figura 11,** se presentan los resultados obtenidos referente a los porcentajes de porosidad de los diferentes tipos de ABs, en donde para los ABs Q/PCL 25% Microesferas se observó una porosidad del 61.50%, los ABs Q/PCL 50% Microesferas presentaron un 72.40% de porosidad y los Q/PCL 75% Microesferas un 85.29%. Los análisis estadísticos revelaron que existe diferencia significativa (p-value < 0.05) entre las medias de los porcentajes de porosidad de los tipos de andamios, así mismo con un nivel de confianza del 95% la comparación de medias de los porcentajes resultó ser significativamente diferentes para todos los ABs **(Anexo 8 y 15)**. La diferencia significativa se atribuye a las diferentes concentraciones de porógenos agregados a la matriz polimérica, pues el porcentaje de porosidad es un parámetro que influye en la funcionalidad y en las demás propiedades de los andamios.

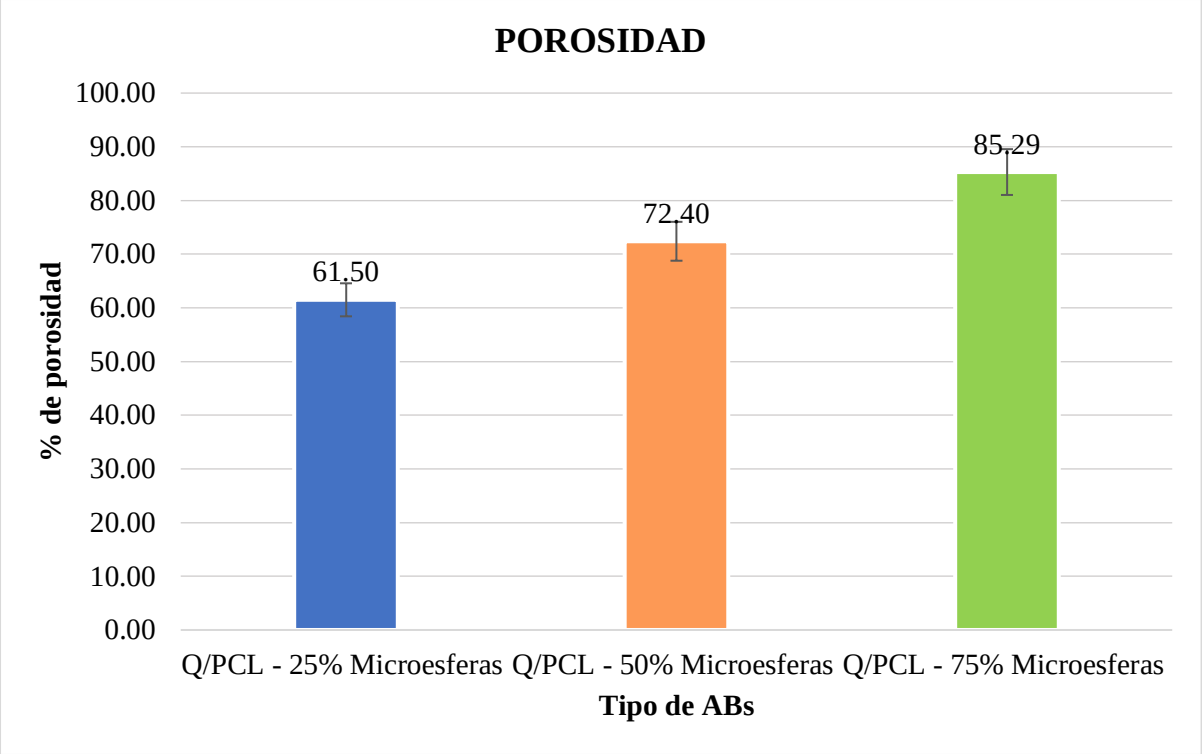


Figura 11. *Porcentaje de porosidad de los ABs*

Nota: Porcentajes de porosidad obtenidos, para los ABs 25% Microesferas un promedio de 61.50±2.22%, para los ABs 50% Microesferas 72.40±0.75% y para los ABs 75% Microesferas 85.29±0.58%. Los resultados son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

La porosidad de los andamos puede modularse seleccionando la cantidad adecuada de porógeno. En el estudio de **Wan et al. (2009)** se elaboraron andamios de policaprolactona y quitosano mediante lixiviación de partículas de sal utilizando dos concentraciones de porógenos del 75 y 85%, se evidenció que las porosidades se encontraban en un rango de 68.2% y 72.1% además mencionan que la PCL promueve una mayor porosidad a diferencia del quitosano que aumenta la viscosidad de la solución disminuyendo la incidencia a la porosidad. En el estudio de **Santos et al. (2021)** se elaboraron andamios de PCL utilizando bicarbonato de amonio como porógeno en concentraciones del 50% y 75% del peso de la mezcla inicial, los resultados obtenidos demostraron rangos de porosidad de 72.6 a 78.4% y 81.6 a 82.8% respectivamente evidenciando que un aumento de contenido de porógeno desencadena en un aumento de porosidad.

Cuando un andamio es implantado en el defecto óseo, este remplaza temporal o parcialmente la estructura del hueso, por lo que los andamios deben presentar características similares y estructuras jerárquicas al tejido óseo. Este tejido está compuesto por huesos trabeculares que son estructuras

esponjosas con una alta porosidad del 50% hasta el 90% con tamaños de poro de 300 a 500 μm, con propiedades anisotrópicas no homogéneas que participan en el proceso metabólico del tejido óseo y aseguran un intercambio de nutrientes intramedulares, por su parte los huesos corticales presentan porosidades bajas (5-30%), una dureza alta y están compuestos principalmente por compuestos inorgánicos, desempeñando un papel importante en el soporte estructural **(Pei et al., 2023).**

En el estudio de **Boccaccio et al. (2016)** en la elaboración de andamios con gradiente porosa se obtuvieron estructuras con capas que imitaban al hueso trabecular esponjoso, este presentó un mayor crecimiento celular, trasporte de nutrientes y desechos en esta zona altamente porosa, mientras que una capa más densa y compacta simulaba el hueso cortical rígido favorable para una carga estructural.

En base a los resultados obtenidos los ABs Q/PCL 25% Microesferas con una porosidad de 61.50% proporciona una estructura suficientemente densa, capaz de soportar cargas mecánicas y fuerzas físicas, sin embargo, la infiltración celular y el flujo de nutrientes es más reducida y controlada, considerándose adecuados en aplicaciones en donde se requiera mayor soporte estructural como en la regeneración de hueso cortical, los ABs Q/PCL 50% Microesferas con un 72.40% de porosidad presentan un equilibrio entre la infiltración celular y la integridad estructural, considerándose en aplicaciones en hueso trabecular, ya que el nivel de porosidad mejora la osteoconductividad, mientras que los ABs Q/PCL 75% de microesferas con un 85.29% de porosidad presentan una estructura mucho más ligera y menos densa, por lo que su alta porosidad implica una menor resistencia por lo que son adecuados para una regeneración rápida del tejido donde se prioriza la infiltración celular y la vascularización sobre la resistencia mecánica.

3.1.2.3. Evaluación de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR)

La tasa de trasmisión de vapor de agua (WVTR) es un parámetro que permite determinar la cantidad de vapor de agua que atraviesa el área del andamio porosos por día, un equilibrio en la humedad previene la desecación del tejido y al mismo tiempo evita una humedad excesiva que podría que podría provocar crecimiento bacteriano, además de ser esencial para el intercambio de gases y fluidos en el entorno biológico **(Joglekar et al., 2020).** La permeabilidad es un parámetro importante implicado en la penetración de las células en el andamio, así como en la difusión de nutrientes y oxígeno, este parámetro está relacionado con el tamaño de poro, porosidad, interconectividad y distribución de los poros

(Abbasi et al., 2020). Una permeabilidad elevada favorece a defectos óseos que requieren de un mayor suministro de oxígeno y nutrientes para su regeneración **(Koushik et al., 2023).**

Los resultados obtenidos en la evaluación de la tasa de trasmisión de vapor de agua en andamios biológicos de quitosano y PCL se presentan en la **Figura 12,** se evidencia que los ABs Q/PCL 25% de microesferas presentaron una WVTR 85.02 g/m^{2}h, los ABs Q/PCL 50% de microesferas un 106. 92 g/m^{2}h, mientras que para los ABs Q/PCL 25% de microesferas un 117.18 g/m^{2}h. De acuerdo con los análisis estadísticos se evidenció que no existe diferencia significativa (p-value > 0.05) entre las medias de la tasa de trasmisión de vapor de agua, así mismo con un nivel de confianza del 95% en la comparación de medias los ABs no presentaron diferencia significativa **(Anexo 9 y 16).**

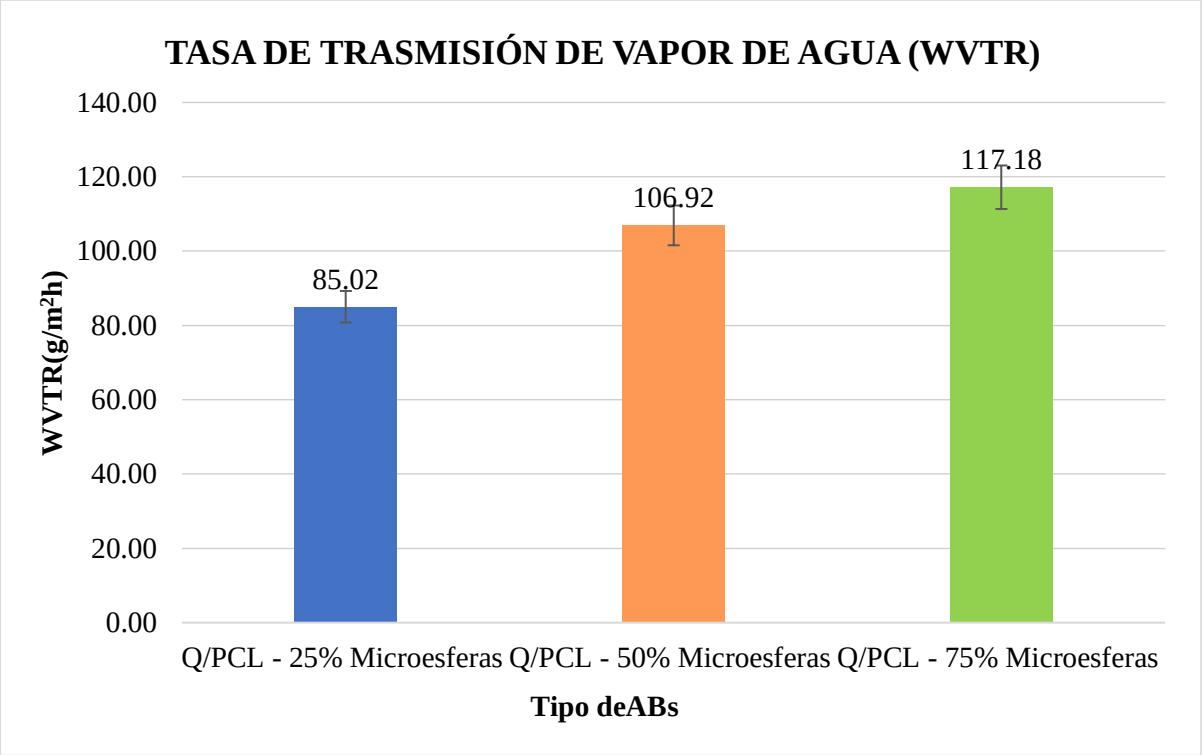


Figura 12. *Tasa de trasmisión de vapor de agua (WVTR) de los ABs*

Nota: Tasa de trasmisión de vapor de agua (WVTR), para los ABs 25% Microesferas se obtuvo un promedio de 85.02±2.22 g/m^{2}h, para los ABs 50% Microesferas 106.92±12.23 g/m^{2}h y para los ABs 75% Microesferas 117.18±28.93 g/m^{2}h. Los resultados no son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Según **Bahadoran et al. (2020)** la WVTR en andamios para tejidos cutáneos permite controlar la perdida de líquidos corporales en los procesos de cicatrización de heridas, en su estudio relacionado con la elaboración de hidrogeles (PVA)/alginato de sodio incorporados con microesferas de PCL para la cicatrización de heridas obtuvo valores de WVTR en un rango de 47.08 y 67.49 g/m^2h mismos que se encontraban en un rango adecuado para la cicatrización de estas heridas (33-208 g/m^2h). No obstante, señala que valores elevados de WVTR resultan en un secado del área, mientras que valores muy bajos desencadenan en la acumulación de exudados. **Nosrati et al. (2021)** menciona que la acumulación de exudados resulta en la degradación de la ECM afectando al desarrollo del tejido, mientras que una baja tasa de trasmisión impide el intercambio gaseoso con la acumulación de CO_2 inhibiendo la proliferación celular durante la angiogénesis.

La WVTR como un indicador de la permeabilidad en andamios biológicos, al presentar valores elevados se correlaciona con una mejor permeabilidad lo cual favorece la regeneración del tejido óseo mientras que valores menores evidencia una permeabilidad baja impidiendo la movilización de gases y nutrientes, de acuerdo con el resultado obtenidos los valores de WVTR obtenido en el presente trabajo para los tres tipos de ABS se encuentran en límite mencionado, los ABs Q/PCL 75% de microesferas presentaron una mayor WVTR es decir una mayor permeabilidad de oxígeno y nutrientes. Esto se debe a que al presentar un alto porcentaje de porosidad la permeabilidad es mayor, sin embargo, los valores no eran significativamente diferentes.

3.1.2.4. Evaluación mecánica

El rendimiento y la funcionalidad de los andamios en BTE, dependen en gran parte de las propiedades mecánicas que poseen, un análisis del comportamiento mecánico, la funcionalidad y el rendimiento son fundamentales para conocer si son lo suficientemente aptos pasar soportar las cargas mecánicas a las que serán sometidos **(Bombaldi de Souza & Moraes, 2022).**

La resistencia a la tracción mide la capacidad de un material para resistir fuerzas que tienden a estirarlo o alargarlo, el módulo elástico como una medida de la rigidez de un material, y la deformación que indica el cambio en la forma o tamaño de un material debido a una fuerza aplicada, son propiedades que deben ser lo suficientemente adecuados antes y después de su implantación, de forma que los andamios puedan mantener su integridad hasta la posterior reconstrucción del tejido mientras lo soporta mecánicamente **(Dwivedi et al., 2020).**

El comportamiento mecánico se evaluó en términos de resistencia a la tracción, deformación, y módulos de elasticidad, en la **Figura 13** se observa que los ABs 25% Microesferas exhibieron una mayor resistencia a la tracción 4.62 N/mm^2, mientras que para los ABs 75% fue menor con 0.74 N/mm^2. De acuerdo con los análisis estadísticos existe diferencia significativa (p-value < 0.05) entre las muestras así mismo con un nivel de confianza del 95% al comparar sus medias, los ABs 25% resultaron ser significativamente diferentes con los otros dos ABs (**Anexo 10 y 17**). La resistencia a la tracción disminuye a medida que aumenta la cantidad de microesferas, ya que una mayor porosidad reduce el material sólido disponible para soportar las cargas.

En el estudio de **Bombaldi de Souza & Moraes (2022)** se elaboraron andamios bicapa de quitosano/xantano y PCL como sustitutos del tejido periostio, en comparación con estructuras únicamente de PCL, los compuestos mostraron una menor resistencia a la tracción, por lo que la presencia de PCL fue esencial para proporcionar soporte mecánico a los polisacárido, además estos andamios presentaron una porosidad mayor lo que influyó en la integridad del material al estar sometido a estiramientos excesivos.

Los módulos de elasticidad obtenidos por los ABs 25% Microesferas fue de 386.70 KPa, seguido de los ABs 50% Microesferas con 214.51 KPa, mientras que para los ABs 50% Microesferas fue menor con 149.26 KPa (**Figura 13),** indicando que tampoco existe diferencia significativa (p-value > 0.05) entre las medias de las muestras, así como en la comparación de sus medias con límites de confianza del 95% **(Anexo 10 y 17).** El módulo elástico también disminuye con el aumento de las microesferas, un menor módulo elástico indica que el material es menos rígido, lo que coincide con el aumento de la porosidad.

Además, los ABs 25% Microesferas alcanzaron un porcentaje máximo de deformación 2.54%, seguido de los ABs 50% Microesferas con 1.06%, mientras que los ABs 25% Microesferas mostraron un 0.74%, los análisis estadísticos revelaron que no existe diferencia significativa entres los ABs (p-value > 0.05), así como al comparar sus medias con límites de confianza del 95% **(Anexo 10 y 17).** Lo que indica que la máxima deformación disminuye significativamente con el aumento de las microesferas. Esto sugiere que los andamios con menor porosidad (25% de microesferas) son mayormente capaces de deformarse antes de romperse, mientras que los andamios con mayor porosidad (75% de microesferas) son más frágiles.

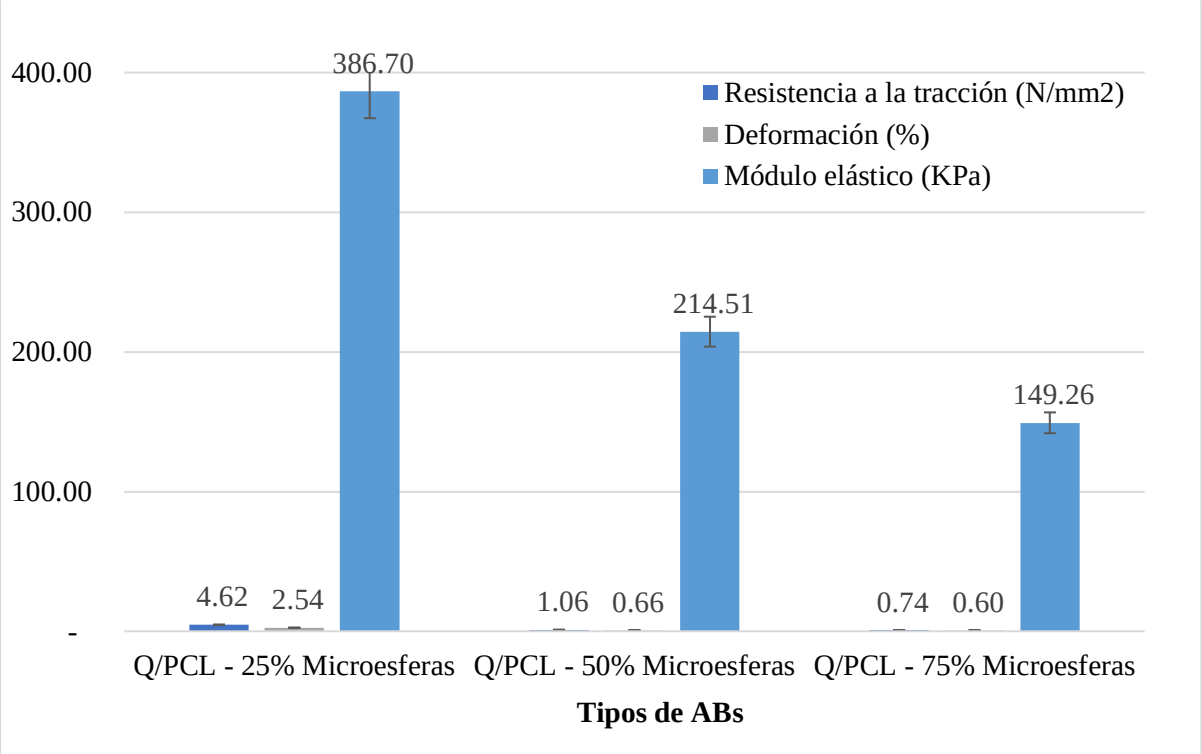


Figura 13. *Evaluación de las propiedades mecánicas de lo ABs por ensayo de tracción*

Nota: Resistencia a la tracción para los ABs 25% Microesferas se obtuvo un promedio de 4.62±1 N/mm2, para los ABs 50% Microesferas 1.06±0.53 N/mm2 y para los ABs 75% Microesferas 0.74±0.69 N/mm2, con diferencia significativa (p-value < 0.05) entre las muestras, siendo los ABs 25% significativamente diferentes con los otros dos ABs con un nivel de confianza del 95%. El módulo de elasticidad para los ABs 25% Microesferas un promedio de 386.70±273.28 KPa, para los ABs 50% Microesferas 214.51±79.80 KPa y para los ABs 75% Microesferas 149.26±113.77 KPa. La deformación para los ABs 25% Microesferas un promedio de 2.54 ±1.58 %, para los ABs 50% Microesferas 0.66±0.01 N/mm2 y para los ABs 75% Microesferas 0.60±0.24%. Los resultados no son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

Pontinha et al. (2023) menciona que las propiedades mecánicas de los huesos tienden a varias con su orientación, el módulo elástico del hueso cortical oscila entre 3 y 30 GPa, mientras que el hueso esponjoso se estima entre 0.02 y 6 GPa, mientras que la resistencia a la tracción del hueso compacto y del hueso trabecular son de 80 a 150 y de 1 a 10 MPa (N/mm2) respectivamente. La PCL a granel presenta una resistencia a la tracción de 25 a 43 MPa y un módulo elástico de 330 a 360 MPa aproximadamente, los andamios compuestos de PCL porosos o fibrosos tienden a presentar una menor resistencia a la tracción y módulo elástico, debido a su estructura porosa **(Dwivedi et al., 2020).**

En el estudio de **De Santis et al. (2011)** se realizaron ensayos de tracción en andamios de PCL y nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (Fe_3O_4) para tejido óseo, los resultados mostraron que para el armazón solo de PCL el módulo elástico, la resistencia a la tracción y la deformación fue de 571.5 MPa, 29.3MPa y 12.3% respectivamente, la adición de (Fe_3O_4) reforzó mecánicamente la estructura mostrando valores más altos, en contraste con los resultados obtenidos en el presente estudió, se muestran valores menores a los obtenidos únicamente del andamio de PCL. lo que se evidencia que la presencia del quitosano tiende a disminuir las propiedades mecánicas de estructuras sintéticas como la PCL, además **Yusof et al. (2023)** menciona que la porosidad influye negativamente en las propiedades mecánicas, en su estudió sobre la influencia de la porosidad en andamios PLA, encontró que el aumento de la porosidad disminuyó la fuerza de tracción máxima que el andamio podía soportar.

La dureza shore, es una prueba comúnmente utilizada para mediar la dureza de un material, se puede relacionar con el módulo de elasticidad, mientras más duro es un material mayor es su módulo, por ende, es más rígido **(Naveen et al., 2022).**

Una mayor porosidad atribuye a un menor módulo de elasticidad, por ende, la dureza también es menor, lo que concuerda con los resultados obtenido en la **Figura 14**, para los ABs 75% Microesferas que fue el andamio más poroso, el módulo de elasticidad fue mayor con 386.70 KPa, mostrando una dureza shore de 21.33, para los ABs de 50% Microesferas la dureza shore fue de 17.83, mientras que para los ABs 25% con un módulo de elasticidad menor la dureza shore fue de 10.83. Los resultados no mostraron diferencias significativas para el análisis de varianza (p-value > 0.05) así como en la comparación de medias con un nivel de confianza del 95% **(Anexo 11 y 18).**

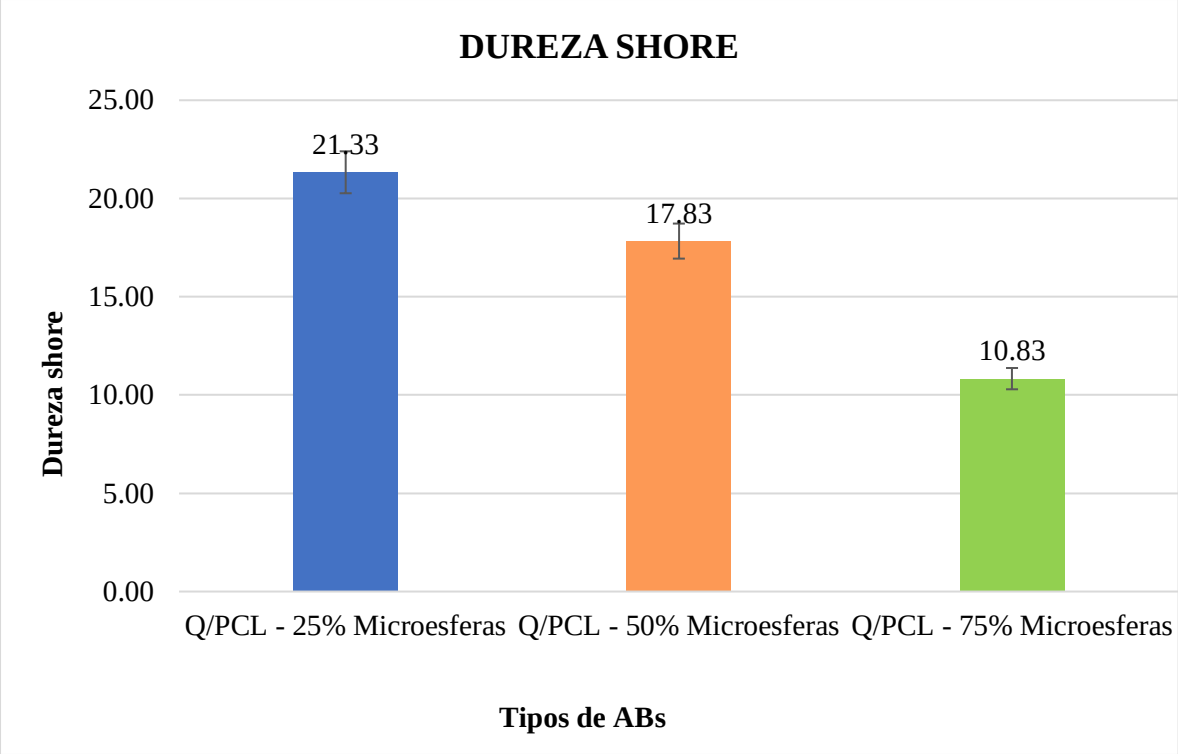


Figura 14. *Evaluación de las propiedades mecánicas de lo ABs por dureza shore*

Nota: Promedio de la dureza shore para los ABs 25% Microesferas 21.33±1.61, para los ABs 50% Microesferas 17.83±1.76 y para los ABs 75% Microesferas fue de 10.83±0.29. Los resultados no son significativamente diferentes con un nivel de confianza del 95%.

En el estudio de **Di Maro et al. (2024)** sobre las propiedades mecánicas de andamios de poli (ε-caprolactona)/Circonio para tejido óseo, los andamios únicamente de PCL mostraron un módulo de elasticidad de 516 KPa, con una dureza shore de 56.2, mientras que la adición del circonio aumentaba las propiedades mecánicas de los compuestos con una mayor dureza y módulo de elasticidad.

En base a los resultados obtenidos evidencia que la presencia del quitosano tiende a disminuir las propiedades mecánicas de estructuras sintéticas como la PCL, además andamios con una mayor porosidad disminuyen las propiedades mecánicas.

La caracterización morfológica y mecánica de los andamios biológicos proporcionó información detalla sobre la estructura y las propiedades físicas, asegurando que los ABs cumplen con los requisitos específicos para la regeneración de tejido óseo, para su posterior evaluación *in vitro*.

3.1.3.Evaluación de los andamios fabricados mediante pruebas biológicas *in vitro*

3.1.3.1. Evaluación de la capacidad de absorción de agua.

El análisis del comportamiento de los andamios *in vitro* permite predecir las respuestas frente a medios fisiológicos antes de ser implantados. Los andamios ITO que imitan las propiedades del hueso nativo presentan una mayor capacidad para promover la regeneración de los tejidos al proporcionar un ambiente favorable para el crecimiento de osteoblastos y células progenitoras osteogénicas (**Bombaldi de Souza & Moraes, 2022).** La capacidad de absorción de agua ayuda a determinar la capacidad que tiene la estructura para retener biomoléculas en su interior, desde proteínas, nutrientes y líquidos, esencial para la regeneración del tejido óseo **(Zhou et al., 2023b).**

Se evaluó la capacidad de absorción del agua en relación con el hinchamiento, se sumergieron los ABs en PBS y se realizaron mediciones de pesajes durante 6h con intervalos de 30 min. Los porcentajes de absorción del agua para los ABs se muestran en la **Figura 15,** los valores disminuyeron de 274.95% para los ABs 75% Microesferas, para los AB 50% Microesferas al 174.83%, y para los AB 25% Microesferas al 76.05%. Los Análisis estadísticos revelan que existe diferencia significativa tanto para el análisis de varianza ($p\text{-value} < 0.05$) entre las muestras como para la comparación de medias de los tres tipos de ABs (95% de confianza) **(Anexo 12 y 19)**, lo que indica que la capacidad de absorción del agua de los ABs incrementaba al aumentar la concentración de microesferas de gelatina.

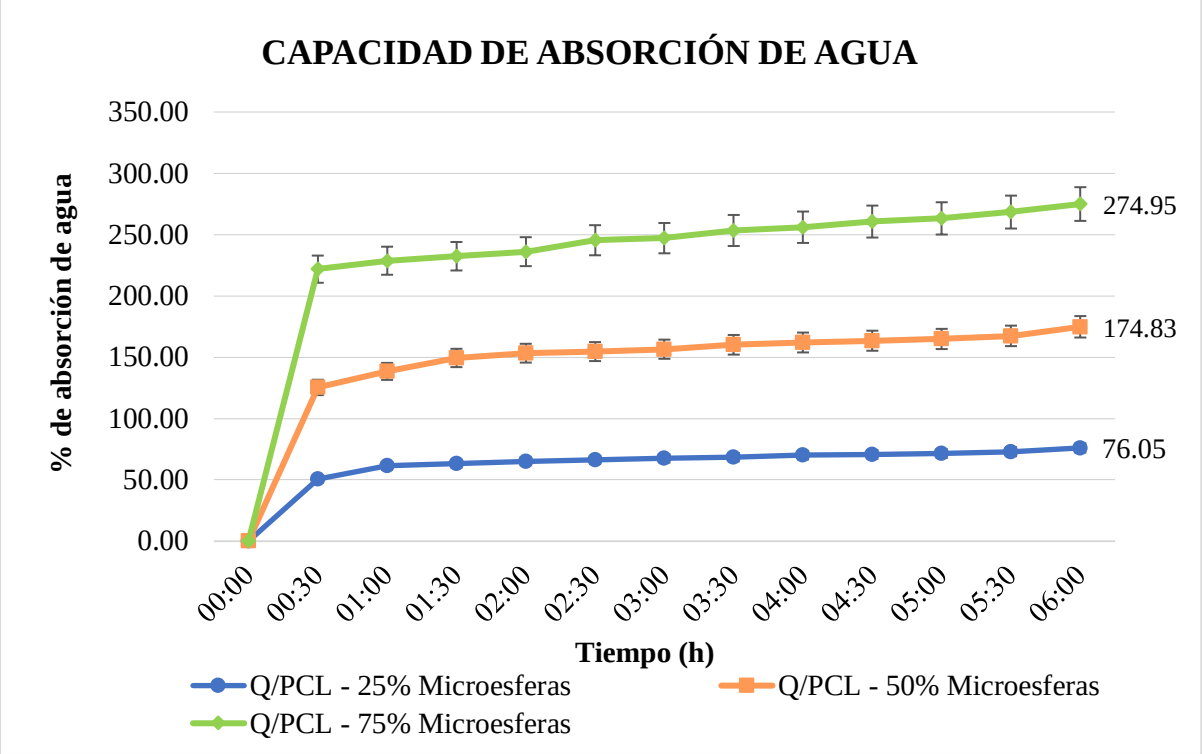


Figura 15. *Capacidad de absorción de agua de los ABs*

Nota: Capacidad de absorción de agua de los andamios biológicos en PBS, para los ABs 75% Microesferas fue de 274.95, para los ABs 50% Microesferas con 174,83% y para los ABs 25% Microesferas fue de 76.05% Los andamios presentaron diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados obtenidos por los ABs se comparan con los resultados obtenidos por **Mad Jin et al. (2015)** en su estudio sobre andamios porosos de PCL/quitosano y nHA/PCL/quitosano, evidenciaron que el andamio de PCL/quitosano después de un período de incubación de 24 horas presentó una relación de hinchazón aproximada de 225%. La composición polimérica afectó la capacidad de hinchazón del andamio, el quitosano por la presencia de grupos amino (NH_2), hidroxilo (OH) y carboxilo (COOH), lo convierte en un polímero hidrófilo proporcionando un entorno osteoconductor, mientras que la PCL solo presentan grupos éster caracterizándolo como hidrófobo, lo que conduce a una menor capacidad de adsorción, sin embargo, la mezcla de estos dos polímeros modifica la humectabilidad del armazón compuesto. Los resultados presentados por **Rodríguez et al. (2018)** en la elaboración de andamios compuestos de estroncio/quitosano/PCL para la regeneración del tejido craneofacial, muestran que para los ABs compuestos de PCL/quitosano alcanzaron un hinchamiento máximo de 243%.

En el estudio de **Poddar et al. (2021)** se elaboraron andamios de PCL, recubiertos con quitosano y como mezcla, estos presentaron un porcentaje de hinchazón de 78.59 y 89.39% respectivamente, la presencia del quitosano favoreció el proceso de absorción. Así mismo los resultados obtenidos en el estudio de **Bombaldi de Souza & Moraes (2022)** muestran que la cantidad de líquido absorbido de PBS por los andamios bicapa quitosano-xantano/PCL fue elevada oscilando entre 7.5 y 8.5 g/g (750-850%), en comparación con andamios solo de PCL que fue capaz de absorber cantidades pequeñas 2.63g/g (263%) de PBS. El carácter hidrofóbico de la PCL hace que el fluido (PBS) penetre por la estructura ocupando únicamente los espacios vacíos (poros) sin hidratar las cadenas poliméricas, mientras que para los polisacáridos principalmente el xantano la solución acuosa penetra por toda la estructura además de interactuar con las cadenas poliméricas.

Q. Yang et al. (2006) menciona que al aumentar la porosidad aumenta la capacidad de absorción del agua, los resultados en su estudio en la elaboración de andamios de PCL evidenciaron que cuando la porosidad era del 88.4% la capacidad de absorción de agua fue de hasta 234%, lo que concuerda con los resultados obtenidos, para los ABs 75% Microesferas que presentaron un 85.29% de porosidad la absorción de agua también fue mayor con 274.95% por la presencia del quitosano. Además, resalta que la hidrofilicidad/ hidrofobicidad influyen en la adsorción de proteínas y adhesión celular, una superficie hidrófila favorece la adhesión y propagación celular, mientras que una superficie hidrófoba es favorable para la adhesión de proteínas.

De acuerdo con los resultado presentados, la capacidad de absorción del agua de un andamio se ve influenciada tanto por las características poliméricas como la estructura de los poros, la presencia de quitosano hizo que absorbiera más PBS debido a los enlaces de hidrógeno más fuertes, una mayor capacidad de absorción de agua asegura una suficiente penetración de medios y componentes sanguíneos facilitando el trasporte de nutrientes y metabolitos necesarios para el desarrollo celular, la difusión de moléculas sería posible en los tres ABs, para los ABs a pesar de tener una absorción más baja podría permitir la vascularización y el crecimiento excesivo del tejido.

3.1.3.2. Evaluación de la biodegradabilidad.

Una propiedad importante de los andamios biológicos es su capacidad de biodegradación tanto *in vivo* como *in vitro*. *In vitro* la degradación debe ajustarse a la tasa de crecimiento celular, *in vivo* los andamios deben comenzar a degradarse a medida que se forma el nuevo tejido **(Di Lisa et al., 2022).** Los

andamios biológicos deben tener la capacidad de degradarse con el tiempo, de forma que permita que los nuevos tejidos óseos remplacen completamente las estructuras de soporte restableciendo las funciones fisiológicas normales **(D. Yang et al., 2019).** Para daños graves del tejido óseo se puede requerir de un implante con tasa de degradación lenta o incluso permanente, por lo que la biodegradabilidad está relacionada con la estructura del andamio y las características del hueso que se desea regenerar **(Zhou et al., 2023a).** Para fusión espinal se requiere un andamio con un tiempo de degradación pasado los 9 meses, mientras que para cranemaxilofaciales de tres a seis meses **(Abdelaziz et al., 2023).**

La biodegradabilidad de los ABs de quitosano/PCL con distintas concentraciones de microesferas se evaluó utilizando plasma sanguíneo y fluido corporal simulado (SBF) con las mismas concentraciones iónicas del plasma sanguíneo, con el fin de evaluar la biodegradabilidad hidrolítica y enzimática de los ABs durante un período de 29 días. Los resultados obtenidos para la evaluación en SBF mostrados en la **Figura 16**, reveló que para los ABs 75% Microesferas hubo un aumento de peso respecto al peso seco durante los primeros 22 días, no obstante, para el día 29 mostró una pérdida de peso del 31.09%, mientras que para los ABs 50% Microesferas y ABs 25% Microesferas se evidenció que durante los 29 días no mostraron biodegradabilidad, indicando un aumento de peso con valores negativos de -37.17 y -26.28% respectivamente. Los análisis estadísticos revelaron que los porcentajes de biodegradabilidad no eran estadísticamente significativos entre los ABs para el análisis de varianza (p-value > 0.05) como al comparar sus medias (95% de significancia) **(Anexo 13 y 20).**

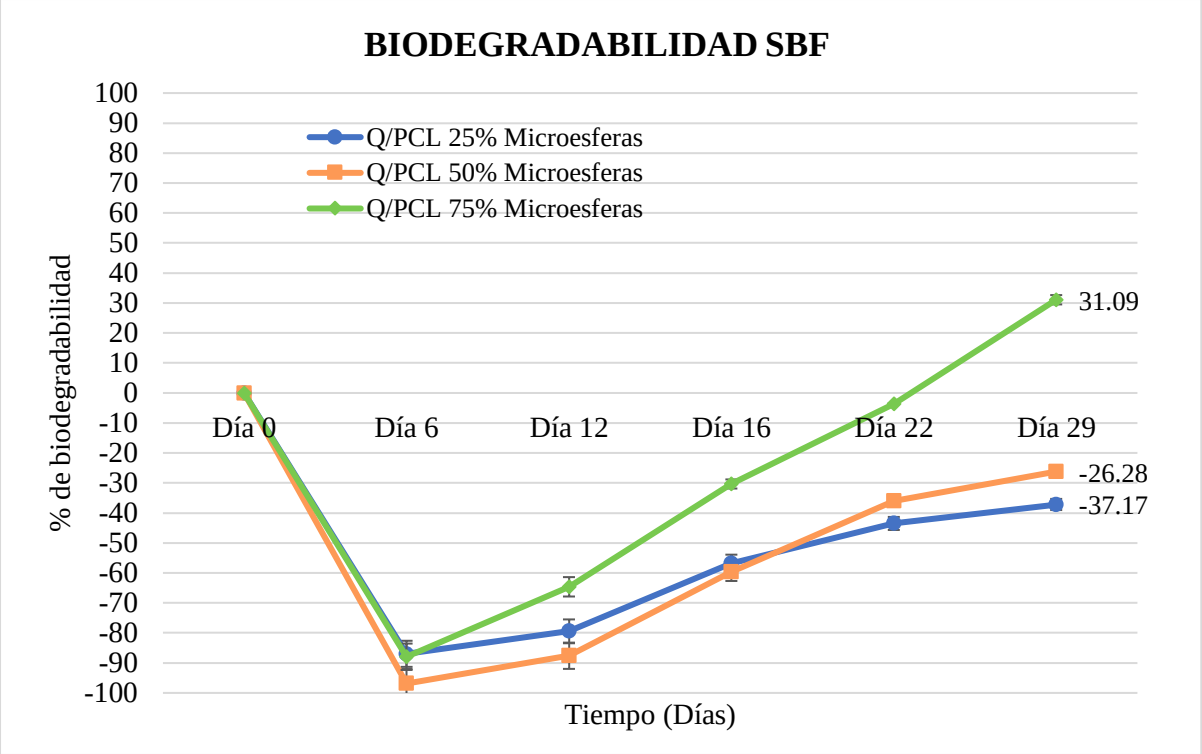


Figura 16. *Biodegradabilidad de los ABs en fluido corporal simulado (SBF)*

Nota: Biodegradabilidad de los andamios biológicos en fluido corporal simulado (SBF), los ABs 75% Microesferas mostraron biodegradabilidad al día 29, alcanzando un 31.09%, para los ABs 50% Microesferas y ABs 75% Microesferas no se evidencio biodegradabilidad hasta el día 29. Los andamios no presentaron diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

De manera similar los resultados correspondientes obtenidos de la degradación de los ABs en plasma sanguíneo se presentan en la **Figura 17,** se evidenciaron que para los ABs 75% Microesferas se dio un aumento de peso hasta el día 16, mientras que para el día 22 y 29 se evidenció una degradación del 30.50% y 54.41% respectivamente., por el contrario, los ABs 75% Microesferas hasta el día 29 mostraron un aumento de peso con -21.78% y los ABs 75% Microesferas con -12.65%. promedios no mostraron diferencia significativa entre los ABs (p-value > 0.05), así como al comparar sus medias (95% de significancia) **(Anexo 14 y 21).**

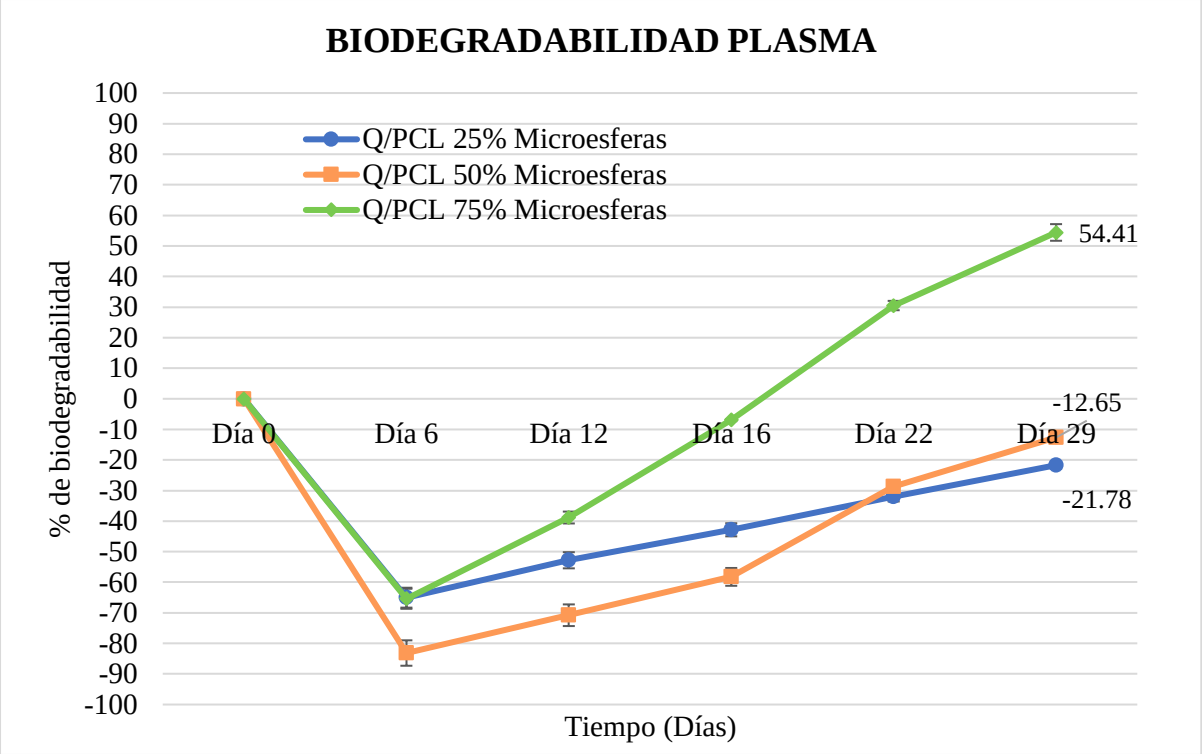


Figura 17. *Biodegradabilidad de los ABs en plasma sanguíneo humano*

Nota: Biodegradabilidad de los andamios biológicos en plasma sanguíneo los ABs 75% Microesferas mostraron biodegradabilidad al día 22 y 29, alcanzando un 30.50% y 54.41% respectivamente, para los ABs 50% Microesferas y ABs 75% Microesferas no se evidencio biodegradabilidad hasta el día 29. Los andamios no presentaron diferencia significativa con un nivel de confianza del 95%.

Los ABs 75% Microesferas los primeros 12 días presentaron una estructura completa, posterior a este tiempo se desintegraron, dificultado su manipulación, los ABs 50% Microesferas presentaron una desintegración al día 16, mientras que los ABs 25% Microesferas hasta el día 29 mantenían su estructura sin presentar ninguna desintegración, tanto para la evaluación en SBF como para el plasma sanguíneo se observaron los mismos cambios. Los ABs exhibieron mayor tasa de degradación en plasma sanguíneo que en SBF, la diferencia para los ABs 75% Microesferas que experimentaron una disminución de peso al día 29 fue del 23.23% entre los dos fluidos.

El plasma sanguíneo es un líquido extracelular del cuerpo compuesto de 91% de agua y 9% de sólidos, contiene más de 150 proteínas como albuminas, globulinas y fibrinógenos y otros complejos que pueden ser absorbidas dependiendo del potencial de unión con la composición polimérica acelerando los procesos de degradación, considerándose relevante en estudios de estructuras ya celularizadas **(Haslene-Hox, 2019).** Mientras que el fluido corporal simulado presenta los mismos componentes

iónicos del plasma sanguíneo, pH y osmolaridad similar, por lo que mimetiza un ambiente fisiológico adecuado para el estudio de andamios ITO, sin embargo, la ausencia de enzimas lo atribuye como una degradación hidrolítica **(Kokubo & Takadama, 2006).**

Según **Dwivedi et al. (2020)** la PCL presenta una tasa de degradación alta, que puede tardar de entre 9 a 12 meses en perder su peso molecular, incluso puede llevar hasta 4 años en degradarse completamente, la tasa lenta de degradación del polímero se atribuye principalmente por la presencia de restos 5-CH_2 en sus unidades repetidas. La degradación de este polímero puede ser hidrolítica o enzimática, resultando en moléculas de ácido caproico como productos de degradación que son eliminados por vías metabólicas o excreción renal directa. La degradación enzimática involucra principalmente por las enzimas lipasas que en medio acuoso cataliza la hidrólisis de los enlaces éster en poliésteres y ocurre en la parte superficial del polímero

El quitosano por su parte al ser un polímero natural hidrófilo su tasa de degradación en andamios biológicos es muy baja, la degradación enzimática *in vitro* de este polímero se puede estudiar en presencia de las enzimas lisozimas y quitinasas mediante la hidrólisis de los enlaces glicosídicos reduciéndolos a oligómeros y monómeros de glucosamina **(Di Lisa et al., 2022). Thariga et al. (2019)** en su estudio elaboraron andamios quitosano compuesto, el AB de quitosano al día 7 presentó un porcentaje de degradabilidad del 95%, considerándose no apto para aplicaciones de tejido óseo, por lo cual se mezcló con hidroxiapatita con el fin de modelar sus propiedades.

Domingos et al. (2010) evaluaron la degradación hidrolítica en PBS y SBF de andamios PCL elaborados por bioextrusión, evidenciaron que en PBS mantuvo un peso inicial constante de 0.2 a 0.4%, mientras que en SBF alcanzó hasta un 1%. En comparación con el estudio de **(Idaszek et al., 2017)** sobre la biodegradabilidad en SBF de andamios compuestos de PCL/tricálcico/PLGA (58.2% de porosidad), evidenciaron una pérdida de peso desde la semana 3, alcanzado un 24% para la semana 9, el porcentaje fue mayor en los armazones compuestos que en el andamio solo de PCL (53.2% de porosidad) que alcanzó solo un porcentaje de 1.2%. Mientras que para los andamios de PCL con una porosidad del 72% elaborados por **Ferreira et al. (2017)** la evaluación de la degradabilidad enzimática en presencia de la enzima lisozima en un periodo de 25 días alcanzó un 72.2%.

La adición de materiales hidrófilos como el quitosano aumenta la tasa de degradación de armazones compuestos de polímeros hidrófobos como la PCL. En el estudio **Bombaldi de Souza & Moraes (2022)**

se evaluó la biodegradabilidad de andamios únicamente de PCL y compuestos (quitosano/xantano/PCL) en agua, PBS y un medio complejo a 37°C, evidenciaron que los ABs de PCL disminuyeron únicamente un 0.5% de su peso en un tiempo de 7 días, mientras que los andamios compuestos quitosano/xantano/PCL alcanzaron hasta un 12% de degradación en agua, un 9.24% en PBS, y un 36.82 en el medio complejo, presentando un porcentaje mayor este último por la presencia de componentes proteicos en el medio lo que debilitó y alteró las interacciones hidrofóbicas de la PCL, los resultados además mostraron que una mayor porosidad, proporciona una mejor interconectividad y mayor permeabilidad, facilitando la difusión de los productos de degradación.

De acuerdo con **Santos et al. (2021)** la tasa de degradación está fuertemente influenciada por la porosidad del andamio, en su estudio de degradabilidad se incubaron andamios PCL producidos por lixiviación de sales (bicarbonato de amonio) en solución de PBS a 37°C durante 21 días, los resultados mostraron que los andamios con 75% de contenido de porógenos presentaron un mayor grado de degradación de 23%, mientras que para los andamios con mejor de concentración de porógeno del 50%, el porcentaje de degradación fue de 15% recalcando que la degradación de la PCL se da por medio de la escisión de la cadena hidrolítica de los grupos éster, además menciona que la tasa de degradación puede ser mayor *in vivo* que en condiciones *in vitro*.

El aumento de peso indicado por los valores negativos **(Figura 15 y 16)** puede relacionarse con el quitosano y su capacidad hidrofílica de interactuar con los fluidos reteniéndolos en su estructura durante las primeras semanas, además de que en las estructuras más porosas hubo más fluido fisiológico y biológico, por lo que la actividad de degradación fue más acelerada. De acuerdo con los resultados obtenidos para los ABs 75% Microesferas mismos que presentaron una porosidad mayor, el porcentaje de degradación también fue mayor, debido a la mayor cantidad de fluido que penetró por todos los espacios vacíos de la estructura, además la presencia de componentes biológicos como las proteínas posiblemente modificaron las interacciones entre de la matriz polimérica lo que resultó en una mayor pérdida de peso. El tiempo de degradación dependerá de las características poliméricas del andamio, así como del tejido que se desea regenerar, que puede varias desde meses e incluso años dependiendo de la región, tamaño, diferencias en la vascularización, entornos mecánicos y vías de formación durante el proceso de regeneración.

La evaluación de la capacidad de absorción de agua y biodegradabilidad *in vitro* de los ABs frente a fluidos fisiológicos y biológicos predijeron la idoneidad de los ABs y el posible comportamiento *in vivo*.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Mediante la técnica de lixiviación de porógenos se elaboraron andamios completamente secos de quitosano y policaprolactona en concentraciones de 2.5% y 25% respectivamente, se utilizaron microesferas de gelatina a diferentes concentraciones como porógenos con el fin de determinar su influencia sobre las propiedades de esta estructura polimérica. Todos los andamios presentaron una coloración blanquecina con una textura y dureza diferentes, los ABs con 25 % de microesferas tenían una textura lisa y mayor dureza, seguido de los ABs con 50% con una textura ligeramente rugosa y menor dureza y los ABs con 75 % de microesferas con una textura altamente rugosa y una dureza inferior a los demás ABs.

- Los andamios biológicos para su aplicación en ingeniería de tejidos óseos deben presentar características morfológicas y mecánicas adecuadas, las micrografías SEM y la infiltración en etanol identificaron para los ABs 25% de microesferas un tamaño de poro promedio de 302.11 µm con una porosidad menor del 61.50 %, para los ABs 50% de microesferas un tamaño de poro promedio de 279.62 µm con una porosidad del 72.40% y para los ABs 75% de microesferas un tamaño promedio de 290.01 µm con una porosidad mayor de 85.29%, encontrándose en el rango adecuado para la vascularización, crecimiento, proliferación y diferenciación celular. De igual manera los ABs 75% de microesferas al tener una mayor porosidad facilitó el paso del vapor del agua a través de la estructura con una mayor tasa trasmisión de 117.18 g/m^2h, adecuado para la difusión de líquidos, oxígeno y nutrientes. Mecánicamente los ABs 25% de microesferas presentaron una mayor rigidez en términos de módulo de elasticidad con 386.70 KPa, mientras que para los ABs 25% fue menor con 149.26 KPa, considerándose dentro de los valores presentados por el tejido nativo.

- Se evaluó el comportamiento de los andamios frente a fluidos fisiológicos y biológicos. Los ABs mostraron un comportamiento satisfactorio, los ABs 75% Microesferas fueron capaces de absorber una mayor cantidad de PBS en su estructura con una tasa de absorción de 249.02% adecuado para el trasporte de proteínas, nutrientes y metabolitos. Así mismo la regeneración del tejido dependerá de la tasa de biodegradabilidad del andamio, los ensayos de

biodegradabilidad al día 29 mostraron para el andamio un 31.09% y 54.40% de degradación hidrolítica (SBF) y enzimática (plasma sanguíneo) respectivamente, mientras que para los otros dos ABs aún no se evidenció biodegradabilidad, el tejido óseo al ser un tejido duro requiere de tiempos prolongados de degradación a medida que el tejido es regenerado.

- Los andamios porosos que combinan biopolímeros naturales y sintéticos y utiliza la técnica de lixiviación exhiben excelentes propiedades morfológicas, mecánicas y biológicas a la vez, los resultados obtenidos evidencian la factibilidad de producir ABs con características idóneas aplicados a la ingeniería de tejido óseo en el campo biomédico, el uso de microesferas cómo porógenos permitió controlar el tamaño de poro y la porosidad parámetros que influyeron en las demás propiedades evaluadas. Los ABs elaborados pueden aplicarse fácilmente, ajustando las características y requisitos del tejido a regenerar, considerando a los ABs 75% de microesferas más adecuado en aplicaciones donde se requiere una rápida integración celular y porosidades mayores como huesos esponjosos, los ABs 50% de microesferas para lograr un balance óptimo entre porosidad y resistencia mecánica, mientras que los ABs 25% de microesferas puede ser aplicados principalmente cuando se requiera una mayor resistencia mecánica y un tiempo de degradación más largo, como huesos densos y de daños graves.

4.2. Recomendaciones

- Combinar la PCL con otros polímeros naturales con el fin de evaluar su incidencia sobre las propiedades morfológicas, mecánicas y biológicas.

- Probar técnicas que impliquen condiciones de vacío para la evaporación del disolvente como la liofilización.

- Probar otros porógenos como las microesferas de alginato.

- Realizar más ensayos complementarios como la resistencia a la comprensión, la rugosidad y ángulo de contacto con el agua para determinar la humectabilidad de las superficies

- Prolongar un mayor periodo de evaluación de la biodegradabilidad con el fin de determinar el tiempo total de degradación del andamio.

- Realizar más pruebas biológicas, como biocompatibilidad y bioactivid para evaluar mejor el comportamiento *in vitro* de los andamios biológicos.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R. M., & Nguyen, N.-T. (2020). Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, *5*(1), 1–9. https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007

Abbasian, M., Massoumi, B., Mohammad-Rezaei, R., Samadian, H., & Jaymand, M. (2019). Scaffolding polymeric biomaterials: Are naturally occurring biological macromolecules more appropriate for tissue engineering? *International Journal of Biological Macromolecules*, *134*, 673–694. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.197

Abdelaziz, A. G., Nageh, H., Abdo, S. M., Abdalla, M. S., Amer, A. A., Abdal-hay, A., & Barhoum, A. (2023). A Review of 3D Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Principles, Fabrication Techniques, Immunomodulatory Roles, and Challenges. *Bioengineering*, *10*(2), 204. https://doi.org/10.3390/bioengineering10020204

Adel, I. M., ElMeligy, M. F., & Elkasabgy, N. A. (2022). Conventional and Recent Trends of Scaffolds Fabrication: A Superior Mode for Tissue Engineering. *Pharmaceutics*, *14*(2), 306. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020306

Agrawal, C. ., McKinney, J. ., Lanctot, D., & Athanasiou, K. . (2000). Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, *21*(23), 2443–2452. https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00112-5

Ansari, M. (2019). Bone tissue regeneration: biology, strategies and interface studies. *Progress in Biomaterials*, *8*(4), 223–237. https://doi.org/10.1007/s40204-019-00125-z

Arseni, L., Lombardi, A., & Orioli, D. (2018). From Structure to Phenotype: Impact of Collagen Alterations on Human Health. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1407. https://doi.org/10.3390/ijms19051407

Asti, A., & Gioglio, L. (2014). Natural and Synthetic Biodegradable Polymers: Different Scaffolds for Cell Expansion and Tissue Formation. *The International Journal of Artificial Organs*, *37*(3), 187–205. https://doi.org/10.5301/ijao.5000307

Bahadoran, M., Shamloo, A., & Nokoorani, Y. D. (2020). Development of a polyvinyl alcohol/sodium alginate hydrogel-based scaffold incorporating bFGF-encapsulated microspheres for accelerated

wound healing. *Scientific Reports*, *10*(1), 7342. https://doi.org/10.1038/s41598-020-64480-9

Bhadran, A., Shah, T., Babanyinah, G. K., Polara, H., Taslimy, S., Biewer, M. C., & Stefan, M. C. (2023). Recent Advances in Polycaprolactones for Anticancer Drug Delivery. *Pharmaceutics*, *15*(7), 1977. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071977

Boccaccio, A., Uva, A. E., Fiorentino, M., Mori, G., & Monno, G. (2016). Geometry Design Optimization of Functionally Graded Scaffolds for Bone Tissue Engineering: A Mechanobiological Approach. *PLOS ONE*, *11*(1), e0146935. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146935

Bombaldi de Souza, R. F., & Moraes, Â. M. (2022). Hybrid bilayered chitosan-xanthan/PCL scaffolds as artificial periosteum substitutes for bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science*, *57*(4), 2924–2940. https://doi.org/10.1007/s10853-021-06800-6

Brudnicki, P. A. P., Gonsalves, M. A., Spinella, S. M., Kaufman, L. J., & Lu, H. H. (2022). Engineering collagenous analogs of connective tissue extracellular matrix. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.925838

Caddeo, S., Boffito, M., & Sartori, S. (2017). Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *5*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00040

Chen, H., Xing, X., Tan, H., Jia, Y., Zhou, T., Chen, Y., Ling, Z., & Hu, X. (2017). Covalently antibacterial alginate-chitosan hydrogel dressing integrated gelatin microspheres containing tetracycline hydrochloride for wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, *70*, 287–295. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.086

Collins, M. N., Ren, G., Young, K., Pina, S., Reis, R. L., & Oliveira, J. M. (2021). Scaffold Fabrication Technologies and Structure/Function Properties in Bone Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, *31*(21). https://doi.org/10.1002/adfm.202010609

Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, *49*(4), 780–792. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009

Cui, Z., Lin, L., Si, J., Luo, Y., Wang, Q., Lin, Y., Wang, X., & Chen, W. (2017). Fabrication and characterization of chitosan/OGP coated porous poly(ε-caprolactone) scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *28*(9), 826–845. https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1303867

De Santis, R., Gloria, A., Russo, T., D'Amora, U., Zeppetelli, S., Dionigi, C., Sytcheva, A., Herrmannsdörfer, T., Dediu, V., & Ambrosio, L. (2011). A basic approach toward the

development of nanocomposite magnetic scaffolds for advanced bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, *122*(6), 3599–3605. https://doi.org/10.1002/app.34771

Deb, P., Deoghare, A. B., Borah, A., Barua, E., & Das Lala, S. (2018). Scaffold Development Using Biomaterials: A Review. *Materials Today: Proceedings*, *5*(5), 12909–12919. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.02.276

Di Lisa, D., Dellacasa, E., & Pastorino, L. (2022). Enzymatic degradation of chitosan scaffold supporting 3D neuronal networks. *Materials Letters*, *308*, 131196. https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.131196

Di Maro, M., Pedraza, R., Mosca Balma, A., Gomez d'Ayala, G., Poggetto, G. D., Malucelli, G., Roato, I., Duraccio, D., Mussano, F., & Faga, M. G. (2024). Influence of Dry-Mixing and Solvent Casting Blending Techniques on the Mechanical and Biological Behavior of Novel Biocompatible Poly(ε-caprolactone)/Alumina-Toughened Zirconia Scaffolds Obtained by 3D Printing. *Journal of Composites Science*, *8*(6), 194. https://doi.org/10.3390/jcs8060194

Domingos, M., Chiellini, F., Cometa, S., De Giglio, E., Grillo-Fernandes, E., Bártolo, P., & Chiellini, E. (2010). Evaluation of in vitro degradation of PCL scaffolds fabricated via BioExtrusion. Part 1: Influence of the degradation environment. *Virtual and Physical Prototyping*, *5*(2), 65–73. https://doi.org/10.1080/17452751003769440

Dong, Z., Fan, C., Deng, W., & Sun, P. (2022). Porous gelatin microsphere-based scaffolds containing MC3T3-E1 cells and calcitriol for the repair of skull defect. *Biomaterials Advances*, *138*, 212964. https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212964

Dong, Z., Meng, X., Yang, W., Zhang, J., Sun, P., Zhang, H., Fang, X., Wang, D.-A., & Fan, C. (2021). Progress of gelatin-based microspheres (GMSs) as delivery vehicles of drug and cell. *Materials Science and Engineering: C*, *122*, 111949. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111949

Donnaloja, F., Jacchetti, E., Soncini, M., & Raimondi, M. T. (2020). Natural and Synthetic Polymers for Bone Scaffolds Optimization. *Polymers*, *12*(4), 905. https://doi.org/10.3390/polym12040905

Dwivedi, R., Kumar, S., Pandey, R., Mahajan, A., Nandana, D., Katti, D. S., & Mehrotra, D. (2020). Polycaprolactone as biomaterial for bone scaffolds: Review of literature. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *10*(1), 381–388. https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.10.003

Ehterami, A., Salehi, M., Farzamfar, S., Vaez, A., Samadian, H., Sahrapeyma, H., Mirzaii, M., Ghorbani, S., & Goodarzi, A. (2018). In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model. *International Journal of Biological Macromolecules*, *117*, 601–609. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.184

Espinel, L. E. M., Castillo, M. M. E., & Espín, V. E. S. (2023). Estado actual de la actividad trasplantológica en el Ecuador. *Metro Ciencia*, *30*(1), 36–50. https://doi.org/10.47464/MetroCiencia/vol31/1/2023/36-50

Fernandez-Yague, M. A., Abbah, S. A., McNamara, L., Zeugolis, D. I., Pandit, A., & Biggs, M. J. (2015). Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicomechanical strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *84*, 1–29. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005

Ferreira, J., Gloria, A., Cometa, S., Coelho, J. F. J., & Domingos, M. (2017). Effect of in Vitro Enzymatic Degradation on 3D Printed Poly(ε-Caprolactone) Scaffolds: Morphological, Chemical and Mechanical Properties. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, *15*(3), 185–195. https://doi.org/10.5301/jabfm.5000363

Filippi, M., Born, G., Chaaban, M., & Scherberich, A. (2020). Natural Polymeric Scaffolds in Bone Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00474

Fourie, J., Taute, F., du Preez, L., & de Beer, D. (2022). Chitosan Composite Biomaterials for Bone Tissue Engineering—a Review. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, *8*(1), 1–21. https://doi.org/10.1007/s40883-020-00187-7

Gautam, S., & Ambwani, S. (2019). Tissue Engineering: New Paradigm of Biomedicine. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, *16*(3), 521–532. https://doi.org/10.13005/bbra/2766

Gholap, A. D., Rojekar, S., Kapare, H. S., Vishwakarma, N., Raikwar, S., Garkal, A., Mehta, T. A., Jadhav, H., Prajapati, M. K., & Annapure, U. (2024). Chitosan scaffolds: Expanding horizons in biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, *323*, 121394. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121394

Gholipour Kanani, A., & Bahrami, S. H. (2011). Effect of Changing Solvents on Poly(-Caprolactone) Nanofibrous Webs Morphology. *Journal of Nanomaterials*, *2011*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2011/724153

Guan, N., Liu, Z., Zhao, Y., Li, Q., & Wang, Y. (2020). Engineered biomaterial strategies for controlling growth factors in tissue engineering. *Drug Delivery*, *27*(1), 1438–1451. https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1831104

Guo, B., & Ma, P. X. (2018). Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, *19*(6), 1764–1782. https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00276

Guo, L., Liang, Z., Yang, L., Du, W., Yu, T., Tang, H., Li, C., & Qiu, H. (2021). The role of natural

polymers in bone tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, *338*, 571–582. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.055

Haslene-Hox, H. (2019). Measuring gradients in body fluids – A tool for elucidating physiological processes, diagnosis and treatment of disease. *Clinica Chimica Acta*, *489*, 233–241. https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.08.029

Idaszek, J., Brynk, T., Jaroszewicz, J., Vanmeert, F., Bruinink, A., & Święszkowski, W. (2017). Investigation of mechanical properties of porous composite scaffolds with tailorable degradation kinetics after in vitro degradation using digital image correlation. *Polymer Composites*, *38*(11), 2402–2410. https://doi.org/10.1002/pc.23825

Iijima, K., & Otsuka, H. (2020). Cell Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, *7*(4). https://doi.org/10.3390/bioengineering7040119

Jeyachandran, D., & Cerruti, M. (2023). Glass, Ceramic, Polymeric, and Composite Scaffolds with Multiscale Porosity for Bone Tissue Engineering. *Advanced Engineering Materials*, *25*(17). https://doi.org/10.1002/adem.202201743

Jo, Y., Hwang, S. H., & Jang, J. (2021). Employing Extracellular Matrix-Based Tissue Engineering Strategies for Age-Dependent Tissue Degenerations. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(17), 9367. https://doi.org/10.3390/ijms22179367

Joglekar, M. M., Ghosh, D., Anandan, D., Yatham, P., Jayant, R. D., Nambiraj, N. A., & Jaiswal, A. K. (2020). Crosslinking of gum-based composite scaffolds for enhanced strength and stability: A comparative study between sodium trimetaphosphate and glutaraldehyde. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, *108*(8), 3147–3154. https://doi.org/10.1002/jbm.b.34640

Kargozar, S., Mozafari, M., Hamzehlou, S., Brouki Milan, P., Kim, H.-W., & Baino, F. (2019). Bone Tissue Engineering Using Human Cells: A Comprehensive Review on Recent Trends, Current Prospects, and Recommendations. *Applied Sciences*, *9*(1), 174. https://doi.org/10.3390/app9010174

Kim, Y., & Kim, G. (2015). Highly roughened polycaprolactone surfaces using oxygen plasma-etching and in vitro mineralization for bone tissue regeneration: Fabrication, characterization, and cellular activities. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *125*, 181–189. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.11.033

Kiran, S., Nune, K. C., & Misra, R. D. K. (2015). The significance of grafting collagen on polycaprolactone composite scaffolds: Processing–structure–functional property relationship. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *103*(9), 2919–2931.

https://doi.org/10.1002/jbm.a.35431

Kokubo, T., & Takadama, H. (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, *27*(15), 2907–2915. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017

Koushik, T. M., Miller, C. M., & Antunes, E. (2023). Bone Tissue Engineering Scaffolds: Function of Multi-Material Hierarchically Structured Scaffolds. *Advanced Healthcare Materials*, *12*(9). https://doi.org/10.1002/adhm.202202766

Krishani, M., Shin, W. Y., Suhaimi, H., & Sambudi, N. S. (2023). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels (Basel, Switzerland)*, *9*(2). https://doi.org/10.3390/gels9020100

Kumar, A., & Jacob, A. (2022). Techniques in scaffold fabrication process for tissue engineering applications: A review. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 163–176. https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100321

Kupiec-Weglinski, J. W. (2022). Grand Challenges in Organ Transplantation. *Frontiers in Transplantation*, *1*. https://doi.org/10.3389/frtra.2022.897679

Kwon, S. G., Kwon, Y. W., Lee, T. W., Park, G. T., & Kim, J. H. (2018). Recent advances in stem cell therapeutics and tissue engineering strategies. *Biomaterials Research*, *22*(1), 36. https://doi.org/10.1186/s40824-018-0148-4

Lee, S. S., Du, X., Kim, I., & Ferguson, S. J. (2022). Scaffolds for bone-tissue engineering. *Matter*, *5*(9), 2722–2759. https://doi.org/10.1016/j.matt.2022.06.003

Liang, X., Qi, Y., Pan, Z., He, Y., Liu, X., Cui, S., & Ding, J. (2018). Design and preparation of quasi-spherical salt particles as water-soluble porogens to fabricate hydrophobic porous scaffolds for tissue engineering and tissue regeneration. *Materials Chemistry Frontiers*, *2*(8), 1539–1553. https://doi.org/10.1039/C8QM00152A

Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *19*(6), 485–502. https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437

Lutzweiler, G., Ndreu Halili, A., & Engin Vrana, N. (2020). The Overview of Porous, Bioactive Scaffolds as Instructive Biomaterials for Tissue Regeneration and Their Clinical Translation. *Pharmaceutics*, *12*(7), 602. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070602

Mad Jin, R., Sultana, N., Baba, S., Hamdan, S., & Ismail, A. F. (2015). Porous PCL/Chitosan and nHA/PCL/Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Fabrication and Evaluation. *Journal of Nanomaterials*, *2015*, 1–8. https://doi.org/10.1155/2015/357372

Melnik, E. V., Shkarina, S. N., Ivlev, S. I., Weinhardt, V., Baumbach, T., Chaikina, M. V., Surmeneva, M. A., & Surmenev, R. A. (2019). In vitro degradation behaviour of hybrid electrospun scaffolds of polycaprolactone and strontium-containing hydroxyapatite microparticles. *Polymer Degradation and Stability*, *167*, 21–32. https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2019.06.017

Moysidou, C.-M., Barberio, C., & Owens, R. M. (2021). Advances in Engineering Human Tissue Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.620962

Murugan, S., & Parcha, S. R. (2021). Fabrication techniques involved in developing the composite scaffolds PCL/HA nanoparticles for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *32*(8), 93. https://doi.org/10.1007/s10856-021-06564-0

Naveen, B. S., Jose, N. T., Krishnan, P., Mohapatra, S., Pendharkar, V., Koh, N. Y. H., Lim, W. Y., & Huang, W. M. (2022). Evolution of Shore Hardness under Uniaxial Tension/Compression in Body-Temperature Programmable Elastic Shape Memory Hybrids. *Polymers*, *14*(22), 4872. https://doi.org/10.3390/polym14224872

Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials*, *4*, 271–292. https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005

Nosrati, H., Aramideh Khouy, R., Nosrati, A., Khodaei, M., Banitalebi-Dehkordi, M., Ashrafi-Dehkordi, K., Sanami, S., & Alizadeh, Z. (2021). Nanocomposite scaffolds for accelerating chronic wound healing by enhancing angiogenesis. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 1. https://doi.org/10.1186/s12951-020-00755-7

Obisesan, O. S., Ajiboye, T. O., Mhlanga, S. D., & Mufhandu, H. T. (2023). Biomedical applications of biodegradable polycaprolactone-functionalized magnetic iron oxides nanoparticles and their polymer nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *227*, 113342. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113342

Oliveira, É. R., Nie, L., Podstawczyk, D., Allahbakhsh, A., Ratnayake, J., Brasil, D. L., & Shavandi, A. (2021). Advances in Growth Factor Delivery for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(2), 903. https://doi.org/10.3390/ijms22020903

Pei, B., Hu, M., Wu, X., Lu, D., Zhang, S., Zhang, L., & Wu, S. (2023). Investigations into the effects of scaffold microstructure on slow-release system with bioactive factors for bone repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1230682

Peng, Z. Y., Shen, Y. Q., & Li, Z. P. (2012). Control of Size and Morphology of Gelatin Microspheres. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, *51*(1), 12–21. https://doi.org/10.1080/00222348.2011.562807

Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2020). Polymer-Based Scaffolds for Soft-Tissue Engineering. *Polymers*, *12*(7), 1566. https://doi.org/10.3390/polym12071566

Perez, J. R., Kouroupis, D., Li, D. J., Best, T. M., Kaplan, L., & Correa, D. (2018). Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00105

Pipattanawarothai, A., Suksai, C., Srisook, K., & Trakulsujaritchok, T. (2017). Non-cytotoxic hybrid bioscaffolds of chitosan-silica: Sol-gel synthesis, characterization and proposed application. *Carbohydrate Polymers*, *178*, 190–199. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.047

Poddar, D., Majood, M., Singh, A., Mohanty, S., & Jain, P. (2021). Chitosan-coated pore wall polycaprolactone three-dimensional porous scaffolds fabricated by porogen leaching method for bone tissue engineering: a comparative study on blending technique to fabricate scaffolds. *Progress in Biomaterials*, *10*(4), 281–297. https://doi.org/10.1007/s40204-021-00172-5

Pontinha, A. D. R., Moreira, B. B., Melo, B. L., Melo-Diogo, D. de, Correia, I. J., & Alves, P. (2023). Silica Aerogel-Polycaprolactone Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(12), 10128. https://doi.org/10.3390/ijms241210128

Ramirez, G. A., Yacoub, M.-R., Ripa, M., Mannina, D., Cariddi, A., Saporiti, N., Ciceri, F., Castagna, A., Colombo, G., & Dagna, L. (2018). Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *BioMed Research International*, *2018*, 1–28. https://doi.org/10.1155/2018/9095275

Reddy, M. S. B., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*, *13*(7), 1105. https://doi.org/10.3390/polym13071105

Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M. M., & Julier, Z. (2020). Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00469

Ressler, A. (2022). Chitosan-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering Applications: A Short Review. *Polymers*, *14*(16), 3430. https://doi.org/10.3390/polym14163430

Rodríguez, I., Fernández-Gutiérrez, M., Rodríguez-Navarrete, A., Rosales-Ibáñez, R., Benito-Garzón, L., Vázquez-Lasa, B., & San Román, J. (2018). Bioactive Sr(II)/Chitosan/Poly(ε-caprolactone) Scaffolds for Craniofacial Tissue Regeneration. In Vitro and In Vivo Behavior. *Polymers*, *10*(3), 279. https://doi.org/10.3390/polym10030279

Ruiz, C., Olivares-Pinto, U., Drew, R. A. L., Aguilar-Reyes, E. A., & Alfonso, I. (2021). Porogen Effect on Structural and Physical Properties of β-TCP Scaffolds for Bone Tissue Regeneration. *IRBM*,

42(5), 302–312. https://doi.org/10.1016/j.irbm.2020.05.007

Santos, V., Ardao, I., Goimil, L., Gomez-Amoza, J. L., & García-González, C. A. (2021). Solvent-Free Processing of Drug-Loaded Poly(ε-Caprolactone) Scaffolds with Tunable Macroporosity by Combination of Supercritical Foaming and Thermal Porogen Leaching. *Polymers*, *13*(1), 159. https://doi.org/10.3390/polym13010159

Schmidt, T., Xiang, Y., Bao, X., & Sun, T. (2021). A Paradigm Shift in Tissue Engineering: From a Top–Down to a Bottom–Up Strategy. *Processes*, *9*(6), 935. https://doi.org/10.3390/pr9060935

Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Dhar Bhatt, V., & Dhot, P. (2019). Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of Medicine and Life*, *12*(3), 225–229. https://doi.org/10.25122/jml-2019-0032

Siddiqui, N., Asawa, S., Birru, B., Baadhe, R., & Rao, S. (2018). PCL-Based Composite Scaffold Matrices for Tissue Engineering Applications. *Molecular Biotechnology*, *60*(7), 506–532. https://doi.org/10.1007/s12033-018-0084-5

Song, J., Li, L., Fang, L., Zhang, E., Zhang, Y., Zhang, Z., Vangari, P., Huang, Y., Tian, F., Zhao, Y., Chen, W., & Xue, J. (2023). Advanced strategies of scaffolds design for bone regeneration. *BMEMat*, *1*(4). https://doi.org/10.1002/bmm2.12046

Su, K., & Wang, C. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters*, *37*(11), 2139–2145. https://doi.org/10.1007/s10529-015-1907-0

Suamte, L., Tirkey, A., & Babu, P. J. (2023). Design of 3D smart scaffolds using natural, synthetic and hybrid derived polymers for skin regenerative applications. *Smart Materials in Medicine*, *4*, 243–256. https://doi.org/10.1016/j.smaim.2022.09.005

Sun, L. P., Wang, S., Zhang, Z. W., Wang, X. Y., & Zhang, Q. Q. (2009). Biological evaluation of collagen–chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. *Biomedical Materials*, *4*(5), 055008. https://doi.org/10.1088/1748-6041/4/5/055008

Tang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Zhang, Y., Li, X., & Yuan, X. (2012). Preparation of PLGA Scaffolds with Graded Pores by Using a Gelatin-Microsphere Template as Porogen. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, *23*(17), 2241–2257. https://doi.org/10.1163/156856211X614185

Thariga, S., Subashini, R., Pavithra, S., Meenachi, P., Kumar, P., Balashanmugam, P., & Senthil Kumar, P. (2019). In vitro evaluation of biodegradable nHAP-Chitosan-Gelatin-based scaffold for tissue engineering application. *IET Nanobiotechnology*, *13*(3), 301–306. https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5204

Wan, Y., Xiao, B., Dalai, S., Cao, X., & Wu, Q. (2009). Development of polycaprolactone/chitosan

blend porous scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *20*(3), 719–724. https://doi.org/10.1007/s10856-008-3622-z

Wang, L., Lu, S., Lam, J., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2015). Fabrication of Cell-Laden Macroporous Biodegradable Hydrogels with Tunable Porosities and Pore Sizes. *Tissue Engineering Part C: Methods*, *21*(3), 263–273. https://doi.org/10.1089/ten.tec.2014.0224

Wang, Z., Wang, Z., Lu, W. W., Zhen, W., Yang, D., & Peng, S. (2017). Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia Materials*, *9*(10), e435–e435. https://doi.org/10.1038/am.2017.171

Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, *35*(10), 1217–1256. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002

Wu, Q., Wang, X., Jiang, F., Zhu, Z., Wen, J., & Jiang, X. (2020). Study of Sr–Ca–Si-based scaffolds for bone regeneration in osteoporotic models. *International Journal of Oral Science*, *12*(1), 25. https://doi.org/10.1038/s41368-020-00094-1

Xu, C., Liu, Z., Chen, X., Gao, Y., Wang, W., Zhuang, X., Zhang, H., & Dong, X. (2024). Bone tissue engineering scaffold materials: Fundamentals, advances, and challenges. *Chinese Chemical Letters*, *35*(2), 109197. https://doi.org/10.1016/j.cclet.2023.109197

Xue, N., Ding, X., Huang, R., Jiang, R., Huang, H., Pan, X., Min, W., Chen, J., Duan, J.-A., Liu, P., & Wang, Y. (2022). Bone Tissue Engineering in the Treatment of Bone Defects. *Pharmaceuticals*, *15*(7), 879. https://doi.org/10.3390/ph15070879

Yang, D., Xiao, J., Wang, B., Li, L., Kong, X., & Liao, J. (2019). The immune reaction and degradation fate of scaffold in cartilage/bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, *104*, 109927. https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109927

Yang, Q., Chen, L., Shen, X., & Tan, Z. (2006). Preparation of Polycaprolactone Tissue Engineering Scaffolds by Improved Solvent Casting/Particulate Leaching Method. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, *45*(6), 1171–1181. https://doi.org/10.1080/00222340600976783

Yazdanian, A., Jahandideh, A., & Hesaraki, S. (2023). The effect of green synthesis of TiO2 nanoparticles/collagen/HA scaffold in bone regeneration: As an animal study. *Veterinary Medicine and Science*, *9*(5), 2342–2351. https://doi.org/10.1002/vms3.1222

Yusof, A. B. A. B. M., Januddi, M. A. F. M. S., Kasim, H. A., Rusli, A. N., Noordin, N. H., & Hamzah, M. N. (2023). Fracture Mechanism Analysis of Bone Scaffold Under Tensile Load: the Effect of Porosity. *Journal of Engineering Science and Technology*, *18*(5), 2254–2268.

Zhao, H., Zhang, X., Zhou, D., Weng, Y., Qin, W., Pan, F., Lv, S., & Zhao, X. (2020). Collagen, polycaprolactone and attapulgite composite scaffolds for in vivo bone repair in rabbit models. *Biomedical Materials*, *15*(4), 045022. https://doi.org/10.1088/1748-605X/ab843f

Zhou, J., Xiong, S., Liu, M., Yang, H., Wei, P., Yi, F., Ouyang, M., Xi, H., Long, Z., Liu, Y., Li, J., Ding, L., & Xiong, L. (2023a). Study on the influence of scaffold morphology and structure on osteogenic performance. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1127162

Zhou, K., Azaman, F. A., Cao, Z., Brennan Fournet, M., & Devine, D. M. (2023b). Bone Tissue Engineering Scaffold Optimisation through Modification of Chitosan/Ceramic Composition. *Macromol*, *3*(2), 326–342. https://doi.org/10.3390/macromol3020021

ANEXOS

Anexo 1

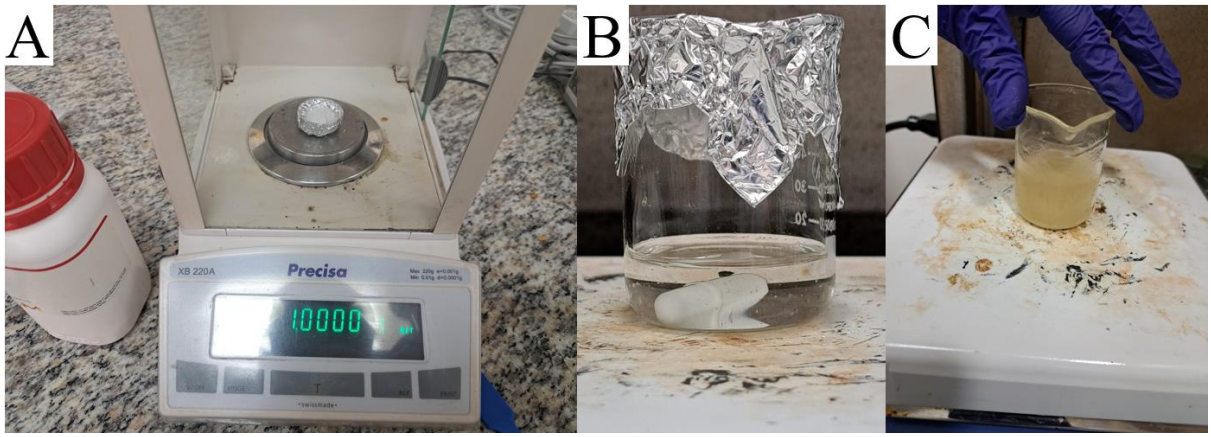
Preparación de microesferas de gelatina



Nota: **A.** Emulsión agua en aceite. **B.** Deshidratación de las microesferas. **C.** Microesferas de gelatina

Anexo 2

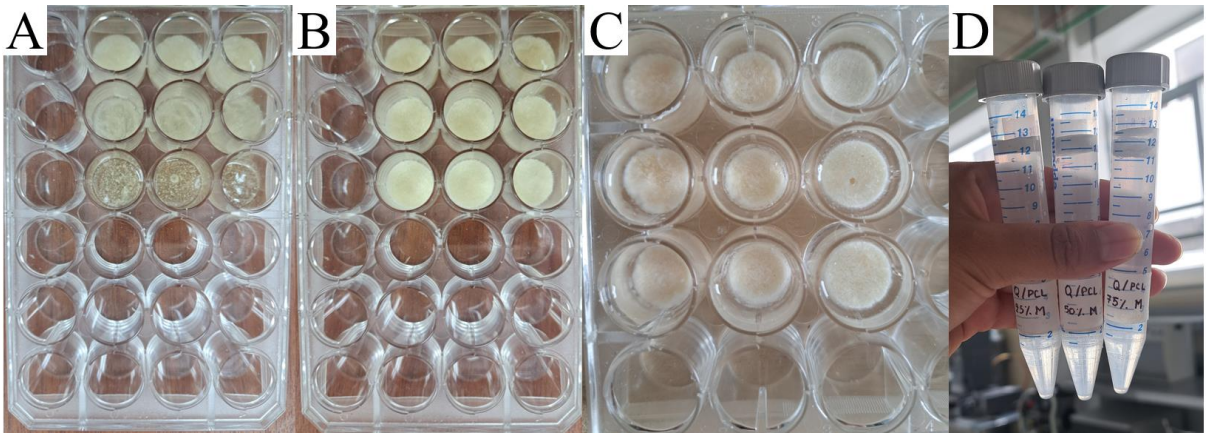
Preparación de las soluciones poliméricas



Nota: **A.** Pesaje de polímeros. **B.** Solución de PCL en ácido acético. **C**. Adición de quitosano

Anexo 3

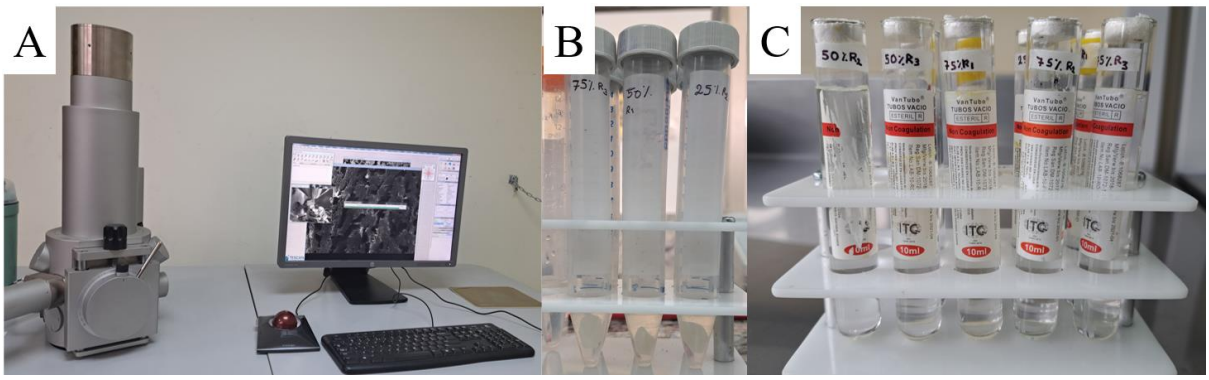
Elaboración de andamios por lixiviación de microesferas



Nota: **A.** **D.** Solución polimérica en placa de 24 pocillos **E.** Evaporación del disolvente. **F, G.** Lixiviación de microesferas

Anexo 4

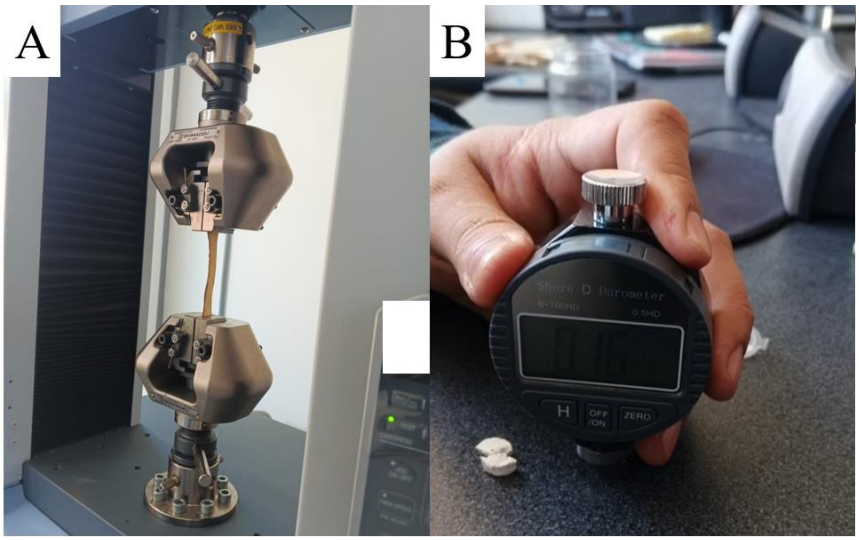
Evaluación de las propiedades morfológicas



Nota: **A.** Evaluación morfológica SEM. **B.** Evaluación de la porosidad. **C.** Evaluación de la tasa de trasmisión del vapor de agua.

Anexo 5

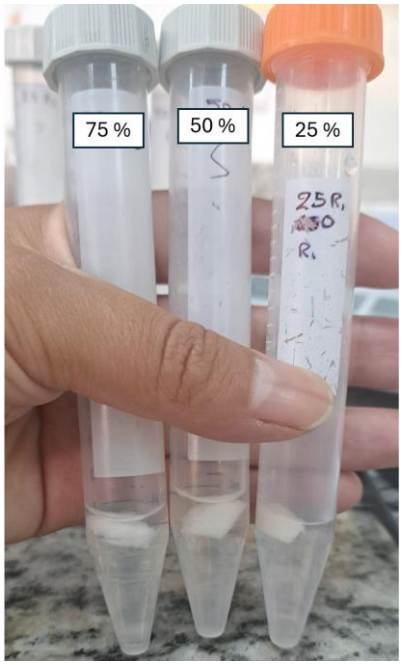
Evaluación de las propiedades mecánicas



Nota: **A** Ensayo de tracción **B.** Ensayo de dureza shore

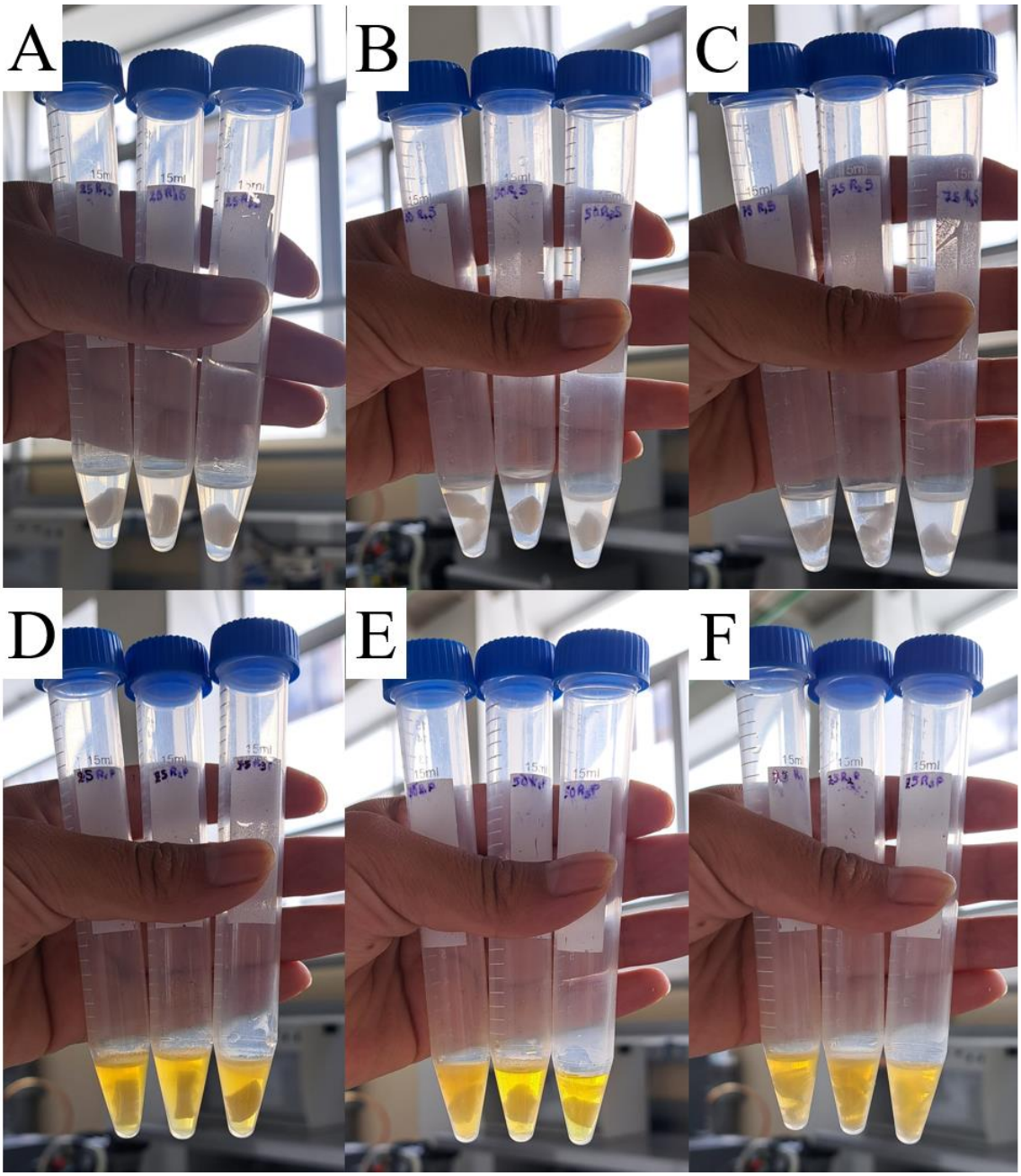
Anexo 6

Evaluación de la capacidad de absorción de agua



Anexo 7

Evaluación de la biodegradabilidad



Nota: **A, B, C.** Evaluación de la biodegradabilidad en SBF. **D, E, F.** Evaluación de la biodegradabilidad en plasma sanguíneo

Anexo 8

Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de porosidad

Andamios	N°	Wseco (mg)	Wfinal (mg)	% de porosidad
Quitosano/PCL - 25% Microesferas	1	0.0990	0.1426	59.5485
	2	0.0967	0.1420	61.0269
	3	0.0853	0.1305	63.9149
Quitosano/PCL - 50% Microesferas	1	0.0603	0.1097	73.2505
	2	0.0749	0.1320	71.8169
	3	0.0770	0.1366	72.1236
Quitosano/PCL - 75% Microesferas	1	0.0634	0.1750	85.4732
	2	0.0613	0.1717	85.7549
	3	0.0665	0.1761	84.6367

Anexo 9

Datos obtenidos para la determinación de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR)

Andamios	N°	Wseco (mg)	Wfinal (mg)	Tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR)
Quitosano/PCL – 25% Microesferas	1	20.9600	20.6910	84.4432
	2	20.6174	20.3474	84.7571
	3	20.9883	20.7148	85.8558
Quitosano/PCL – 50% Microesferas	1	21.5879	21.2223	114.7674
	2	21.5109	21.2152	92.8247
	3	21.3636	21.0031	113.1664
Quitosano/PCL – 15% Microesferas	1	21.3317	20.9853	108.7402
	2	21.2222	20.9246	93.4211
	3	21.4710	20.9951	149.3922

Anexo 10

Datos obtenidos para la determinación de las pruebas mecánicas (ensayo de tracción)

Andamios	N°	Resistencia a la tracción (N/mm2)	Módulo elástico (Kpa)	Deformación (%)

Quitosano/PCL - 25% Microesferas	1	3.9187	193.46	3.6597
	2	5.3281	579.93	1.4191
Quitosano/PCL - 50% Microesferas	1	0.6858	158.08	0.6569
	2	1.4301	270.94	0.6702
Quitosano/PCL - 75% Microesferas	1	1.2321	229.70	0.7676
	2	0.2519	68.81	0.4327

Anexo 11

Datos obtenidos para la determinación de las pruebas mecánicas (dureza shore)

Andamios	**N°**	**Dureza shore**
Quitosano/PCL - 25% microesferas	1	19.50
	2	22.50
	3	22.00
Quitosano/PCL - 50% microesferas	1	16.00
	2	18.00
	3	19.50
Quitosano/PCL - 15% microesferas	1	11.00
	2	10.50
	3	11.00

Anexo 12

Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de capacidad de absorción de agua

Tiempo	**N°**	**Q/PCL - 25% Microesferas**	**Q/PCL - 50% Microesferas**	**Q/PCL - 75% Microesferas**
00:00	1	0.0971	0.0727	0.0746
	2	0.0920	0.0731	0.0531
	3	0.0899	0.0772	0.0611
00:30	1	0.1487	0.1686	0.2221
	2	0.1468	0.1663	0.1806
	3	0.1247	0.1673	0.2002
01:00	1	0.1626	0.1780	0.2311
	2	0.1517	0.1775	0.1811

	3	0.1363	0.1758	0.2049
01:30	1	0.1630	0.1793	0.2324
	2	0.1559	0.1805	0.1825
	3	0.1370	0.1966	0.2089
02:00	1	0.1637	0.1827	0.2331
	2	0.1573	0.1826	0.1877
	3	0.1402	0.1998	0.2092
02:30	1	0.1648	0.1830	0.2445
	2	0.1586	0.1846	0.1919
	3	0.1407	0.2004	0.2121
03:00	1	0.1654	0.1840	0.2448
	2	0.1589	0.1849	0.1923
	3	0.1431	0.2035	0.2145
03:30	1	0.1667	0.1885	0.2528
	2	0.1596	0.1881	0.1924
	3	0.1441	0.2037	0.2193
04:00	1	0.1702	0.1892	0.2561
	2	0.1598	0.1895	0.1929
	3	0.1451	0.2058	0.2209
04:30	1	0.1703	0.1901	0.2629
	2	0.1610	0.1913	0.1936
	3	0.1454	0.2063	0.2230
05:00	1	0.1708	0.1910	0.2648
	2	0.1612	0.1925	0.1954
	3	0.1466	0.2074	0.2241
05:30	1	0.1713	0.1923	0.2715
	2	0.1639	0.1951	0.1984
	3	0.1478	0.2091	0.2246
06:00	1	0.1753	0.2005	0.2744
	2	0.1667	0.2015	0.2014
	3	0.1496	0.2108	0.2308

Porcentaje de absorción de agua

Tiempo	N°	Q/PCL – 25% Microesferas	Q/PCL – 50% Microesferas	Q/PCL – 75% Microesferas
00:00	1	0.00	0.00	0.00
	2	0.00	0.00	0.00
	3	0.00	0.00	0.00
00:30	1	53.14	131.91	197.72
	2	59.57	127.50	240.11
	3	38.71	116.71	227.66
01:00	1	67.46	144.84	209.79
	2	64.89	142.82	241.05
	3	51.61	127.72	235.35
01:30	1	67.87	146.63	211.53
	2	69.46	146.92	243.69
	3	52.39	154.66	241.90
02:00	1	68.59	151.31	212.47
	2	70.98	149.79	253.48
	3	55.95	158.81	242.39
02:30	1	69.72	151.72	227.75
	2	72.39	152.53	261.39
	3	56.51	159.59	247.14
03:00	1	70.34	153.09	228.15
	2	72.72	152.94	262.15
	3	59.18	163.60	251.06
03:30	1	71.68	159.28	238.87
	2	73.48	157.32	262.34
	3	60.29	163.86	258.92
04:00	1	75.28	160.25	243.30
	2	73.70	159.23	263.28
	3	61.40	166.58	261.54
04:30	1	75.39	161.49	252.41
	2	75.00	161.70	264.60
	3	61.74	167.23	264.98
05:00	1	75.90	162.72	254.96
	2	75.22	163.34	267.98

	3	63.07	168.65	266.78
05:30	1	76.42	164.51	263.94
	2	78.15	166.89	273.63
	3	64.40	170.85	267.59
06:00	1	80.54	175.79	267.83
	2	81.20	175.65	279.28
	3	66.41	173.06	277.74

Promedio del porcentaje de absorción de agua

Tiempo	**Q/PCL - 25% Microesferas**	**Q/PCL - 50% Microesferas**	**Q/PCL - 75% Microesferas**
00:00	0.00	0.00	0.00
00:30	50.47	125.37	221.83
01:00	61.32	138.46	228.73
01:30	63.24	149.41	232.37
02:00	65.17	153.30	236.11
02:30	66.21	154.61	245.43
03:00	67.41	156.55	247.12
03:30	68.48	160.15	253.38
04:00	70.13	162.02	256.04
04:30	70.71	163.47	260.66
05:00	71.40	164.90	263.24
05:30	72.99	167.42	268.39
06:00	76.05	174.83	274.95

Anexo 13

Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de biodegradabilidad en SBF

Tiempo	**N°**	**Q/PCL-25% Microesferas**	**Q/PCL-50% Microesferas**	**Q/PCL-75% Microesferas**
Día 0	1	0.0972	0.0817	0.0696
	2	0.0965	0.0792	0.0659
	3	0.0971	0.0871	0.0667

Día 6	1	0.1827	0.1604	0.1304
	2	0.1807	0.1569	0.1243
	3	0.1803	0.1709	0.1253
Día 12	1	0.1759	0.1545	0.1157
	2	0.1719	0.1444	0.1097
	3	0.1741	0.1667	0.1075
Día 16	1	0.1523	0.1258	0.0916
	2	0.1516	0.1251	0.0842
	3	0.1519	0.1456	0.0878
Día 22	1	0.1413	0.1075	0.0733
	2	0.1362	0.1058	0.0673
	3	0.1398	0.1242	0.0689
Día 29	1	0.1333	0.0991	0.0517
	2	0.1311	0.0975	0.0413
	3	0.1345	0.1171	0.0466

Porcentaje de biodegradabilidad en SBF

Tiempo	**N°**	**Q/PCL-25% Microesferas**	**Q/PCL-50% Microesferas**	**Q/PCL-75% Microesferas**
Día 0	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
Día 6	1	-87.96	-96.33	-87.36
	2	-87.25	-98.11	-88.62
	3	-85.68	-96.21	-87.86
Día 12	1	-80.97	-89.11	-66.24
	2	-78.13	-82.32	-66.46
	3	-79.30	-91.39	-61.17
Día 16	1	-56.69	-53.98	-31.61
	2	-57.10	-57.95	-27.77
	3	-56.44	-67.16	-31.63
Día 22	1	-45.37	-31.58	-5.32
	2	-41.14	-33.52	-2.12
	3	-43.98	-42.59	-3.30

Día 29	1	-37.14	-21.30	25.72
	2	-35.85	-23.11	37.33
	3	-38.52	-34.44	30.21

Promedio del porcentaje de biodegradabilidad en SBF

Tiempo	Q/PCL-25% Microesferas	Q/PCL-50% Microesferas	Q/PCL-75% Microesferas
Día 0	0	0	0
Día 6	-86.97	-96.88	-87.94
Día 12	-79.47	-87.61	-64.62
Día 16	-56.74	-59.70	-30.34
Día 22	-43.50	-35.90	-3.58
Día 29	-37.17	-26.28	31.09

Anexo 14

Datos obtenidos para la determinación del porcentaje de biodegradabilidad en plasma sanguíneo

Tiempo	N°	Q/PCL-25% Microesferas	Q/PCL-50% Microesferas	Q/PCL-75% Microesferas
Día 0	1	0.0921	0.0791	0.0693
	2	0.0955	0.0732	0.0738
	3	0.0891	0.0640	0.0674
Día 6	1	0.1520	0.1376	0.1140
	2	0.1565	0.1336	0.1214
	3	0.1481	0.1235	0.1127
Día 12	1	0.1411	0.1272	0.0993
	2	0.1425	0.1234	0.1011
	3	0.1390	0.1171	0.0918
Día 16	1	0.1319	0.1178	0.0728
	2	0.1356	0.1153	0.0809
	3	0.1277	0.1077	0.0716
Día 22	1	0.1229	0.0944	0.0467
	2	0.1284	0.0978	0.0553
	3	0.1141	0.0851	0.0446
Día 29	1	0.1118	0.0841	0.0258

	2	0.1186	0.088	0.0381
	3	0.1067	0.0713	0.0323

Porcentaje de biodegradabilidad en plasma sanguíneo

Tiempo	**N°**	**Q/PCL-25% Microesferas**	**Q/PCL-50% Microesferas**	**Q/PCL-75% Microesferas**
Día 0	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
Día 6	1	-65.04	-73.96	-64.50
	2	-63.87	-82.51	-64.50
	3	-66.22	-92.97	-67.21
Día 12	1	-53.20	-60.81	-43.29
	2	-49.21	-68.58	-36.99
	3	-56.00	-82.97	-36.20
Día 16	1	-43.21	-48.93	-5.05
	2	-41.99	-57.51	-9.62
	3	-43.32	-68.28	-6.23
Día 22	1	-33.44	-19.34	32.61
	2	-34.45	-33.61	25.07
	3	-28.06	-32.97	33.83
Día 29	1	-21.39	-6.32	62.77
	2	-24.19	-20.22	48.37
	3	-19.75	-11.41	52.08

Promedio del porcentaje de biodegradabilidad en Plasma sanguíneo

Tiempo	**Q/PCL-25% Microesferas**	**Q/PCL-50% Microesferas**	**Q/PCL-75% Microesferas**
Día 0	0	0	0
Día 6	-65.04	-83.15	-65.40
Día 12	-52.81	-70.79	-38.83
Día 16	-42.84	-58.24	-6.97
Día 22	-31.98	-28.64	30.50
Día 29	-21.78	-12.65	54.41

Anexo 15

Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la porosidad

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	851.04	425.518	218.59	0.000
Error	6	11.68	1.947		
Total	8	862.72			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% Microesferas	3	61.50	2.22	(59.53, 63.47)
ABs Q/PCL-50% Microesferas	3	72.40	0.75	(70.426, 74.368)
ABs Q/PCL-75% Microesferas	3	85.29	0.58	(83.317, 87.259)

Comparaciones en parejas de Fisher

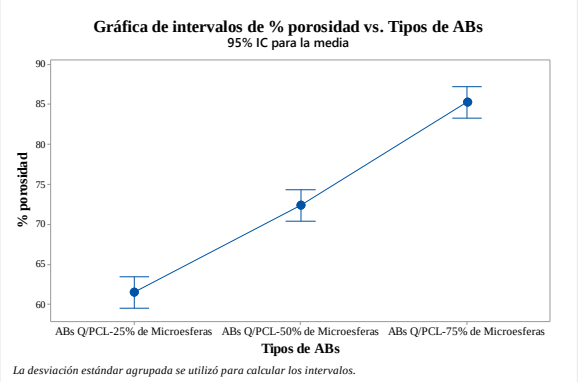
Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

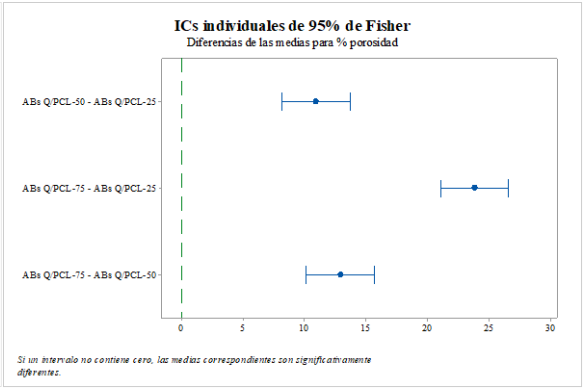
Tipos de ABs	N	Media	Agrupación		
ABs Q/PCL-75% Microesferas	3	85.29	A		
ABs Q/PCL-50% Microesferas	3	72.40		B	
ABs Q/PCL-25% Microesferas	3	61.50			C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	10.90	1.14	(8.11, 13.69)	9.57	0.000
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	23.79	1.14	(21.00, 26.58)	20.88	0.000
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	12.89	1.14	(10.10, 15.68)	11.32	0.000





Anexo 16

Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la tasa de transmisión de vapor de agua (WVTR)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	1620	809.8	2.46	0.166
Error	6	1974	329.0		
Total	8	3593			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% Microesferas	3	85.02	0.74	(59.396, 110.641)
ABs Q/PCL-50% Microesferas	3	106.92	12.23	(81.30, 132.54)
ABs Q/PCL-75% Microesferas	3	117.18	28.93	(91.6, 142.8)

Comparaciones en parejas de Fisher

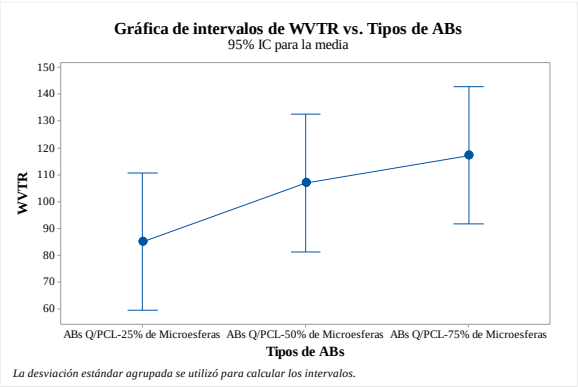
Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

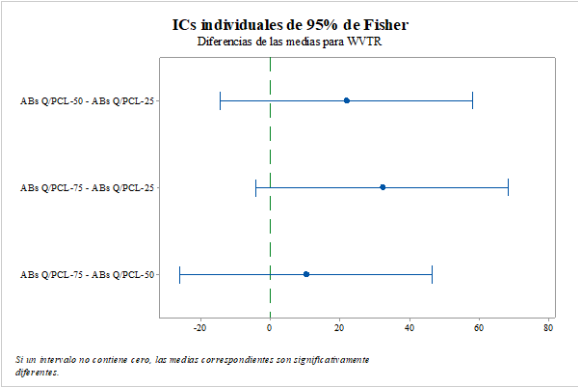
Tipos de ABs	N	Media	Agrupación
ABs Q/PCL-75% Microesferas	3	117.18	A
ABs Q/PCL-50% Microesferas	3	106.92	A
ABs Q/PCL-25% Microesferas	3	85.02	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	21.9	14.8	(-14.3, 58.1)	1.48	0.190
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	32.2	14.8	(-4.1, 68.4)	2.17	0.073
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	10.3	14.8	(-26.0, 46.5)	0.69	0.514





Anexo 17

Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de las propiedades mecánicas (ensayo de tracción)

Análisis de Varianza-Resistencia a la tracción

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	18.585	9.2927	15.92	0.025
Error	3	1.751	0.5836		
Total	5	20.336			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% Microesferas	2	4.62	1.00	(2.904, 6.342)
ABs Q/PCL-50% Microesferas	2	1.06	0.53	(-0.661, 2.777)
ABs Q/PCL-75% Microesferas	2	0.74	0.69	(-0.977, 2.461)

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

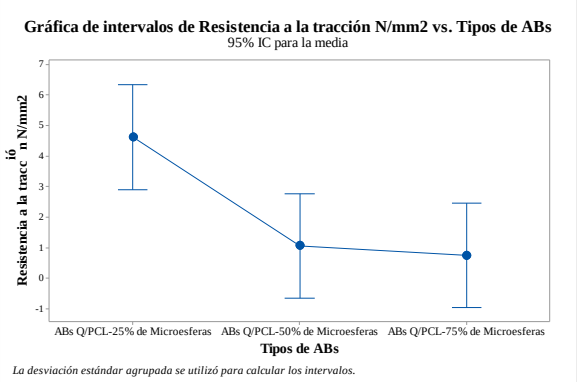
Tipos de ABs	N	Media	Agrupación
ABs Q/PCL-75% Microesferas	2	4.62	A
ABs Q/PCL-50% Microesferas	2	1.06	B
ABs Q/PCL-25% Microesferas	2	0.74	B

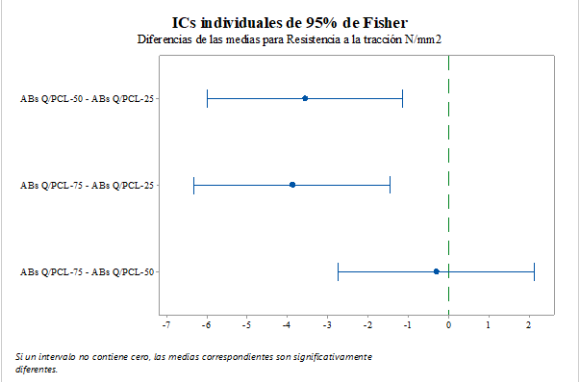
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tipos de ABs	N	Media	Agrupación
ABs Q/PCL-25% de Microesferas	2	4.62	A
ABs Q/PCL-50% de Microesferas	2	1.06	B
ABs Q/PCL-75% de Microesferas	2	0.74	B

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	-3.565	0.764	(-5.997, -1.134)	-4.67	0.019
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	-3.881	0.764	(-6.313, -1.450)	-5.08	0.015
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	-0.316	0.764	(-2.747, 2.115)	-0.41	0.707





Análisis de Varianza-Módulo de elasticidad

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	60189	30095	0.96	0.476
Error	3	93991	31330		
Total	5	154180			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% de Microesferas	2	386.70	273.28	(-12, 785)
ABs Q/PCL-50% de Microesferas	2	214.51	79.80	(-183.8, 612.8)
ABs Q/PCL-75% de Microesferas	2	149.26	113.77	(-249.1, 547.6)

Comparaciones en parejas de Fisher

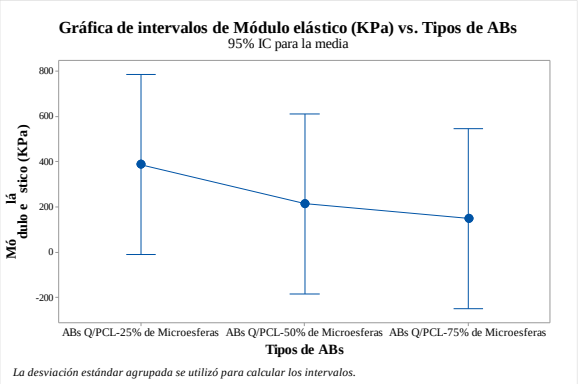
Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

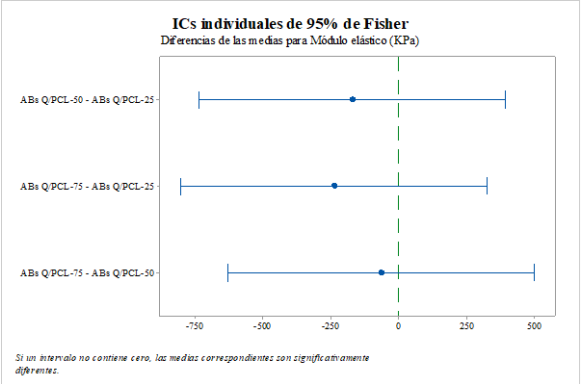
Tipos de ABs	N	Media	Agrupación
ABs Q/PCL-25% de Microesferas	2	386.70	A
ABs Q/PCL-50% de Microesferas	2	214.51	A
ABs Q/PCL-75% de Microesferas	2	149.26	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	-172	177	(-735, 391)	-0.97	0.402
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	-237	177	(-801, 326)	-1.34	0.272
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	-65	177	(-629, 498)	-0.37	0.737





Análisis de Varianza-Deformación

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	4.856	2.4280	2.84	0.203
Error	3	2.566	0.8554		
Total	5	7.422			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% Microesferas	2	2.54	1.58	(0.46, 4.62)
ABs Q/PCL-50% Microesferas	2	0.66	0.01	(-1.41779, 2.74486)
ABs Q/PCL-75%Microesferas	2	0.60	0.24	(-1.481, 2.681)

Comparaciones en parejas de Fisher

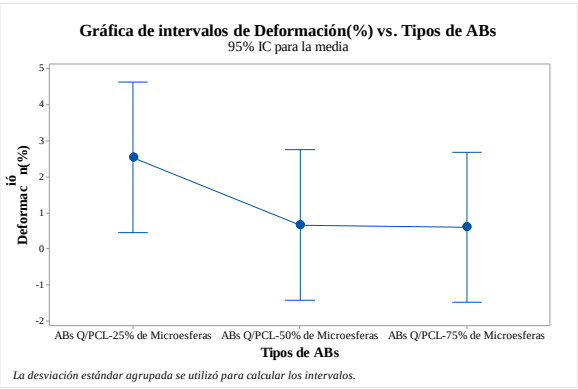
Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

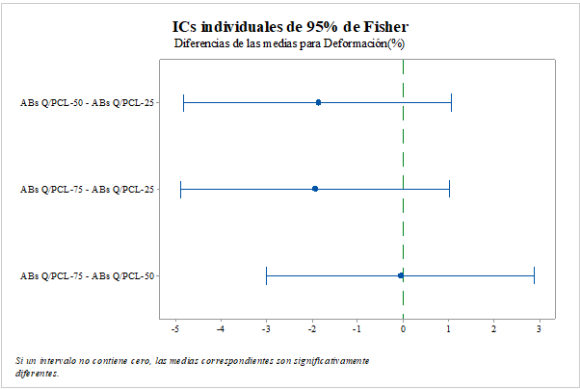
Tipos de ABs	N	Media	Agrupación
ABs Q/PCL-25% Microesferas	2	2.54	A
ABs Q/PCL-50% Microesferas	2	0.66	A
ABs Q/PCL-75% Microesferas	2	0.60	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	-1.876	0.925	(-4.819, 1.068)	-2.03	0.136
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	-1.939	0.925	(-4.883, 1.004)	-2.10	0.127
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	-0.063	0.925	(-3.007, 2.880)	-0.07	0.950





Anexo 18

Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de las propiedades mecánicas (dureza shore)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p

Tipos de ABs	2	171.50	85.750	44.74	0.000
Error	6	11.50	1.917		
Total	8	183.00			

Medias

Tipos de ABs	**N**	**Media**	**Desv.Est.**	**IC de 95%**
ABs Q/PCL-25% de Microesferas	3	21.33	1.61	(19.378, 23.289)
ABs Q/PCL-50% de Microesferas	3	17.83	1.76	(15.88, 19.79)
ABs Q/PCL-75% de Microesferas	3	10.83	0.29	(8.878, 12.789)

Comparaciones en parejas de Fisher

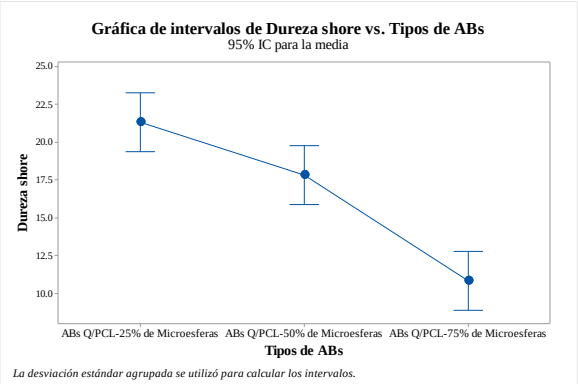
Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

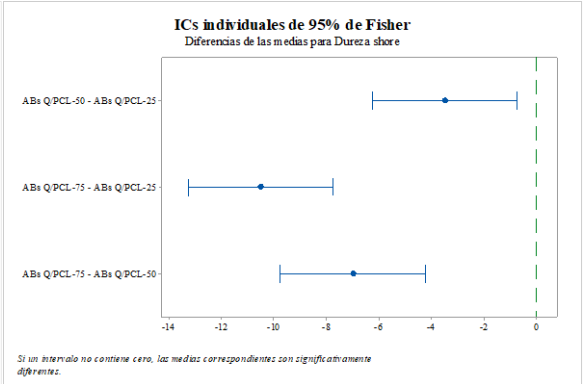
Tipos de ABs	**N**	**Media**	**Agrupación**
ABs Q/PCL-25% de Microesferas	3	21.33	A
ABs Q/PCL-50% de Microesferas	3	17.83	B
ABs Q/PCL-75% de Microesferas	3	10.83	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	**Diferencia de las medias**	**EE de diferencia**	**IC de 95%**	**Valor T**	**Valor p ajustado**
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	-3.50	1.13	(-6.27, -0.73)	-3.10	0.021
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	-10.50	1.13	(-13.27, -7.73)	-9.29	0.000
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	-7.00	1.13	(-9.77, -4.23)	-6.19	0.001





Anexo 19

Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la capacidad de absorción de agua

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	198904	99451.8	594.19	0.000
Error	33	5523	167.4		
Total	35	204427			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% Microesferas	12	66.96	6.65	(59.37, 74.56)
ABs Q/PCL-50% Microesferas	12	155.88	13.39	(148.28, 163.47)
ABs Q/PCL-75% Microesferas	12	249.02	16.69	(241.42, 256.62)

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

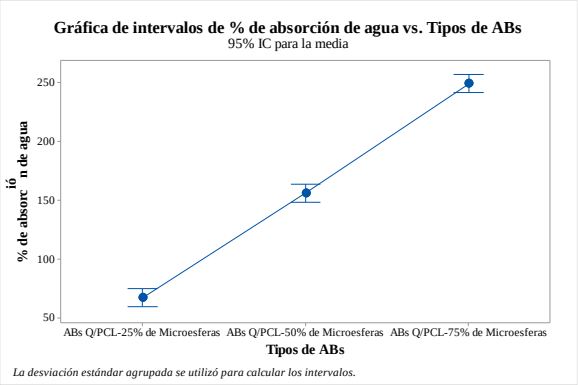
Tipos de ABs	N	Media	Agrupación		
ABs Q/PCL-75% Microesferas	12	249.02	A		
ABs Q/PCL-50% Microesferas	12	155.88		B	
ABs Q/PCL-25% Microesferas	12	66.96			C

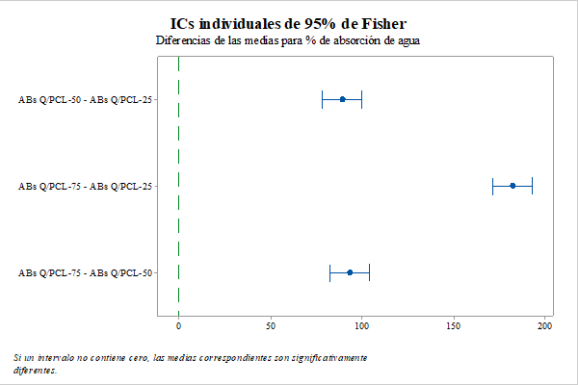
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	88.91	5.28	(78.17, 99.66)	16.83	0.000
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	182.06	5.28	(171.31, 192.80)	34.47	0.000

ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	93.15	5.28	(82.40, 103.89)	17.64	0.000





Anexo 20

Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la biodegradabilidad en SBF

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	2989	1494	1.22	0.330
Error	12	14720	1227		
Total	14	17709			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% Microesferas	5	-60.77	21.84	(-94.89, -26.64)
ABs Q/PCL-50% Microesferas	5	-61.27	30.95	(-95.4, -27.1)
ABs Q/PCL-75% Microesferas	5	-31.08	47.38	(-65.2, 3.0)

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

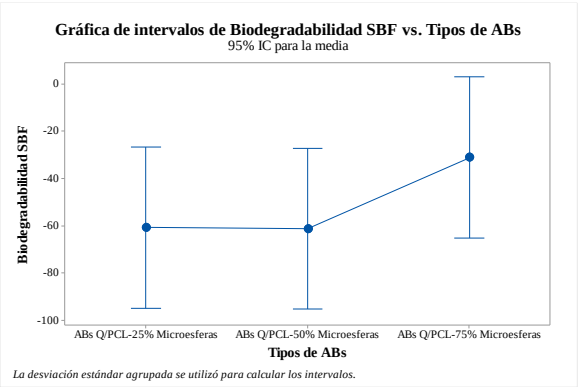
Tipos de ABs	N	Media	Agrupación

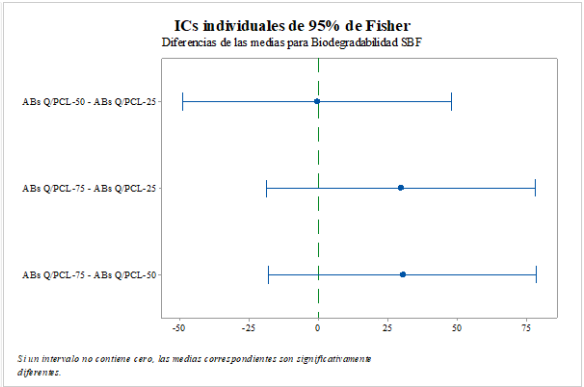
ABs Q/PCL-75% Microesferas	5	-31.08	A
ABs Q/PCL-25% Microesferas	5	-60.77	A
ABs Q/PCL-50% Microesferas	5	-61.27	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	-0.5	22.2	(-48.8, 47.8)	-0.02	0.982
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	29.7	22.2	(-18.6, 78.0)	1.34	0.205
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	30.2	22.2	(-18.1, 78.5)	1.36	0.198





Anexo 21

Análisis estadístico ANOVA-Comparación de medias de la biodegradabilidad en plasma sanguíneo

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tipos de ABs	2	5902	2951	2.50	0.124
Error	12	14188	1182		
Total	14	20090			

Medias

Tipos de ABs	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
ABs Q/PCL-25% Microesferas	5	-42.89	16.98	(-76.39, -9.39)
ABs Q/PCL-50% Microesferas	5	-50.69	29.26	(-84.2, -17.2)
ABs Q/PCL-75% Microesferas	5	-5.26	48.95	(-38.8, 28.2)

Comparaciones en parejas de Fisher

Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Tipos de ABs	N	Media	Agrupación
ABs Q/PCL-75% Microesferas	5	-5.26	A
ABs Q/PCL-25% Microesferas	5	-42.89	A
ABs Q/PCL-50% Microesferas	5	-50.26	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
ABs Q/PCL-50 - ABs Q/PCL-25	-7.8	21.7	(-55.2, 39.6)	-0.36	0.726
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-25	37.6	21.7	(-9.7, 85.0)	1.73	0.109
ABs Q/PCL-75 - ABs Q/PCL-50	45.4	21.7	(-1.9, 92.8)	2.09	0.059

