



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA
EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Tema: Extracción de nanocelulosa vegetal a partir de residuos de banano (*Musa paradisiaca*) y su aplicación en andamios biológicos.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyectos 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.

Autor: Kimberlyn Carolina Núñez Martínez

Tutor: PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

Ambato – Ecuador

Febrero – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

CERTIFICA

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza 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 titulación y Grados de la Facultad de Ciencias en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 15 de enero de 2024

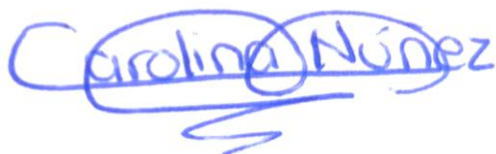
.....
PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

C. I. 1804256905

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Kimberlyn Carolina Núñez Martínez, manifiesto que los resultados obtenidos en el Informe Final del Trabajo de Titulación, opción proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Kimberlyn Carolina Núñez Martínez


C.I. 1850417260

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.



.....
Kimberlyn Carolina Núñez Martínez

C.I. 1850417260

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNLA 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

.....

Presidente del tribunal

.....

PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I. 1754784864

.....

Msc. Ruth Narcisa Pérez Salinas

C.I. 1802726628

Ambato, 05 de enero 2024

DEDICATORIA

Lograrlo con miedo es lograrlo dos veces. - Cuando tu mente juega en contra de lo que realmente quieres hacer y a pesar del miedo aun así lo intentas, es la forma más valiente de demostrarte a ti mismo que eres capaz de muchas cosas.

Dedico mi esfuerzo, las noches de desvelo, mis días de felicidad y tristeza, mis sueños y mi trabajo constante:

A mis padres y hermano, quienes con su amor y apoyo me han dado la fuerza para conseguir lo que me propongo. En los momentos difíciles, siempre un abrazo y un te amo para impulsarme a seguir por mi sueño.

A mis tíos y primos que siempre han estado pendientes y dándome palabras de aliento para no rendirme.

A mis ángeles en el cielo, que nunca me han desamparado y han iluminado mi camino.

A mis amigos que, con su apoyo, risas, consejos han estado junto a mi durante este proceso.

A mí mismo, porque a pesar de los obstáculos y las circunstancias por las que he atravesado, me he llenado de valor cada día para levantarme y continuar luchando contra mis miedos y así demostrarme que soy más valiente de lo que realmente pienso.

Es válido rompernos varias veces.

Podemos llorar y gritar las veces que sean necesarias para liberar el dolor.

Sin embargo, lo que nunca debemos permitir es rendirnos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la vida, que me ha dado tanto.....

Agradezco a mis padres (Bolívar y Carmita) y a mi hermano (Alejandro) por su apoyo y amor infaltable. Por ser mi refugio y mi calma. Por siempre velar por mi felicidad. Son mi fuerza y mi inspiración para seguir adelante.

Agradezco a mi familia, principalmente a Gloria y Danilo, que de una u otra forma siempre me han apoyado, han estado pendientes de mí, me han dado consejos y lo fundamental su cariño.

Agradezco a mi tutora PhD. Lorena Núñez, por haberme aceptado como su tesista y confiar en mí. Gracias por su guía, apoyo, paciencia, tiempo y consejos no solo para la vida profesional. Es para mí un ser de inspiración, gracias de corazón. A los docentes PhD. Irving Tubón, PhD, Orestes López, Ing Giovanny Freire, Ing Carla Peñafiel, PhD Mario García, PhD Liliana Cerda: gracias por su ayuda, consejos y paciencia. Estuvieron dispuestos a ayudarme con materiales, reactivos, uso de equipos y recomendaciones para mejorar mi trabajo. Gracias por su ayuda sin esperar nada a cambio, por su disponibilidad y por esa voluntad para compartir sus conocimientos con los estudiantes.

Agradezco a mi psicóloga por ayudarme a encontrar la paz y a entender el porqué de tantas cosas, gracias por su ayuda para poder reencontrarme.

Agradezco a mis amigos que han estado junto a mí desde el comienzo: Cynthia², Mela y Licha, gracias por cada momento, risotada, anécdota y apoyo. También a Shir, Fer, Juanito N, Mateo Z, Juanito C, Eder, Josu L, Josu C, Alexis C y Joss, personas que la vida puso en mi camino para darle luz y mucha alegría. Cada uno tiene su esencia y personalidad que los hace muy especiales y únicos. A su lado he podido aprender mucho más. Gracias por sus consejos, por esperarme para ir almuerzo, por las humillaciones. Les quiero mucho a todos.

Tantas personas por agradecer y tanto por decir. Mi corazón está llenito por cada ser que me ha brindado su cariño. Nunca dejen de brillar.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNLA DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS	xii
ÍNDICE GENERAL DE TABLAS.....	xiii
INDICE DE ANEXOS.....	xiv
GLOSARIO	xv
RESUMEN EJECUTIVO	xvi
ABSTRACT.....	xvii
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	3
1.1.3. Componentes necesarios para la ingeniería de tejidos.....	4
1.1.3.1. Células	4
1.1.3.2. Factores de crecimiento	5
1.1.3.3. Andamios biológicos (scaffolds)	5
1.1.4. Propiedades requeridas en los andamios biológicos	6
1.1.5. Biomateriales para la elaboración de andamios biológicos	8
1.1.5.1. Biopolímeros sintéticos.....	9
1.1.5.2. Biopolímeros naturales	9

1.1.6.	Extracción de nanocelulosa a partir de residuos de banano para su aplicación como biomaterial en la elaboración de andamios biológicos.....	10
1.1.6.1.	Residuos de banano	11
1.1.6.2.	Biomasa lignocelulósica	11
1.1.7.	Métodos de extracción de nanocelulosa.....	13
1.1.8.	Métodos para la elaboración de andamios biológicos.....	14
1.1.8.1.	Métodos convencionales.....	15
	Liofilización	15
1.1.8.2.	Métodos avanzados.....	16
1.2.	Objetivos	17
1.2.1.	Objetivo General.....	17
1.2.2.	Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA.....		18
2.1.	Materiales	18
2.1.1.	Reactivos.....	18
2.1.2.	Material fungible.....	18
2.1.3.	Equipos de laboratorio	19
2.2.	Métodos	20
2.2.1.	Caracterización de la nanocelulosa vegetal obtenida mediante pruebas morfológicas	20
2.2.1.1.	Obtención del residuo del banano (<i>Musa paradisiaca</i>)	20
2.2.1.2.	Preparación del residuo vegetal	20
2.2.1.3.	Extracción de celulosa vegetal	20
2.2.1.4.	Extracción de nanocelulosa mediante hidrólisis ácida combinada de ultrasonidos	21
2.2.1.5.	Apariencia de las fibras de nanocelulosa	21
2.2.1.6.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	22

2.2.1.7. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	22
2.2.2. Elaboración de un andamio biológico a partir de nanocelulosa vegetal mediante liofilización	22
2.2.2.1. Preparación de solución de nanocelulosa con quitosano para la liofilización	22
2.2.2.2. Formación de andamios biológicos por liofilización.....	23
2.2.3. Evaluación de los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y biológicas	23
2.2.3.1. Evaluación morfológica	23
2.2.3.2. Evaluación de la porosidad	23
2.2.3.3. Evaluación de capacidad de absorción de agua	24
2.2.3.4. Evaluación de biodegradabilidad	24
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
3.1. Análisis de resultados	25
3.1.1. Caracterización de la nanocelulosa vegetal obtenida mediante pruebas morfológicas	25
y físicas	25
3.1.1.1. Rendimiento de la nanocelulosa.....	25
3.1.1.2. Apariencia de las fibras de nanocelulosa	27
3.1.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	29
3.1.1.4. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	30
3.1.2. Elaboración de un andamio biológico a partir de nanocelulosa vegetal mediante liofilización	34
3.1.3. Evaluación de los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y biológicas	36
3.1.3.1. Evaluación morfológica de andamios biológicos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	37
3.1.3.2. Evaluación de la porosidad	43

3.1.3.4. Evaluación de la biodegradabilidad	49
CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	53
4.1. Conclusiones	53
4.2. Recomendaciones	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	75

ÍNDICE GENERAL DE FIGURAS

Figura 1. Principales componentes de la biomasa lignocelulósica.	12
Figura 2. Apariencia de fibras mediante microscopio de luz invertida 10x.	28
Figura 3. Micrografía del análisis SEM de celulosa obtenida del residuo del banano.	29
Figura 4. Micrografía del análisis SEM de nanocelulosa obtenida del residuo del banano.	30
Figura 5. Resultado de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de celulosa comercial, y celulosa y nanocelulosa extraída de residuos de banano.....	32
Figura 6. ABs elaborados por liofilización.	36
Figura 7. Evaluación morfológica de los ABs de nanocelulosa liofilizados.	38
Figura 8. Evaluación morfológica de los ABs de quitosano liofilizados.....	39
Figura 9. Evaluación morfológica de los ABs de nanocelulosa/quitosano liofilizados.	41
Figura 10. Porcentaje de porosidad de los andamios biológicos liofilizados.	44
Figura 11. Porcentaje de la capacidad de absorción de agua de los ABs.	47
Figura 12. Biodegradabilidad de los ABs por días.	50

ÍNDICE GENERAL DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de humedad en el residuo vegetal.	25
Tabla 2. Pesos finales del material vegetal después de cada tratamiento.	26
Tabla 3. Rendimiento en la obtención de nanocelulosa vegetal.	27

INDICE DE ANEXOS

ANEXO A. Pretratamiento del material vegetal.	75
ANEXO B. Extracción de celulosa.	76
ANEXO C. Extracción de nanocelulosa vegetal.	77
ANEXO D. Elaboración de andamios biológicos.	78
ANEXO E. Evaluación de la porosidad de los andamios.	78
ANEXO F. Evaluación de la capacidad de absorción de agua de los andamios.	79
ANEXO G. Evaluación de la biodegradabilidad de los andamios.	79
ANEXO H. Tablas con datos obtenidos para las pruebas morfológicas y biológicas.	80
ANEXO I. Análisis estadístico.	86

GLOSARIO

AB: Andamio biológico

ABs: Andamios biológicos

IT: Ingeniería de tejidos

ECM: Matriz extracelular

ESC: Células madre embrionarias

MSC: Células madre mesenquimales

iPSC: Células madre pluripotentes inducidas

GF: Factores de crecimiento

SEM: Microscopía electrónica de barrido

FT-IR: Espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier

PBS: Tampón fosfato sódico

RESUMEN EJECUTIVO

El proceso de cicatrización de heridas es altamente complejo y alteraciones en su ruta pueden provocar escenarios severos con alto costo económico. La ingeniería de tejidos (IT) combina células, andamios y factores de crecimiento para dar lugar a nuevos tejidos. Los andamios funcionan como soporte para el crecimiento celular y se fabrican con biopolímeros sintéticos o naturales. La nanocelulosa es un polímero natural que puede obtenerse de fuentes renovables como los residuos del banano. Este estudio se centró en la extracción de nanocelulosa de residuos del banano para su aplicación en andamios biológicos para futuras investigaciones en la curación de heridas crónicas.

La nanocelulosa de banano se extrajo mediante hidrólisis con ácido sulfúrico y ultrasonidos. Su morfología se evaluó mediante microscopía de luz invertida y SEM. Además, los principales grupos funcionales presentes en la nanocelulosa se analizaron mediante FTIR. Posteriormente, se elaboró andamios de nanocelulosa, quitosano y nanocelulosa con quitosano mediante liofilización para evaluar las características de la nanocelulosa frente a otros biopolímeros. La caracterización de los andamios incluyó microscopía SEM, pruebas de porosidad, capacidad de absorción de agua y biodegradabilidad.

Se obtuvo un rendimiento del 23.8 por ciento de nanocelulosa extraída. Los andamios compuestos por nanocelulosa y quitosano mostraron mejores resultados con un tamaño promedio de poro de 110.13 micrómetros con 88.94 por ciento de porosidad, una absorción de 2418.33 por ciento y degradación en 16 días. Los resultados sugieren que estos andamios tienen potencial para investigación en IT relacionadas con la cicatrización de heridas y regeneración de tejidos.

Palabras clave: residuos agroindustriales, banano, nanocelulosa,, biopolímeros naturales, andamios biológicos, ingeniería de tejidos, porosidad, biodegradabilidad

ABSTRACT

The wound healing process is highly complex and alterations in its pathway can cause severe scenarios with high economic cost. Tissue Engineering (TE) combines cells, scaffolds, and growth factors to give rise to new tissue. Scaffolds function as a support for cell growth and are fabricated with synthetic or natural biopolymers. Nanocellulose is a natural polymer that can be obtained from renewable sources, such as banana waste. This study focused on the extraction of nanocellulose from banana waste and its subsequent application in the fabrication of biological scaffolds for future research in the healing of chronic wounds.

Banana nanocellulose was extracted by hydrolysis with sulfuric acid and ultrasound. Its morphology was evaluated by inverted light microscopy and SEM. In addition, the main functional groups present in nanocellulose were analyzed by FTIR. Subsequently, nanocellulose, chitosan, and nanocellulose whit chitosan scaffolds were prepared by freeze-drying in order to evaluate the characteristics of nanocellulose versus other biopolymers. Scaffolds were then evaluated by SEM, porosity tests, water absorption capacity and biodegradability tests.

A yield of 23.8 percent of extracted nanocellulose was obtained. The scaffolds composite of nanocellulose and chitosan showed the best results with an average pore size of 110.13 micrometers with 88.94 percent. porosity, 2418.32 percent of water adsorption and an ability to degrade in 16 days. The results, suggest that these scaffold have potential to be applied in TE research related to wound healing and tissue regeneration.

Keywords: agroindustrial wastes, banana, nanocellulose, natural biopolymers, biological scaffolds, tissue engineering, porosity, biodegradability.

CAPÍTULO I.-MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Planteamiento del problema y justificación

La curación de heridas es un proceso preciso y cuidadosamente coordinado en individuos sanos. No obstante, las deficiencias en la cicatrización provocan que, pacientes con heridas crónicas alcancen situaciones alarmantes y altos costos económicos en el proceso de curación (Nosrati et al., 2021). Enfermedades autoinmunes, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares, quemaduras de alto grado y el envejecimiento, constituyen algunos de los motivos que provocan las heridas crónicas. (Weller et al., 2020). Según el último informe del Mercado Mundial de Cuidado de Heridas, el sector ha alcanzado aproximadamente 21 mil millones de dólares en 2022 y se proyecta que el mercado alcance los 28.3 mil millones de dólares para 2028 (IMARC, 2023). Por tal motivo, el tratamiento adecuado y bien planificado para las heridas crónicas se ha vuelto importante en las últimas décadas para mejorar la calidad de vida humana y aumentar la esperanza de vida (Nosrati et al., 2021).

Entre las características más comunes que presentan las heridas crónicas están la inflamación excesiva, infecciones persistentes, formación de biopelículas microbianas resistentes a medicamentos y la incapacidad de la piel o células epidérmicas para reaccionar a estímulos reparadores. En conjunto, estos fenómenos fisiopatológicos resultan en la falta de cicatrización de las heridas (Frykberg & Banks, 2015).

La estrategia clínica más exitosa para el tratamiento de heridas crónicas es el autoinjerto de piel. La respuesta inmunológica mínima es la ventaja más significativa de este método, sin embargo, cuando el área lesionada supera el 60 % de la superficie corporal del paciente, ya no son una opción, ya que, no podrían cubrir toda el área afectada (Nosrati et al., 2021). En este sentido y por lo mencionado anteriormente, la

Ingeniería de tejidos (IT) ha surgido como alternativa para producir órganos y reparar o reemplazar tejidos dañados en el cuerpo humano **(Han et al., 2020)**. Para dar lugar a un tejido u órgano nuevo en el laboratorio, se requiere la combinación de tres componentes: células, andamios y factores de crecimiento **(Tonelli, 2017a)**. Los andamios actúan como soporte para la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Deben cumplir con varias propiedades, como: estructura porosa para el transporte de gases, nutrientes y vascularización **(Krishani et al., 2023)**, desencadenar una respuesta inflamatoria mínima y ser biodegradable **(Suamte et al., 2023)**.

Los andamios generalmente se elaboran a partir de biomateriales que puedan imitar la microestructura de la matriz extracelular (ECM). Generalmente se utilizan biopolímeros naturales, sintéticos o la combinación de ambos. La nanocelulosa, es un ejemplo de biopolímero natural empleado en aplicaciones biomédicas. Se puede obtener de fuentes renovables, como son los residuos orgánicos de frutas y vegetales ricos en biomasa lignocelulósica **(Mateo et al., 2021)**. A pesar de que los residuos orgánicos son biodegradables, contribuyen a la producción de gases de efecto invernadero específicamente el metano que interviene en el aumento del calentamiento global **(Patel et al., 2021b)**. Además, su inadecuada disposición genera impactos ambientales, como: la contaminación de océanos, obstrucción de drenajes, inundaciones y afecciones respiratorias por causa de la quema **(OMS, 2023)**.

El banano, es un producto de exportación con gran importancia mundial. En el 2022 los principales países productores (Ecuador, Filipinas, Costa Rica, Guatemala y Colombia), exportaron aproximadamente 19.1 millones de toneladas de banano. Tomando en cuenta que, la producción del banano disminuyó por los elevados precios de los fertilizantes y las condiciones climáticas **(FAO, 2023)**. Durante su cosecha, se descarta el fruto que no cumple con los estándares de calidad para la venta y exportación, el cual es destinado como alimento animal o desecho **(Hikal, 2022)**. El mismo destino tiene la cáscara después del consumo en hogares e industrias, generando una gran cantidad de desperdicios. De este modo, se pretende dar valor a estos residuos mediante su aprovechamiento en la extracción de polímeros como la nanocelulosa, para su posterior aplicación en andamios biológicos como una

alternativa para futuras investigaciones en la cicatrización de heridas crónicas y generar impactos positivos en la sociedad y en el medio ambiente.

1.1.2. Ingeniería de tejidos

El término ingeniería de tejidos (IT) se introdujo en un taller de la National Science Foundation en 1988, con el fin de definir un nuevo campo científico para la regeneración de tejidos **(Akter, 2016)**. Mediante la IT y el conocimiento en la estructura de tejidos, biología, técnicas de cultivo celular y fisiología, se pretende superar situaciones como la falta de órganos, complicaciones que se presentan después del trasplante, como es el caso, de la inmunosupresión o rechazo de órganos trasplantados y los problemas de cicatrización **(Elitok et al., 2018)**. La IT es un campo multidisciplinario en la medicina regenerativa, combina células, biomateriales y factores de crecimiento para producir órganos y reparar o reemplazar tejidos dañados en el cuerpo humano **(Han et al., 2020)**.

En la IT, se consideran tres tipos importantes de fuentes de células: las autólogas (células propias del paciente), alogénicas (células de la misma especie, pero de distinto paciente) y las xenogénicas (células de diferente especie) **(Olson et al., 2011)**. En el caso de las células autólogas, a pesar de ser seguras, presentan inconvenientes para recolectarse lo suficiente en pacientes que se encuentran gravemente enfermos o en los de edad avanzada. Las células xenogénicas, en cambio, no se consideran seguras, ya que, pueden ser una fuente de contagio de enfermedades virales presentes en animales **(Sharma et al., 2019a)**.

Otras enfermedades que se pueden tratar con la tecnología IT son: quemaduras en la piel, problemas óseos, enfermedades pulmonares, reconstrucción craneofacial, reemplazo de córnea, pérdida volumétrica de músculo, reparación de cartílago, enfermedades vasculares, reparación del sistema nervioso, reparación del tejido gastrointestinal, etc. **(Olson et al., 2011)**.

Los avances tecnológicos como el uso de células madre, la edición de genes, la bioimpresión 3D y la nanotecnología permiten la fabricación de tejidos u órganos con funcionalidad y complejidad cada vez mejores, dependiendo de las necesidades específicas del paciente. El uso de componentes electrónicos dentro de los productos de IT permiten controlar la respuesta del host después de la implantación del producto **(Rajab et al., 2020)**. Sin embargo, aún existen limitaciones, como son las controversias éticas, por la manipulación de células y modelos animales, mismas que se deben resolver, para poder ampliar las aplicaciones clínicas **(Sharma et al., 2019a)**.

1.1.3. Componentes necesarios para la ingeniería de tejidos

1.1.3.1. Células

La célula es la unidad estructural y funcional de la vida en todos los organismos vivos. Se agrupan para formar tejidos y crear un sistema. En la IT, la selección de la fuente de células se convierte en un tema crucial, ya que, determina el éxito del proceso de la regeneración de tejido **(Krishani et al., 2023)**. Las células son implantadas o cultivadas en una estructura sintética, los andamios, en donde deberán ser capaces de desarrollarse y diferenciarse para formar el nuevo tejido **(Roldán et al., 2016)**. Las células somáticas como los osteoblastos y condrocitos, son las primeras fuentes celulares utilizadas en aplicaciones de IT. Además, de estas, las células primarias, como las epiteliales (queratinocitos, fibroblastos), hepáticas, sanguíneas, neuronales, musculares y endoteliales, también son de gran importancia en la IT **(Ashammakhi et al., 2022)**. Sin embargo, debido al potencial multipotente, se utilizan ampliamente las células madre **(Brown et al., 2013)**.

Las células madre, son células no especializadas que se pueden diferenciar en varios tipos de células, además, tienen la capacidad de proliferar para autorrenovarse. Según su origen, las células madre se clasifican en embrionarias (ESC), mesenquimales (MSC) y en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) **(Tonelli et al., 2017b)**.

1.1.3.2. Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento (GF) son proteínas solubles que estimulan procesos celulares como la proliferación, migración, diferenciación y morfogénesis multicelular durante el desarrollo y la cicatrización de tejidos **(Ren et al., 2020)**. Se derivan de células como fibroblastos y macrófagos, encargados de coordinar las respuestas inmunitarias, la angiogénesis y la cicatrización de heridas **(Guan et al., 2020)**. Cabe mencionar que, la combinación de GF con nutrientes, hormonas y citoquinas incorporadas al medio de cultivo aumentan la proliferación y diferenciación celular **(Naderi et al., 2011)**. Los GF más utilizados en IT incluyen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y las familias del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) **(Guan et al., 2020)**.

1.1.3.3. Andamios biológicos (scaffolds)

El término andamio, se introdujo por primera vez en 1893 por Barth **(Elitok et al., 2018)**. Es una estructura o matriz porosa temporal utilizada para el crecimiento y regeneración de tejidos biológicos, en el cual, se combinan células y factores de crecimiento para formar un nuevo tejido **(Krishani et al., 2023)**. Deben brindar un microambiente específico al tejido para mantener y regular el comportamiento y la función celular **(Elitok et al., 2018)**. Estas matrices proporcionan soporte para las células, permitiendo su adhesión, proliferación y diferenciación. La idea detrás de los andamios biológicos, es imitar la estructura y propiedades mecánicas del tejido nativo **(Sharma et al., 2022b)**. De modo que, a medida que las células se multiplican y se diferencian, el andamio logre degradarse gradualmente y sea reemplazado por el tejido nuevo y funcional. Los andamios pueden ser elaborados con biopolímeros sintéticos, naturales o con la combinación de ambos **(Costa et al., 2017)**.

1.1.4. Propiedades requeridas en los andamios biológicos

Los andamios en la IT desempeñan el papel de soporte mecánico, permitiendo el transporte de oxígeno y nutrientes, transfiriendo señales bioquímicas y en algunos casos ayudando a la liberación controlada de fármacos y factores de crecimiento para la regeneración del tejido **(Echeverría et al., 2021)**. Para que un andamio sea utilizado en IT, debe cumplir con varios requerimientos, algunos de ellos son: biocompatibilidad, biodegradabilidad, estructura tridimensional con poros uniformes interconectados. En condiciones adecuadas, el proceso de regeneración del tejido se ve favorecido por características bioactivas, y la esterilidad **(Rebello et al., 2015)**.

La biodegradabilidad es la capacidad de un biomaterial de ser descompuesto por enzimas o reacciones de origen biológicas cuando se encuentra en un sistema biológico **(Jiang et al., 2014)**. En el diseño de los andamios, la biodegradabilidad es un factor importante, dado que, al actuar como una estructura temporal para el desarrollo de células o tejidos, debe degradarse de forma natural en el cuerpo, sin necesidad de algún procedimiento invasivo para su extracción **(Mishra et al., 2022a)**. La velocidad de degradación del andamio debe ser proporcional a la formación o regeneración del tejido, es decir, mientras las células fabrican su propio tejido, el andamio proporcionará integridad estructural y eventualmente se descompondrá dejando el nuevo tejido **(Dwivedi et al., 2017)**. Los productos no tóxicos del andamio se deben reciclar como metabolitos en otras reacciones bioquímicas o eliminarse del cuerpo sin causar problemas con otros órganos y tejidos cercanos **(Krishani et al., 2023)**.

Los andamios requieren de una red porosa tridimensional, altamente interconectada, con un tamaño adecuado de poro y una estructura porosa apropiada para favorecer el transporte de nutrientes, metabolitos, migración celular, crecimiento vascular interno y la infiltración de vasos sanguíneos del tejido circundante hacia la estructura del andamio **(Roldán et al., 2016)**. La interconexión del sistema poroso proporciona una superficie de soporte más grande para la unión de las células **(Krishani et al., 2023)**. El tamaño de los poros debe ser mayor que el tamaño de las células, de lo contrario, afectaría la migración e infiltración celular **(Suamte et al., 2023)**. Además, a mayor

porosidad el crecimiento de las células puede aumentar y promover la integración de los tejidos nuevos a los tejidos nativos **(Krishani et al., 2023)**. Sin embargo, cuando existe una irregularidad en la porosidad de las estructuras puede conducir a una distribución y penetración inadecuada de las células **(Suamte et al., 2023)**.

La biocompatibilidad es una evaluación de cómo los materiales terapéuticos que han sido implantados interactúan con el cuerpo humano cuando se emplean como dispositivos médicos **(Li & Yang, 2023)**. Cuando un material es biocompatible, realiza su función sin causar respuestas adversas, como reacciones alérgicas o problemas inflamatorios crónicos de forma local o sistémica en el cuerpo **(Cvrček & Horáková, 2018)**. El andamio debe ser biocompatible para la adhesión y proliferación celular. Debe provocar respuestas inmunes insignificantes para evitar reacciones inflamatorias que puedan causar rechazo en el cuerpo y complicar su curación **(Krishani et al., 2023)**.

Los andamios se consideran bioactivos cuando interactúan y reaccionan de forma controlada con el tejido u órgano circundante en un entorno biológico para facilitar los procesos de formación de nuevos tejidos **(Martelli et al., 2023)**. Entre estos procesos están la adhesión, migración y diferenciación celular, la neoformación del tejido y la integración en el huésped evitando procesos indeseables como la cicatrización **(Roseti et al., 2017)**. Los andamios bioactivos contienen mitógenos que ayudan a estimular la división celular, GF como inductores de la proliferación y morfógenos que controlan la generación tisular. De esta forma, los andamios no solo brindan un apoyo físico y bioquímico para la regeneración, sino también crean un microambiente celular favorable para la reparación del tejido dañado **(Ramos-Zúñiga et al., 2022)**.

La esterilización es el proceso para eliminar todas las formas de organismos vivos, incluyendo bacterias, virus y levaduras **(Łopianiak & Butruk-Raszeja, 2020)**. Los andamios pueden ser infectados por una amplia gama de microorganismos causando infecciones y enfermedades graves **(Dai et al., 2016)**. El método de esterilización no debe afectar las propiedades estructurales y bioquímicas de los andamios, por lo tanto, es importante la selección del método **(Sultana, 2018a)**. Los andamios se elaboran

asépticamente o se esterilizan después del proceso de fabricación para luego utilizarlos de forma *in vivo*. Esta última estrategia es más realista y práctica que lograr andamios completamente estériles (Griffin et al., 2018).

1.1.5. Biomateriales para la elaboración de andamios biológicos

Un biomaterial según la Sociedad Europea de Biomateriales (ESB), es un material capaz de interactuar con sistemas biológicos para evaluar, tratar o reemplazar cualquier tejido u órgano del cuerpo (O'Brien, 2011). Existen diferentes clases de biomateriales que se han utilizado en IT: polímeros de origen natural, matrices de tejido acelular como la submucosa de la vejiga y del intestino delgado y polímeros sintéticos (Olson et al., 2011). También se utilizan biocerámicas, metales y nanomateriales a base de carbono (Krishani et al., 2023). Los biomateriales más utilizados en aplicaciones biomédicas son los polímeros naturales y sintéticos (Sultana et al., 2014b).

Los biomateriales han sido probados con respecto a su biocompatibilidad. Los materiales de origen natural y las matrices de tejido acelular tienen la principal ventaja del reconocimiento biológico. Mientras que, los polímeros sintéticos se producen a gran escala con propiedades controladas como la tasa de degradación, resistencia y microestructura (Olson et al., 2011). Los andamios cerámicos, en cambio poseen una mayor rigidez mecánica, elasticidad baja y una superficie dura y quebradiza. Sin embargo, en la regeneración del tejido óseo muestran una excelente biocompatibilidad debido a su semejanza química y estructural con la fase mineral del hueso nativo (O'Brien, 2011). Entre las características de los nanomateriales a base de carbono están la biocompatibilidad, baja citotoxicidad, estabilidad mecánica, facilidad de comunicación celular y la entrega de nutrientes, pero poseen biodegradabilidad limitada generando inconvenientes (Krishani et al., 2023).

1.1.5.1. Biopolímeros sintéticos

Los biopolímeros sintéticos se derivan de fuentes no renovables, los hidrocarburos. Se pueden diseñar y sintetizar con una gran variedad de estructuras, propiedades físicas y químicas apropiadas **(Wei et al., 2018)**. Este enfoque permite lograr mejores propiedades mecánicas, estabilidad estructural, alta versatilidad, porosidad y tiempos de degradación controlados para aplicaciones específicas. Pueden fabricarse en grandes cantidades y su vida útil es larga **(Arifin et al., 2022)**. No obstante, estos polímeros carecen de sitios de adhesión celular y requieren modificaciones químicas para remediar dicho problema **(Reddy et al., 2021)**.

1.1.5.2. Biopolímeros naturales

Los biopolímeros naturales se derivan de recursos renovables como plantas, animales y microorganismos. Son similares a las macromoléculas biológicas naturales y pueden ser degradados con mayor facilidad que los polímeros sintéticos. Las características principales de estos biopolímeros como su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, no citotoxicidad y composición han hecho que sean investigados y utilizados en aplicaciones para IT **(Yahya et al., 2021)**.

Los biopolímeros naturales se dividen en dos categorías: biomateriales basados en proteínas como la fibrina, colágeno y elastina que se hallan en el cuerpo humano, y en biomateriales basados en polisacáridos como el quitosano, seda, gelatina y alginato **(Alaribe et al., 2016)**. Tienen características similares a los tejidos blandos, mostrando bioactividad, excelente capacidad de adhesión y crecimiento celular. Se destacan por su amplia disponibilidad, seguridad ecológica y pueden ser modificados para adaptarse a diferentes aplicaciones **(Krishani et al., 2023)**. Las fuentes naturales para su obtención requieren de un paso de purificación para evitar respuestas inmunológicas después de la implantación del andamio **(Sultana et al., 2014b)**.

Quitosano como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos

El quitosano es el segundo biopolímero más abundante que se encuentra en la naturaleza. Es un polisacárido lineal derivado de la desacetilación de la quitina que está presente en los caparazones de crustáceos, insectos y paredes celulares de hongos **(Alaribe et al., 2016)**. El quitosano posee propiedades interesantes como capacidad de adsorción, biodegradabilidad, alta biocompatibilidad, no citotóxico con propiedades biológicas mejoradas, como actividad antibacteriana, antifúngica y antitumoral **(Biswal, 2019)**. Este biopolímero se ha utilizado como material en la regeneración de piel, tejidos nerviosos y huesos **(Alaribe et al., 2016)**.

Nanocelulosa como biomaterial para la elaboración de andamios biológicos

La nanocelulosa es una fibra natural que se obtiene por la descomposición de la celulosa. Se caracteriza por su tamaño a nivel de nanoescala **(Rajasekharan et al., 2023)**. Generalmente posee un diámetro menor a 100 nm y varios micrómetros de longitud **(Phanthong et al., 2018)**. Posee propiedades novedosas como, alta área superficial, excelente resistencia mecánica, no tóxico, biodegradable, biocompatible, beneficioso para el medio ambiente y se puede extraer de varios recursos de biomasa **(Kaur et al., 2021)**. Se clasifica en nanofibras de celulosa (CNF), nanocristales de celulosa (CNC) y nanocelulosa bacteriana (BNC) **(Gopakumar & Grohens, 2016)**. Aunque tienen composición química similar, difieren en morfología, tamaño, cristalinidad, fuentes y métodos aplicados en la extracción **(Phanthong et al., 2018)**.

1.1.6. Extracción de nanocelulosa a partir de residuos de banano para su aplicación como biomaterial en la elaboración de andamios biológicos

1.1.6.1. Residuos de banano

El banano es una fruta que se cultiva principalmente en los países tropicales. Pertenecce a la familia Musaceae del género *Musa*. Es la segunda fruta que más se produce después de los cítricos, aportando alrededor del 16% de la producción mundial de frutas y el cuarto cultivo alimentario más importante después del arroz, trigo y maíz **(Alzate-Acevedo et al., 2021)**.

La importancia económica de la industria bananera se centra en la generación de ingresos por las exportaciones, en el empleo directo a millones de personas en todo el mundo incluyendo aquellas personas que trabajan en la distribución y supermercados de todo el mundo **(Evans & Ballen, 2018)**.

El banano de exportación pasa por un proceso de control de calidad, para garantizar que llegue a su destino final en un estado óptimo. Por tal motivo, durante la cosecha y selección del banano, se desperdicia alrededor del 60% de biomasa **(Santiago et al., 2022)**. En plantas procesadoras donde se selecciona y empaqueta el banano para su exportación, los frutos que no han alcanzado un estado óptimo de madurez, tamaño adecuado, presentan golpes o magulladuras, piquetes de insectos o manchas, son considerados rechazo y se convierten en desperdicio **(Alzate-Acevedo et al., 2021)**. Estos desechos contienen celulosa (29%), hemicelulosa (25%), lignina (10%), fructuosa (2,7%), glucosa (3,2%), sacarosa (7,8%) y fibras naturales en base seca **(Santiago et al., 2022)**.

1.1.6.2. Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica se utiliza ampliamente para producir variedad de productos, debido a su abundante disponibilidad, bajo costo y suministro factible durante todo el año **(Ahmad & Zakaria, 2019)**. El término lignocelulósico se utiliza para aquellos materiales que están compuestos por celulosa (20 %-60 %), hemicelulosa (20 %-50 %) y lignina (20 %-30 %), y está asociado con plantas superiores, incluidas

las maderas blandas y duras (**Figura 1**). La composición de lignocelulosa depende de del tipo de planta (**Harmsen et al., 2022**). La biomasa lignocelulósica es una fuente de fibra natural, que puede sustituir a polímeros derivados del petróleo. Por tal motivo, los residuos orgánicos poseen un alto potencial para ser reutilizados como materia prima (**Phanthong et al., 2018**).

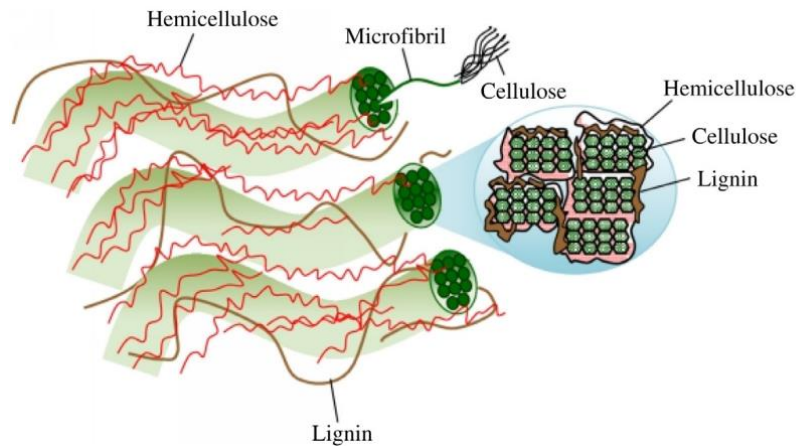


Figura 1. Principales componentes de la biomasa lignocelulósica.

Se muestran los constituyentes de la biomasa lignocelulósica. La celulosa formada por microfibras que se encuentran acogidas por la hemicelulosa en forma de matriz y por la lignina que actúa como pegamento para sujetar las células (**Ahmad & Zakaria, 2019**).

La celulosa es el biopolímero más abundante y disponible en la naturaleza, ya que, está presente en la pared celular de las plantas para brindar soporte (**Kumar et al., 2019**). Esto se debe a que, las cadenas de celulosa forman entre sí microfibrillas, que se caracterizan por ser estructuras altamente cristalinas, insolubles y químicamente estables (**Ochoa-Villarreal et al., 2012**). Independiente de la fuente de extracción, su estructura es una cadena lineal de alto peso molecular constituida por unidades repetidas de glucosa anillada que se unen entre sí mediante el enlace β -1,4 glucosídico, en donde, el oxígeno, está unido covalentemente al C1 de un anillo de glucosa y al C4 del anillo que continua (**Yadav et al., 2021a**).

La hemicelulosa es un biopolímero heterogéneo que brinda soporte a la pared celular de las plantas al ser una matriz que acoge a las microfibrillas de celulosa (**Patel &**

Parsania, 2017). Está compuesto por cadenas cortas y amorfas de azúcares de 5 y 6 carbonos, tales como, xilosa, arabinosa, manosa, glucosa y galactosa (**Ahmad & Zakaria, 2019**). Aspectos importantes de la hemicelulosa, es la ausencia de estructura cristalina, debido a su naturaleza altamente ramificada y a la presencia de grupos acetilo conectados a la cadena polimérica (**Harmsen et al., 2010**).

La lignina es una macromolécula heterogénea que representa alrededor del 30 % del carbono orgánico de la biosfera (**Benaimeche et al., 2020**). En la pared celular actúa como pegamento para sujetar las células, emite protección para prevenir ataques biológicos o químicos y transporta agua y nutrientes (**Lu et al., 2017**). Cuenta con unidades de fenilpropano específicamente el alcohol p-cumarílico, el alcohol coniferílico y el alcohol sinapílico, los cuales, se encuentran con mayor frecuencia (**Harmsen et al., 2010**).

1.1.7. Métodos de extracción de nanocelulosa

Los residuos orgánicos resultan atractivos por ser fuente de producción de nanocelulosa. Como se mencionó anteriormente, la biomasa lignocelulósica contiene celulosa y materiales no celulósicos como lignina, hemicelulosa y otros compuestos que deben ser tratados en un pretratamiento para ser eliminados. Los tratamientos más utilizados son el alcalino y con el ácido-clorito. En el tratamiento alcalino se elimina hemicelulosa y lignina utilizando generalmente hidróxido de sodio, y el tratamiento ácido-clorito conocido como un proceso de deslignificación o blanqueo, en el que se utiliza hipoclorito de sodio y ácido acético para eliminar lignina y otras impurezas, en donde el color blanco de las fibras de celulosa indica la eliminación de estos componentes. Para la extracción de nanocelulosa los métodos más comunes son la hidrólisis ácida, hidrólisis enzimática y el proceso mecánico (**Phanthong et al., 2018**).

En la hidrólisis ácida se utilizan ácidos fuertes como el ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido bromhídrico y ácido nítrico para romper los enlaces glucosídicos y las regiones amorfas de la celulosa (**Du et al., 2019**). Durante el proceso

de hidrólisis se controla ciertas condiciones como: concentración de ácido, temperatura, tiempo, y relación entre ácido y celulosa. Una vez finalizado el tiempo de reacción se detiene la hidrólisis añadiendo agua destilada fría, posteriormente se somete a una serie de lavados por centrifugación para eliminar el residuo de ácido **(Wulandari et al., 2016)**.

La hidrólisis enzimática emplea enzimas como las celulasas que se encargan de la degradación de la celulosa. Se clasifican en celobiohidrolasas (tipo A y B) que degradan las regiones cristalinas, y las endoglucanasas (tipo C y D) que atacan las regiones amorfas de la celulosa **(Yadav et al., 2021a)**. Estas enzimas muestran un efecto sinérgico y causan menos destrucción a la celulosa es considerada una alternativa ecológica y segura, ya que, no genera residuos tóxicos **(Ribeiro et al., 2019)**. Generalmente, las enzimas provocan el hinchamiento de las fibras facilitando el proceso de desintegración para producir las nanofibras **(Yadav et al., 2021a)**.

En el proceso mecánico, se aplica fuerza de corte que provoca una escisión transversal a lo largo del eje longitudinal de las microfibras de celulosa, mediante procesos como la molienda de bolas, homogeneización a alta presión y ultrasonificación. Después de este proceso las partículas disminuyen su tamaño en un diámetro uniforme, pero tienden a sufrir un mayor daño mecánico que afecta la cristalinidad **(Moon et al., 2011)**. El mayor inconveniente en el proceso mecánico es el alto consumo de energía, por tal motivo, se combinar con otro método para disminuir este consumo **(Phanthong et al., 2018)**.

1.1.8. Métodos para la elaboración de andamios biológicos

Los métodos de fabricación y los biomateriales para la elaboración de andamios se seleccionan según la complejidad de los tejidos objetivos **(Kumar & Jacob, 2022)**. La técnica de fabricación seleccionada deberá dar como resultado un andamio adecuado con buenas propiedades mecánicas, estructura porosa 3D con poros interconectados y con distribución uniforme. La arquitectura del andamio se

caracteriza en tres niveles, nano, micro y macro, mismos que influirán en la interacción célula-matriz. Una arquitectura a nivel nanométrico permite una adecuada unión de las moléculas de señalización para la adhesión, proliferación y diferenciación celular **(Krishani et al., 2023)**. El nivel a microescala permite la supervivencia y función de las células y el nivel a macroescala permite el transporte adecuado de nutrientes y brinda propiedades mecánicas **(Eltom et al., 2019)**.

Las técnicas de elaboración de andamios 3D se subdividen en métodos convencionales y avanzados **(Arifin et al., 2022)**. Los métodos convencionales incluyen técnicas como liofilización, electrohilado, función con solventes y lixiviación de partículas y espuma de gas, y los métodos avanzados incluyen estereolitografía, modelado por deposición fundida, sinterización selectiva por láser, bioimpresión etc. **(Eltom et al., 2019)**.

1.1.8.1. Métodos convencionales

El electrohilado emplea un campo eléctrico de alto voltaje para producir fibras a partir de soluciones poliméricas cargadas eléctricamente obteniendo andamios nanofibrosos **(Suamte et al., 2023)**. La función con solventes y lixiviación consiste en disolver un polímero en un disolvente con partículas de sal, luego el disolvente se elimina por evaporación dando resultado un compuesto de polímero de sal, el cual se sumerge en agua para obtener una estructura porosa después de la sal de lixivia **(Kumar & Jacob, 2022)**. En la técnica de espuma de gas los discos de polímeros son sometidos a gases inertes a alta presión para crear espuma. Una caída de presión hace que la fase gaseosa se separe ocasionando la nucleación de las burbujas. Luego el gas se difunde por el polímero generando poros **(Perić et al., 2020)**.

Liofilización

La liofilización o también conocido como secado por frío, es la técnica más utilizada en la fabricación de andamios. Tiene como principio la técnica de sublimación **(Kumar & Jacob, 2022)**. Un polímero escogido se disuelve en un disolvente ya sea

agua o un disolvente orgánico. Después la solución se coloca en un molde y se congela para la solidificación. Finalmente, el solvente sólido formado se evapora por sublimación con ayuda de un liofilizador (**Koyyada & Orsu, 2021**). De este modo se obtiene un andamio con estructura sólida con innumerables poros interconectados (**Nowak & Jakubczyk, 2020**). Para la solidificación la temperatura requerida se encuentra entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (**Suamte et al., 2023**). La liofilización produce andamios con aproximadamente un 90 % de porosidad y con tamaños de poro entre 20 a 200 μm que dependerán de la velocidad de congelación, concentración del polímero y la temperatura (**Collins et al., 2021**).

Una ventaja de este método es que no se involucra el calor, por lo que se pueden incorporar moléculas sensibles al calor, como proteínas o factores de crecimiento. Entre las desventajas es el alto consumo de energía, el uso de disolventes citotóxicos y la irregularidad de los poros (**Koyyada & Orsu, 2021**).

1.1.8.2. Métodos avanzados

Los andamios elaborados por métodos avanzados o también conocidos como fabricación aditiva, se pueden desarrollar utilizando modelos asistidos por computadora. La estereolitografía crea objetos sólidos tridimensionales mediante la impresión consecutiva de capas finas de material curable con luz ultravioleta capa por capa (**Eltom et al., 2019**). En el modelado por deposición fundida, un polímero sólido se cuele en una boquilla de extrusión caliente para fundirlo en la superficie de un objeto 3D, en donde el proceso de extrusión para la deposición está controlado por una computadora (**Suamte et al., 2023**). En la sinterización selectiva por láser se usan láseres de alta potencia para sintetizar partículas de polvo en finas capas definidas por un modelo 3D (**Eltom et al., 2019**). La bioimpresión crea estructuras 3D a partir de materiales cargados de células, además se permite controlar la arquitectura, propiedades estructurales y mecánicas del andamio (**Perić et al., 2020**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Extraer nanocelulosa vegetal a partir de residuos de banano (*Musa paradisiaca*) mediante hidrólisis ácida y ultrasonidos para su aplicación en andamios biológicos.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la nanocelulosa vegetal obtenida mediante pruebas morfológicas y físicas.
- Elaborar un andamio biológico a partir de nanocelulosa vegetal mediante liofilización.
- Evaluar los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y biológicas.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

Los materiales utilizados para el desarrollo del presente trabajo de investigación (reactivos, material fungible y equipos de laboratorio) se detallan a continuación:

2.1.1. Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH) 5 %
- Hipoclorito de sodio (NaClO) 1 %
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 65 %
- Ácido acético (CH₃COOH) 0.05 M
- Alcohol deshidratado
- Etanol 70 %
- Agarosa 0.5 %
- Quitosano
- Pastillas de PBS (Tampón fosfato sódico)
- Agua destilada
- Plasma sanguíneo

2.1.2. Material fungible

- Vaso de precipitación 1000 mL
- Vasos de precipitación 500 mL
- Tela Filtro
- Frascos Boeco
- Embudo de vidrio
- Paquete de fundas Ziplock
- Paquete de papel aluminio

- Paquete de guantes quirúrgicos
- Tubos de centrífuga
- Tubos Falcon
- Portaobjetos
- Paquete de placas Petri
- Bisturí
- Jeringa 5 mL
- Desecador

2.1.3. Equipos de laboratorio

- Deshidratador por convección
- Molino
- Balanza analítica (OHAUS)
- Estufa
- pH metro (accumet AB200)
- Termómetro
- Termo agitador magnético
- Equipo ultrasónico
- Centrífuga (para tubos de 15 mL) (Rotina 380)
- Microscopio de luz invertida (EVOS XL)
- Microscopio electrónico de barrido (SEM) (VEGA3 TESCAN)
- Espectroscopio infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) (Spectrum Two)
- Ultracongelador
- Refrigerador
- Microondas (SAMSUNG)
- Liofilizador (LABCONCO)
- Incubadora (Mettler)
- Plancha de calentamiento (CORNING PC-420D)

2.2. Métodos

2.2.1. Caracterización de la nanocelulosa vegetal obtenida mediante pruebas morfológicas y físicas

2.2.1.1. Obtención del residuo del banano (*Musa paradisiaca*)

Se recolectó 500 g de residuos de banano del Centro de Acopio del Cantón Cevallos. Estos residuos se almacenaron en un cooler con hielos para evitar su descomposición hasta su transporte a los laboratorios de investigación (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

2.2.1.2. Preparación del residuo vegetal

El residuo vegetal se lavó con abundante agua destilada para eliminar el polvo, partículas de suciedad adheridas, insectos muertos y otras impurezas (**Romruen et al., 2022**). Después el residuo se secó en un deshidratador por convección a 50 ° C durante 30 h. Posteriormente, se molió el residuo para disminuir su tamaño. Luego, el polvo se almacenó en bolsas. Se realizó un pretratamiento, que consistió en lavar el polvo del residuo del banano en agua destilada a 60 ° C por 4 h en una relación fibra/agua de 1:10. A continuación, se filtró y se secó en estufa (**de Carvalho et al., 2015; Sanaguano, 2021**).

2.2.1.3. Extracción de celulosa vegetal

Se tomó 25 g de la materia prima seca en polvo y se trató durante 2 h con una solución de NaOH al 5 % en una relación fibra/solución de 1:20 a temperatura ambiente y con agitación vigorosa. Una vez finalizado el tiempo de reacción se filtró la solución (**de Carvalho et al., 2015**). El residuo insoluble se lavó con agua destilada hasta que el agua de lavado alcanzó un pH neutro (**Mishra et al., 2022b**). Posteriormente, se realizó el blanqueo con una solución de NaClO al 1 % en una relación fibra/ solución

de 1:10 durante 1 h a 95 ° C con agitación vigorosa. Este tratamiento se repitió dos veces para luego filtrar la celulosa y lavar con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado sea neutro, indicando la eliminación de la solución de NaClO. Seguidamente, la celulosa se secó a temperatura ambiente, se trituro y se almacenó en un recipiente de vidrio **(Melikoğlu et al., 2019; Sanaguano, 2021)**.

2.2.1.4. Extracción de nanocelulosa mediante hidrólisis ácida combinada de ultrasonidos

Se trató 10 g de celulosa en polvo con una solución de H₂SO₄ al 65 % p/p en una relación fibra/ H₂SO₄ de 1:20 con agitación constante por 45 minutos y se controló que la temperatura no exceda los 45 ° C. Una vez finalizado el tiempo de reacción, se detuvo la hidrólisis añadiendo agua destilada fría. Se dejó precipitar y se eliminó el medio de reacción **(de Carvalho et al., 2015; Sanaguano, 2021)**. Se centrifugó la muestra a 4000 rpm por 10 minutos, hasta que la suspensión alcanzó la neutralidad. **(Melikoğlu et al., 2019)**. Luego se llevó a cabo un tratamiento mecánico con la nanocelulosa, para lo cual, se utilizó un equipo de ultrasonidos a 20 kHz de frecuencia durante 30 minutos. Esto se realizó en un baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento **(Sanaguano, 2021; Mandal & Chakrabarty, 2011)**. La suspensión obtenida se sometió a centrifugación y se volvió a tratar con ultrasonidos durante 30 minutos. Finalmente, la suspensión resultante se secó a temperatura ambiente **(Sanaguano, 2021)**.

2.2.1.5. Apariencia de las fibras de nanocelulosa

Se utilizó un microscopio de luz invertida para observar las estructuras de la nanocelulosa. Para lo cual, se colocó la muestra en un portaobjetos y luego se ubicó en la platina del microscopio, para enfocar la muestra con el lente objetivo 10x. Una vez obtenida la imagen adecuada se tomó fotos **(Sanaguano, 2021)**.

2.2.1.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para examinar las propiedades morfológicas de la nanocelulosa de residuos del banano se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM). Se colocó la muestra en la cámara porta muestra del SEM utilizando un voltaje de 15.0 Kv (**Sanaguano, 2021**).

2.2.1.7. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para identificar los grupos funcionales característicos de la nanocelulosa se utilizó el espectroscopio infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) (**Mandal & Chakrabarty, 2011**). La recopilación de datos infrarrojos se llevó a cabo escaneando muestras de 4000 a 500 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} (**Akinjokun et al., 2021**). Se identificaron los picos más relevantes presentes en la gráfica y se guardaron los datos para su posterior análisis. Al finalizar el proceso, se limpió el equipo con algodón y alcohol en el área donde se colocó la muestra.

2.2.2. Elaboración de un andamio biológico a partir de nanocelulosa vegetal mediante liofilización

2.2.2.1. Preparación de solución de nanocelulosa con quitosano para la liofilización

Se preparó una solución de nanocelulosa y quitosano al 1 % en ácido acético 0.05 M (**Yin et al., 2019**). Se elaboró una solución gelificante de agarosa al 0.5 % disuelta en solución PBS. Seguidamente, se mezclaron las soluciones y se calentaron en un microondas hasta que se disolvieron completamente los biopolímeros (**Guáitara, 2022**). Además, se elaboraron andamios solo de nanocelulosa al 1 % y solo de quitosano al 1 %, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente.

2.2.2.2. Formación de andamios biológicos por liofilización

Una vez preparada las soluciones, se vertieron en placas Petri y se refrigeraron por 24 h. Luego se ultracongelaron a $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Posteriormente, las placas se colocaron en el liofilizador a $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 22 h para sublimar completamente los disolventes del material y obtener una estructura seca y porosa (Wu et al., (2021). Finalmente, las placas se retiraron del equipo y se colocaron en el desecador hasta su posterior uso (Pipattanawarothai et al., 2017).

2.2.3. Evaluación de los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y biológicas

2.2.3.1. Evaluación morfológica

Para analizar la morfología y diámetro de los poros de los andamios se utilizó microscopia de electrónica de barrido (SEM). Se utilizaron trozos pequeños de andamios. El tamaño de los poros se obtuvo mediante el software Image-J (Nokoarani et al., 2021; Grabska-Zielińska et al., 2020).

2.2.3.2. Evaluación de la porosidad

La porosidad del andamio se determinó por el método de desplazamiento de líquido. Para esto, se registró el peso inicial (W_0) de los andamios. Luego, se sumergieron en alcohol deshidratado durante 48 h. Pasado dicho tiempo, los andamios se pesaron nuevamente (W_1). De este modo, la porosidad se calculó reemplazando los valores obtenidos en la siguiente ecuación (Nocera et al., 2018):

$$\text{Porosidad (\%)} = \frac{(W_1 - W_0)\rho_b}{(W_1 * \rho_b) + (\rho_a - \rho_b)W_0} * 100$$

Donde ρ_a es la densidad del alcohol y ρ_b es la densidad del biopolímero.

2.2.3.3. Evaluación de capacidad de absorción de agua

Se determinó en relación al hinchamiento, para lo cual, se registró el peso de las muestras secas (W_{seco}) y luego se sumergieron en agua destilada a temperatura ambiente por 6 horas. Las muestras se pesaron en intervalos de 30 minutos para obtener su peso húmedo ($W_{húmedo}$). La capacidad de absorción de agua se calculó con la siguiente ecuación (Pipattanawarothai et al., 2017):

$$\text{Capacidad de absorción} = \frac{W_{húmedo} - W_{seco}}{W_{seco}} * 100\%$$

2.2.3.4. Evaluación de biodegradabilidad

La evaluación de la biodegradabilidad, consistió en cortar los andamios con bisturí de un tamaño de 1 cm², luego se pesaron y se anotaron sus pesos (W_i). Se esterilizaron con etanol al 70 %, seguidamente se colocaron en 2 mL de plasma sanguíneo y se incubaron a 37 ° C por un período de 7 días. Las muestras se pesaron en los días 2, 5 y 7 (W_f). Además, cada día de pesaje se cambió el plasma. Finalmente, el porcentaje de biodegradabilidad se obtuvo mediante la siguiente fórmula (Guáitara, 2022):

$$\text{Biodegradabilidad}(\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} * 100$$

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados

3.1.1. Caracterización de la nanocelulosa vegetal obtenida mediante pruebas morfológicas y físicas

3.1.1.1. Rendimiento de la nanocelulosa

La cáscara del banano representa el 40 % (p/p) del total del fruto en peso. Los componentes que se encuentran principalmente en la cáscara del banano son los carbohidratos, celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y almidón (**Phirom-on & Apiraksakorn, 2022**). En la **Tabla 1**, se observa que, después del proceso de secado del residuo del banano, los 500 g del residuo vegetal inicial disminuyó a 40.43 g, dando como resultado un porcentaje de humedad del 91.91 %. Según **Khan & Perveen (2010)**, el residuo del banano (cáscaras y tallos) contienen aproximadamente un 85 y 91 % de humedad. Por tal motivo, existe una gran reducción en el peso del material vegetal después de proceso de secado por la eliminación de agua.

Tabla 1. *Porcentaje de humedad en el residuo vegetal.*

	Peso húmedo del material (g)	Peso final después del secado (g)	% Humedad
Residuos de banano	500	40.43	91.91

En la **Tabla 2**, se muestra que, luego del pretratamiento del material vegetal en polvo con agua destilada, existió una disminución considerable en el peso, lo cual, se explica que durante este proceso se logró la eliminación de sustancias solubles en agua presentes en el residuo vegetal, como es el caso de azúcares, compuestos fenólicos e incluso impurezas (**Melesse et al., 2022**). Después de someter el material vegetal al

tratamiento alcalino con NaOH al 5 % a temperatura ambiente y el blanqueo con NaOCl al 1 %, en la **Tabla 2** se observa que, el peso disminuyó, esto se debe a la eliminación de compuestos no celulósicos, como lignina y hemicelulosa. Según **Sayakulu & Soloi (2022)**, cuando el material vegetal se sumerge en una solución de NaOH, la pared celular de las fibras se hincha, provocando que la capa exterior y la región amorfa exploten generando el rompimiento de los enlaces éter y éster entre la lignina y hemicelulosa. Además, la solución de NaOH rompe los enlaces de hidrógeno entre el componente lignocelulósico, haciendo que la lignina y hemicelulosa se disuelvan en soluciones alcalinas, dando lugar a un licor negro, que luego es eliminado mediante lavados. **Ciftci et al., (2018)**, menciona que, durante el tratamiento alcalino no se elimina totalmente la lignina, por lo tanto, se utiliza hipoclorito de sodio NaOCl para eliminar este restante y a la vez se usa como agente blanqueador. El NaOCl es capaz de romper el enlace éter en la estructura de la lignina, además, aumenta el brillo blanco de la pulpa. De acuerdo con **Modenbach & Nokes (2014)**, al aumentar la concentración de NaOH, ocurren cambios estructurales y morfológicos en la celulosa, ya que, se produce el hinchamiento de las regiones amorfas y cristalinas. Esto da lugar a la degradación de la cadena de celulosa y provoca que se disuelva fácilmente en el tratamiento de solución, reduciendo así el rendimiento de la fibra celulósica.

Tabla 2. *Pesos finales del material vegetal después de cada tratamiento.*

	Peso inicial del material (g)	Peso final después del secado (g)
Pretratamiento	40.43	27.42
Tratamiento alcalino y blanqueamiento	25	8.40
Hidrólisis ácida y ultrasonidos	8.40	5.95

En cuanto a la hidrólisis ácida y ultrasonidos, después de estos procesos al igual que en los anteriores, se observa una disminución en la masa del material vegetal tratado, lo cual (**Tabla 2**), se atribuye a la eliminación de compuestos celulósicos no fibrilados, impurezas sobrantes de los tratamientos anteriores y por pérdidas durante los lavados

para alcanzar el pH neutro de la suspensión (**Poulose et al., 2022**). Además, según el estudio de **Fernandes et al., (2023)**, durante la hidrólisis ácida se genera la rotura del enlace glucosídico en la región amorfa de la celulosa degradándola y dejando únicamente la región cristalina, ya que, al tener una estructura compacta impide la penetración del ácido en los cristales. En el proceso con ultrasonidos, se forman burbujas de cavitación que estallan y conducen a la formación de nanofibrillas de celulosa, y a la vez ayuda a mejorar su dispersión en solventes.

Tabla 3. Rendimiento en la obtención de nanocelulosa vegetal.

Peso inicial del material vegetal (g)	Peso final de nanocelulosa seca (g)	% Rendimiento
25	5.95	23.8

Se determinó que el rendimiento de nanocelulosa extraída fue del 23.8 % (**Tabla 3**). Este resultado se comparó con el obtenido por **Mohd et al., (2022)**, en donde el rendimiento que consiguió fue del 28.1 %, tomando en cuenta que, la concentración del ácido utilizado fue bajo, ya que, osciló entre 0 a 10 %. Además, según el autor, las concentraciones altas de ácido pueden degradar las regiones cristalinas, disminuyendo el rendimiento en el proceso de hidrólisis, por lo cual, es mejor utilizar concentraciones más diluidas. Para **Poulose et al., (2022)**, el rendimiento y la calidad de la nanocelulosa dependen de la fuente de celulosa, concentración de ácido, duración del tratamiento y la temperatura de hidrólisis.

3.1.1.2. Apariencia de las fibras de nanocelulosa

Mediante el microscopio de luz invertida con el objetivo 10x se observó la apariencia de las fibras de celulosa y nanocelulosa obtenidas de los residuos del banano. En la **Figura 2A**, se observa que algunas fibras de celulosa se encuentran dispersas y otras aglomeradas. Según **Subramanian et al., (2022)**, durante el tratamiento con NaOH e NaClO, la lignina y la hemicelulosa, que forman una red que une los haces de las fibras, se debilitan debido a que se hidrolizan haciéndose solubles en la solución de

tratamiento. Además, al ser eliminados provocan la desfibrilación de las fibrillas. En el estudio de **Mandal & Chakrabarty, (2011)**, mencionan que, la presencia de ceras que contienen las cáscaras de banano y que actúan como barrera hidrofóbica hacen que las fibras de celulosa presenten una estructura compacta, lo que explica que ciertas fibras se encuentren aglomeradas. En cuanto a la **Figura 2B**, se observa la apariencia de las fibras de nanocelulosa, las cuales, presentan fibras delgadas y pequeñas. De acuerdo al estudio de **Fernandes et al., (2023)**, esto se atribuye a que el ácido sulfúrico degrada la región amorfa de la celulosa, dejando la región cristalina. Además, al aplicar el tratamiento mecánico, se inducen altas fuerzas de corte sobre los haces de celulosa generando la desfibrilación (**Poulose et al., 2022**).

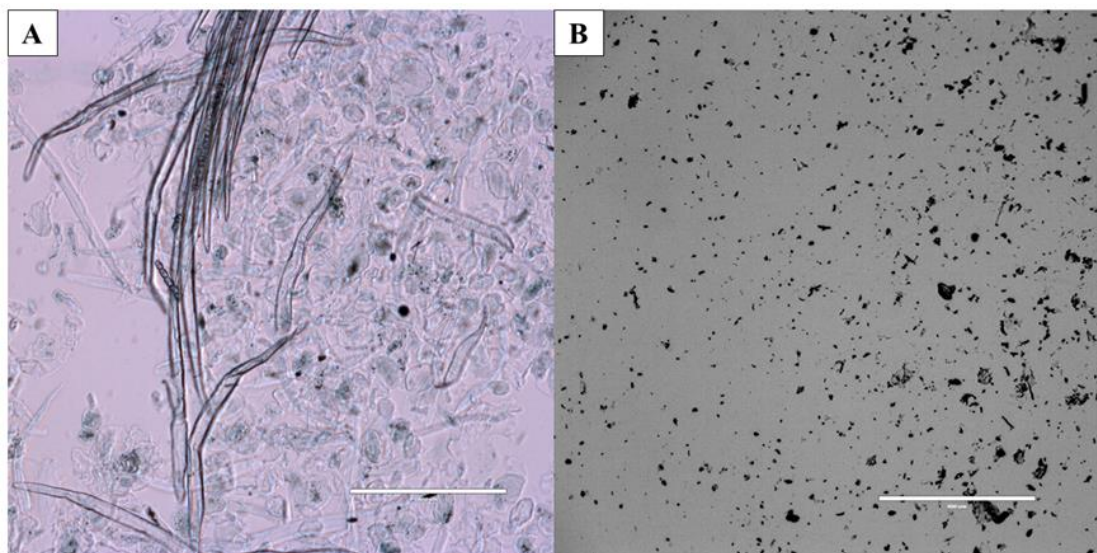


Figura 2. *Apariencia de fibras mediante microscopio de luz invertida 10x.*

Observaciones de las fibras de (A) Celulosa, las cuales, se encuentran desfibriladas y otras aglomeradas por la presencia de residuos de hemicelulosa y lignina que actúan como pegamento y (B) Nanocelulosa, en donde, tras el proceso de hidrólisis ácida y ultrasonidos se da lugar a la disminución del tamaño y desfibrilación, sin, embargo, las fibras se hallan aglomeradas por el proceso de secado.

3.1.1.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con el fin de identificar la morfología de celulosa y nanocelulosa extraída, se utilizó el microscopio electrónico de barrido (SEM). En la **Figura 3**, se presenta una micrografía de la celulosa, en donde se aprecia el inicio de la desfibrilación. Esto revela que en el tratamiento alcalino se logró eliminar hemicelulosa y lignina luego de hidrolizarse y volverse soluble, sin embargo, aún existen fibras que se encuentran aglomeradas debido a restos de estos compuestos no celulósicos que actúan como pegamento debido a la presencia de ceras y pectinas (Solís et al., 2019).

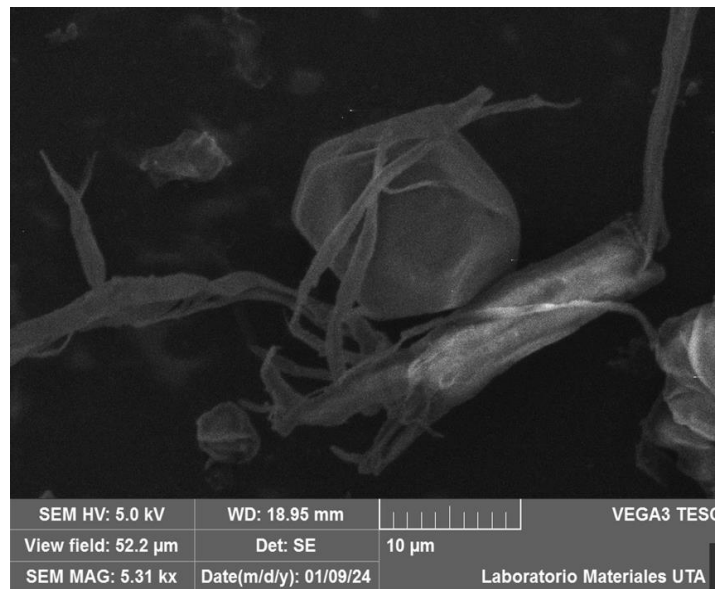


Figura 3. *Micrografía del análisis SEM de celulosa obtenida del residuo del banano.* Se observa fibras de celulosa y el inicio de la desfibrilación de algunas de ellas a MAG 5.31 kx, sin embargo, por la presencia de impurezas que actúan como pegamento estas están aglomeradas. La imagen fue obtenida en los Laboratorios Materiales UTA.

En cuanto a la nanocelulosa, en la **Figura 4**, se observa las partículas de polvo de nanocelulosa en forma esférica y aglomeradas. Para **Subramanian et al., (2022)**, como resultado de la eliminación de compuestos no celulósicos, el diámetro de las fibrillas se reduce. Además, mediante la hidrólisis ácida se pretende purificar el material al remover componentes no celulósicos, como es el caso de hemicelulosa y

lignina que no se han eliminado en tratamiento anteriores incluyendo ceras, aceites, grasas, etc (Solis et al., 2019).

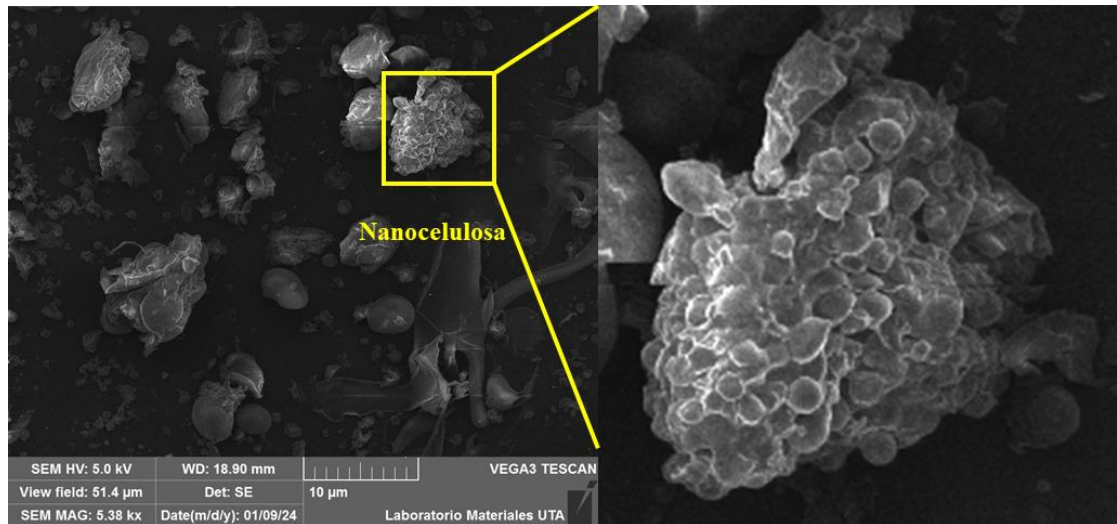


Figura 4. *Micrografía del análisis SEM de nanocelulosa obtenida del residuo del banano.*

Se observan las partículas de polvo de nanocelulosa aglomeradas debido al proceso de secado a MAG 5.38 kx. La imagen fue obtenida en los Laboratorios Materiales UTA.

Según **De Carvalho et al., (2015)**, menciona que, cuando la muestra a analizar en el SEM se encuentra en dispersión acuosa, la nanocelulosa presenta forma de varillas, pero después del proceso de secado las partículas se aglomeran, ya que, las fuerzas de cohesión aumentan haciendo que las fibras se agrupen, impidiendo una visualización adecuada.

3.1.1.4. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR) es un método utilizado para identificar los principales grupos funcionales presentes en un compuesto mediante el uso de un haz de radiaciones infrarrojas (**Hospodarova et al., 2018**). El FT-IR mide la absorción de la radiación infrarroja producida por las vibraciones moleculares de los enlaces de la muestra, dando como resultado, un espectro que se

muestra cómo % de transmisión (intensidad de la radiación infrarroja) frente al número de onda (cm^{-1}) a la que se expone la muestra (**Khan et al., 2018**). En esta investigación, se analizó celulosa y nanocelulosa mediante FT-IR para identificar los grupos funcionales presentes en estas muestras. El espectro infrarrojo muestra el % de transmitancia entre 68 % y 99 % en el eje y, indicando el porcentaje de luz transmitida por el compuesto. En el eje x, se presenta la longitud de onda entre 4000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} que representan los números de onda en los cuales la muestra pudo transmitir cantidades significativas de luz infrarroja (**Khan et al., 2018**).

La estructura principal de la celulosa es una cadena lineal conformada por unidades de glucosa unidas covalentemente por enlaces β -1,4 glicosídicos (C-O-C). La celulosa se empaqueta en microfibrillas que se encuentran dispuestas en láminas interconectadas por enlaces de hidrógeno de tipo OH-O con cadenas adyacentes (**Altaner et al., 2014**). Mientras que, el apilamiento de las láminas se estabiliza por enlaces débiles de hidrógeno CH-O, lo cual permite en pequeñas cantidades, la dispersión de celulosa en agua. El polisacárido de celulosa almacena una notable cantidad de energía en los enlaces -CH y -CC que lo componen (**Chami & Robert, 2013**). Dado que, la nanocelulosa es una forma nanoestructurada de la celulosa, su estructura química es la misma, pero con dimensiones reducidas (**Kaur et al., 2021**).

En la **Figura 5**, se observa el espectro infrarrojo de una celulosa comercial y de la celulosa y nanocelulosa extraídas de residuos de banano. En cuanto al análisis FT-IR de la nanocelulosa, se identificó una similitud con el espectro de celulosa comercial y celulosa extraída de residuos de banano con pequeñas variaciones en las intensidades de las bandas, esto según **Vijayan et al., (2022)**, es explicable, dado que, se analiza la misma celulosa, pero en menor tamaño. Estas variaciones ocurren, ya sean, por los tratamientos aplicados, disminución en el tamaño de la partícula y la eliminación de impurezas.

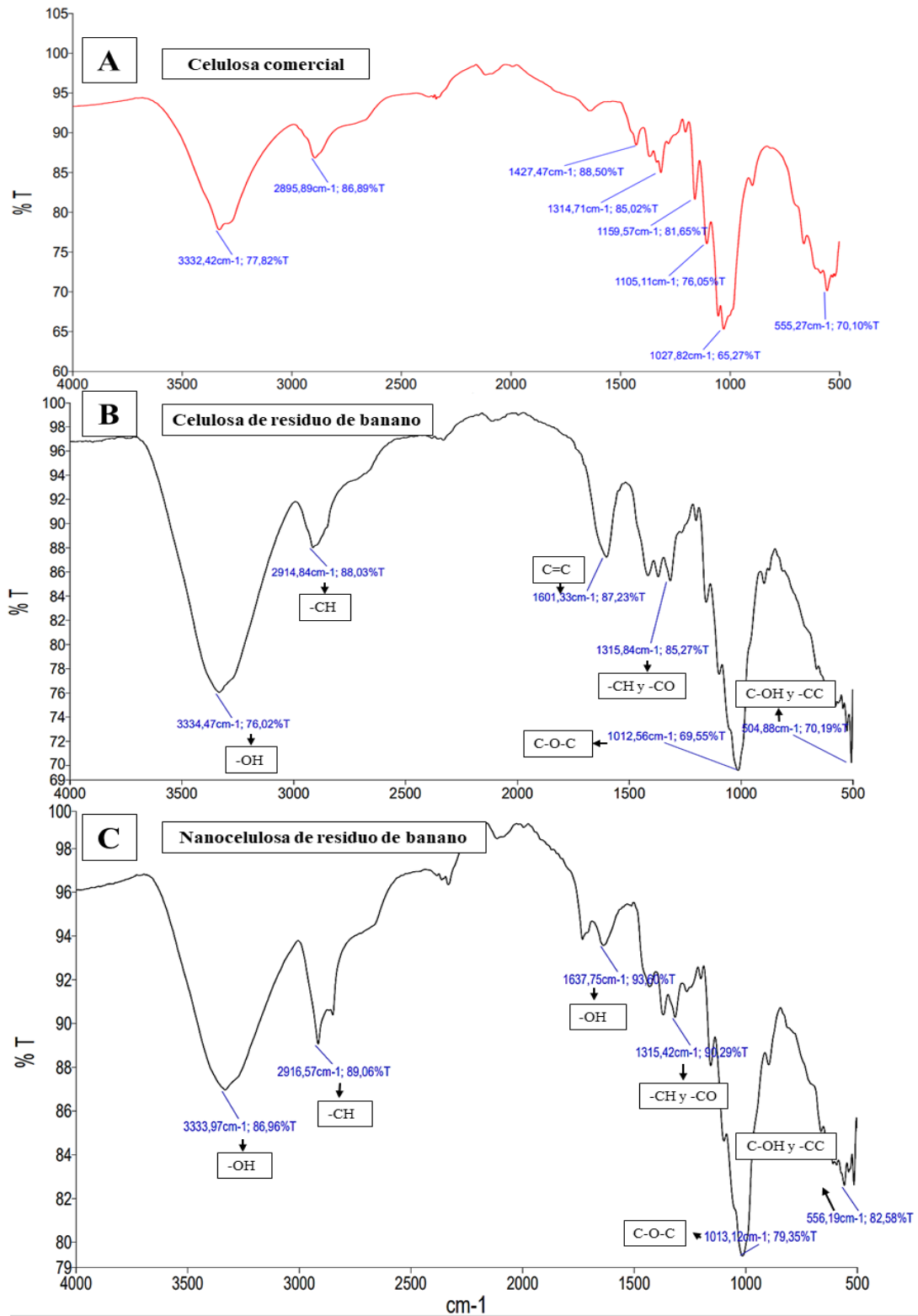


Figura 5. Resultado de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de celulosa comercial, y celulosa y nanocelulosa extraída de residuos de banano.

Comparación de los grupos funcionales presentes en el espectro de (A) celulosa comercial (AVICEL) con los de (B) celulosa y (C) nanocelulosa extraídas de residuos de banano.

Según **Li et al., (2021b)**, las vibraciones en el rango 3500 y 3300 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento del enlace $-\text{OH}$, en este caso el pico en los tres espectros se halla en 3332.42 cm^{-1} , 3334.47 cm^{-1} y 3333.97 cm^{-1} indicando la presencia del grupo hidroxilo. De acuerdo a la investigación de **Subramanian et al., (2019)**, las bandas dentro del rango 3000 y 2800 cm^{-1} corresponden al estiramiento del enlace $-\text{CH}$ de los compuestos alifáticos, en los grupos metilo ($-\text{CH}_3$) y metileno ($-\text{CH}_2$) de celulosa (**Gond et al., 2021**), en este caso, dicho enlace característico se encuentra en las tres muestras. La banda alrededor de 1601.33 cm^{-1} en el espectro de la celulosa extraída de residuos de banano se asocia con la vibración de estiramiento del enlace $\text{C}=\text{C}$ del anillo aromático presente en la lignina, indicando la presencia de residuos de este compuesto no celulósico (**Mandal & Chakrabarty, 2011**). Cabe mencionar que, a diferencia del espectro de celulosa extraída de residuos de banano, en el análisis de la nanocelulosa, no se evidenció la banda asociada al estiramiento del enlace $\text{C}=\text{C}$ del anillo aromático de la lignina (1601.33 cm^{-1}) indicando que después del proceso de hidrólisis ácida fue posible eliminar restos de compuestos no celulósicos. Para **Soni et al., (2019)**, las vibraciones alrededor de 1637.75 cm^{-1} en el espectro de nanocelulosa se puede relacionar a la curvatura del enlace $-\text{OH}$ del agua absorbida, ya sea porque la muestra presentaba humedad. En cuanto a las longitudes de onda en 1314.71 cm^{-1} , 1315.84 cm^{-1} y 1315.42 cm^{-1} en los espectros, están relacionados con la vibración de los enlaces $-\text{CH}$ y $-\text{CO}$ del grupo metileno, metilo y de los anillos aromáticos de polisacáridos en la celulosa (**Cichosz & Masek, 2019**).

Según **Solis et al., (2019)**, la banda en 1027.82 cm^{-1} , 1012.56 cm^{-1} y 1013.12 cm^{-1} se atribuye al estiramiento del enlace glicosídico $\text{C}-\text{O}-\text{C}$, que conecta las unidades de glucosa para formar la estructura lineal de la celulosa, dicha longitud de onda también se encuentra en la celulosa comercial. Por último, las bandas en 555.27 cm^{-1} , 504.88 cm^{-1} y 556.19 cm^{-1} se asocian a la vibración de los enlaces $\text{C}-\text{OH}$ y $-\text{CC}$ que intervienen en la conectividad de los átomos en la molécula de celulosa para la formación de la estructura tridimensional (**Cichosz & Masek, 2019**). La presencia de enlaces glicosídicos es evidencia de una estructura de celulosa, dado que, estos enlaces unen átomos de carbono anoméricos de sacáridos para formar polisacáridos. En el estudio de **Li et al., (2021b)**, se destaca que el proceso crucial de aislamiento de nanocelulosa consiste en abrir la estructura unida al hidrógeno y romper el enlace glicosídico,

disminuyendo su disponibilidad y perturbando la aparición de las bandas que se asocian a este enlace.

La ausencia de las bandas en 1427.47 cm^{-1} ($-\text{CH}_2$), 1159.57 cm^{-1} (C-O-C) y 1105.11 cm^{-1} (CO) en los espectros de celulosa y nanocelulosa extraídas de residuos de banano, indican que en estas longitudes la disposición de los grupos metileno, éter y carbonilo no fueron suficientes para generar una banda. Cabe mencionar que, durante el proceso de extracción, la estructura de celulosa se pudo ver afectada, provocando cambios en las vibraciones moleculares, dado que, el ácido sulfúrico ataca principalmente los grupos $-\text{OH}$ y C-O-C (Li et al., (2021b)

Según Vijayan et al., (2022), la ausencia de bandas en el rango de 1300 y 1200 cm^{-1} para lignina y entre 1800 y 1700 cm^{-1} para hemicelulosa indican la eliminación de estos compuestos, aunque no completa, ya sea, por las condiciones de los tratamientos químicos.

Tras los tratamientos químicos y mecánicos se logró extraer nanocelulosa de los residuos de banano, lo cual, se verificó con las pruebas realizadas. De este modo, se contó con el biomaterial para su uso en diversas aplicaciones, como es en el campo biomédico para la elaboración de andamios biológicos.

3.1.2. Elaboración de un andamio biológico a partir de nanocelulosa vegetal mediante liofilización

Mediante liofilización se obtuvo ABs de nanocelulosa, quitosano e híbridos (nanocelulosa/quitosano). Cabe mencionar que, se elaboraron dichos andamios con el objetivo de evaluar las características de la nanocelulosa frente a otros biopolímeros, como el quitosano, y su interacción al combinarse con otros materiales.

Según **Cheah et al., (2023)**, el quitosano, un polisacárido derivado de la desacetilación de la quitina, posee propiedades antimicrobianas, analgésicas, hemostáticas, es biodegradable, no citotóxico y biocompatible, sin embargo, los andamios a base de este biopolímero, tienen poca resistencia y flexibilidad. Por lo cual, deben mezclarse con otros biopolímeros biocompatibles para crear un andamio ideal para la ingeniería de tejidos. En la investigación de **Mombini et al., (2019)**, indica que, los andamios híbridos a base de quitosano proporcionan mejores propiedades mecánicas, una estructura de red más rígida, un mejor crecimiento y proliferación de células madres mesenquimales (MSC) y una alta viabilidad celular. De acuerdo con **Christy et al., (2022)**, para potenciar las propiedades de los biopolímeros, estos se mezclan con nanomateriales, como la nanocelulosa, que es capaz de interconectar eficazmente en compuestos, para crear macro y micro estructuras porosas que pueden desarrollar y regenerar nuevos tejidos como el hueso, cartílagos y dientes. Dado que, la nanocelulosa es un material celulósico con unidades hidroxilo que establecen conexiones inter e intrahidrógeno, dan lugar a una alta calidad mecánica y a un contacto firme con las células humanas.

Con el fin de mejorar la red porosa tridimensional del andamio y el entrecruzamiento de los biopolímeros utilizados, se adiciona agarosa a la solución, ya que durante el proceso de reticulación térmica de este biopolímero favorece la formación de una estructura tridimensional estable (**Samrot et al., 2023**). Esto ayuda a mejorar la permeabilidad del andamio y una adecuada difusión de oxígeno, agua y nutrientes vitales para el crecimiento, diferenciación y proliferación celular (**Zarrintaj et al., 2018**). La combinación de la agarosa con otros biomateriales como el colágeno, quitosano y celulosa aumenta la afinidad celular. También ha permitido la generación de andamios con alta versatilidad para diferentes tipos de tejidos blandos (**Irastorza-Lorenzo et al., 2021**). Debido a su adecuada biocompatibilidad, degradabilidad, solubilidad en agua, propiedades no inmunogénicas, la agarosa ha sido utilizada ampliamente en la elaboración de andamios (**Salati et al., 2020**).

La solución con los polímeros se vertió en placas Petri, en un volumen total de 30 mL para cada placa. Posteriormente pasaron por un proceso de ultracongelación por 24 h,

seguido de liofilización de igual forma por 24 h, obteniendo andamios completamente secos como se observan en la **Figura 6**. De acuerdo con **Nowak & Jakubczyk (2022)**, la ultracongelación permite que el agua u otros disolventes se transformen en cristales de hielo sólido, para que, en el proceso de liofilización, el hielo formado se elimine por sublimación. Cabe señalar que, la cinética de nucleación del hielo y el crecimiento de los cristales son determinantes en el estado físico y morfológico del producto final, permitiendo la obtención de una estructura porosa en los andamios.

Los ABs de nanocelulosa y los ABs de nanocelulosa/quitosano presentaron una coloración blanquecina, mientras que, los ABs de quitosano una coloración ligeramente amarillenta. También se evidenció que los ABs de nanocelulosa eran más blandos en comparación con los ABs de quitosano que eran duros y rígidos, sin embargo, los ABs híbridos presentaron una buena rigidez facilitando su manipulación durante la caracterización.

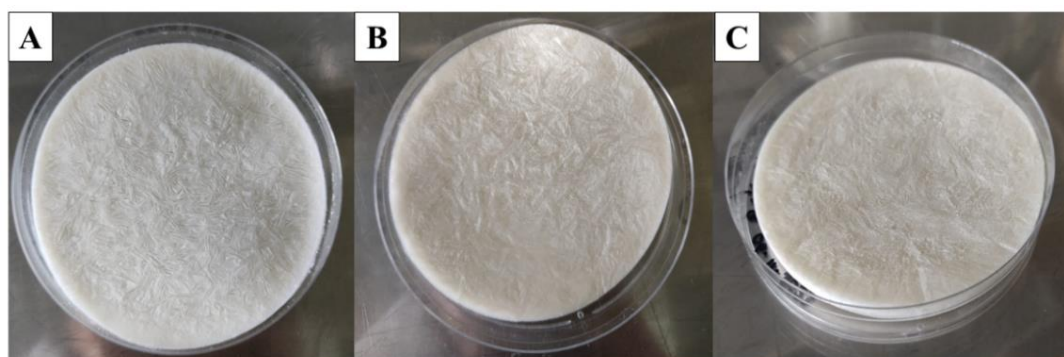


Figura 6. *ABs elaborados por liofilización.*

Andamios biológicos obtenidos después del proceso de liofilización en placas Petri: (A) AB de nanocelulosa (0.30 g del biopolímero). (B) AB de quitosano (0.30 g del biopolímero). (C) AB de nanocelulosa/quitosano (0.15 g por cada biopolímero).

3.1.3. Evaluación de los andamios elaborados mediante pruebas morfológicas y biológicas

3.1.3.1. Evaluación morfológica de andamios biológicos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

La arquitectura de los andamios influye en el destino celular, por tal motivo, una adecuada red porosa e interconectada es un parámetro importante para la difusión de nutrientes, adhesión, proliferación y migración celular al momento de la vascularización y formación de nuevos tejidos (Zhou et al., 2023). Durante el diseño y fabricación, la porosidad final del andamio y el tamaño del poro se debe tener cuenta. Cabe mencionar que, a mayor cantidad de poros en el andamio, las propiedades mecánicas como la resistencia y rigidez disminuirán, haciendo que el material se vuelva vulnerable al rompimiento (Yadav et al., 2021b).

Según Winnett et al., (2022), lo ideal es que los ABs tengan una red porosa interconectada de macroporos en un rango de 100 y 900 μm para que las células, nutrientes y metabolitos se infiltren completamente en la estructura y a su vez ayuden a la proliferación celular. Además, de una red de microporos entre 2 y 20 μm para la adhesión celular y para mejorar la vascularización.

En la **Figura 7**, se presentan las micrografías SEM de la superficie (**A, B y C**) y parte interior (**D, E y F**) de la muestra de AB de nanocelulosa, pudiendo determinar el tamaño de poro en valores entre 71 y 320 μm y un tamaño promedio de 133.33 ± 55.68 μm tomando como referencia las micrografías con la escala de 100 μm (553x), dado que, se pudieron observar mejor los poros para su medición. Se identificó macroporos y microporos, algunos de ellos interconectados. Según Rizal et al., (2021), las fibras de nanocelulosa no se adhieren fácilmente entre sí, lo cual, explica la formación de macroporos (> 100). Además, durante el proceso de liofilización, las nanofibras tienden a reorganizarse y formar poros de mayor tamaño (450 a 500 μm) (Abdul et al., 2021). En cuanto a los microporos, dado que el andamio fue completamente de nanocelulosa, la concentración del biopolímero fue mayor, en donde las disposiciones de las fibras más delgadas forman poros pequeños (< 50), pero en menor proporción dando lugar a una estructura porosa interconectada (Radakisnin et al., 2021). En la micrografía, también se aprecia que la pared de los poros es rugosa (**Figura 7A, B, D**

y E). Para Naseri et al., (2016), las nanoestructuras fibrosas dan lugar a la rugosidad de la pared de los poros, lo cual, ayuda a la fijación celular y al desarrollo de la matriz extracelular después de la implementación. Esto se debe a que una superficie más rugosa favorece la vascularización, tasa de difusión para un correcto suministro de oxígeno, nutrientes y la eliminación de desechos hacia y desde el andamio.

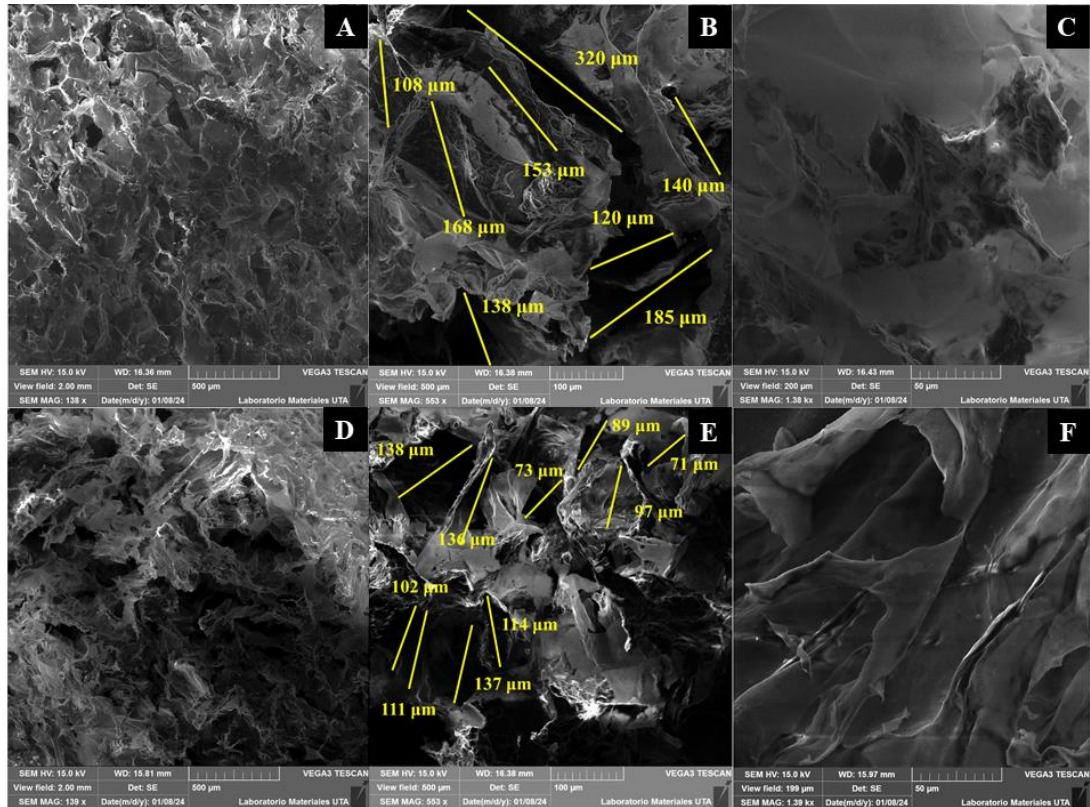


Figura 7. Evaluación morfológica de los ABs de nanocelulosa liofilizados.

Micrografías de la porosidad de los ABs de nanocelulosa con SEM (A, B, C) de la superficie a MAG de 138 x, 553 x y 1.38 kx y (D, E, F) del corte transversal a MAG de 139 x, 553 x y 1.39 kx. Las imágenes fueron obtenidas en los Laboratorios Materiales UTA.

En cuanto a la morfología y tamaño de poro de los ABs de quitosano, en la **Figura 8** se muestran las micrografías de la superficie (A, B y C) y parte interior (D, E y F) de la muestra de AB, pudiendo determinar el tamaño del poro entre 31 y 161 μm y un tamaño promedio de $69.92 \pm 42.27 \mu\text{m}$ tomando como referencia las micrografías con la escala a 100 μm (553x), dado que, se identificaron mejor los poros para su medición. En este tipo de andamio, se apreció una mayor cantidad de microporos, mientras que, los macroporos en menor proporción. De acuerdo al estudio de Ikeda et al., (2014),

los andamios con una mayor concentración de quitosano presentan un tamaño promedio de poro de $74.5 \mu\text{m}$, en comparación con aquellos que tienen menor concentración con un tamaño de poro promedio de $158.5 \mu\text{m}$. Lou et al., (2013), menciona que, a mayor concentración de quitosano la viscosidad aumenta, impidiendo una correcta distribución de cristales de hielo, por ende, el tamaño de poro es menor. La concentración del biopolímero también da lugar a que la pared de los poros sea más gruesa y la morfología de la superficie más densa. Por tal motivo, para mejorar las propiedades de los andamios es recomendable la combinación con otros biopolímeros.

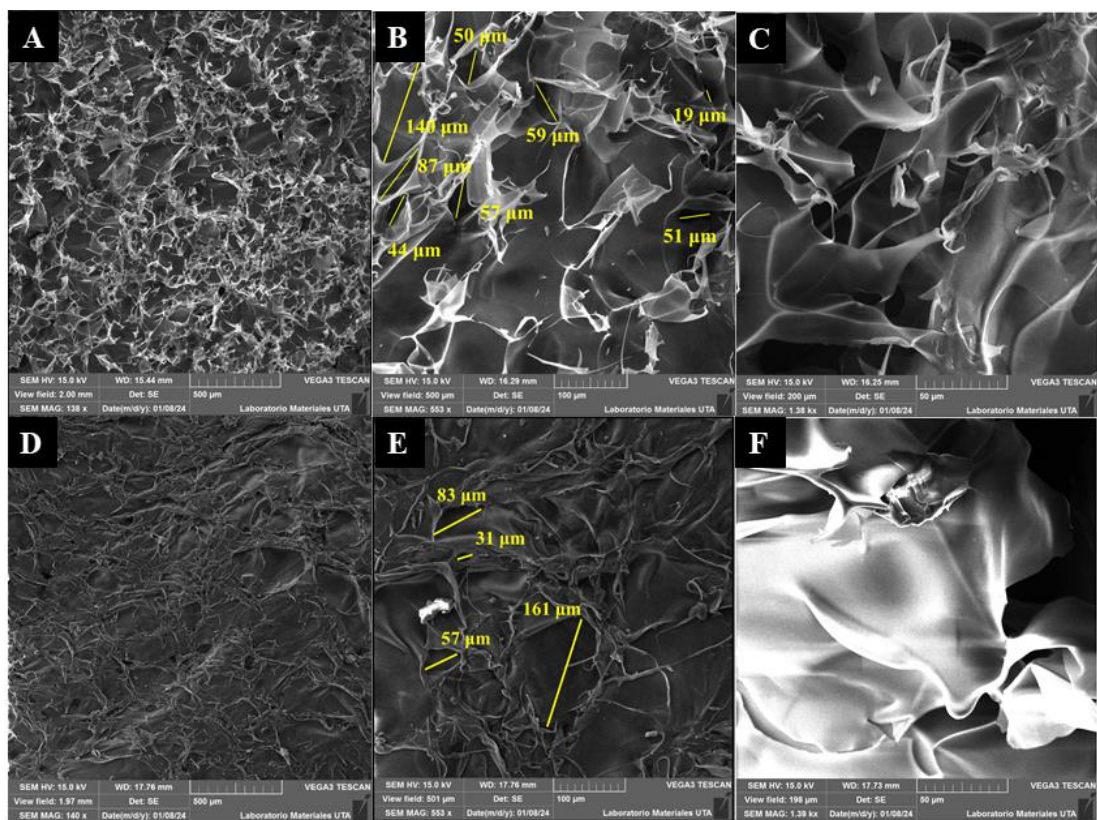


Figura 8. Evaluación morfológica de los ABs de quitosano liofilizados.

Micrografías de la porosidad de los ABs de quitosano con SEM (A, B, C) de la superficie a MAG de 138 x, 553 x y 1.38 kx y (D, E, F) del corte transversal a MAG de 140 x, 553 x y 1.39 kx. Las imágenes fueron obtenidas en los Laboratorios Materiales UTA.

En la **Figura 9**, se presentan las micrografías SEM de la superficie (A, B y C) y parte interior (D, E y F) de la muestra del AB de nanocelulosa/quitosano, pudiendo determinar el tamaño del poro en valores entre 67 y $163 \mu\text{m}$ y un tamaño promedio de

110.13 ± 33.29 μm tomando como referencia las micrografías con la escala a 100 μm (554x), dado que, se pudieron identificar mejor los poros para su medición. Según el estudio de **Radakisnin et al., (2021)**, la elaboración de andamios compuestos de nanocelulosa mejora la homogenicidad de la estructura llevando a una reducción del tamaño de los poros. Se produce el entrecruzamiento de las nanofibras con el quitosano, dando lugar a una mejor reorganización y ayudando a la formación de poros más pequeños en comparación con los ABs de nanocelulosa y poros más grandes en comparación a los ABs de quitosano (**Naseri et al., 2016**). Además, la nanocelulosa contribuye a la rugosidad de la superficie de los andamios, lo cual, es beneficioso para la generación de la matriz extracelular (ECM). Cabe mencionar que, el tamaño de poro también se atribuye a los cambios en la viscosidad influenciado por la cantidad de nanocelulosa, lo cual, refleja los fuertes efectos de refuerzo que genera este biopolímero en la estructura de los poros y su influencia en la adhesión y proliferación celular (**Radakisnin et al., 2021**). Para **Abdul et al., (2021)** una buena interconectividad de los poros conduce a un mejor suministro de nutrientes e intercambio de fluidos. La composición de biomateriales con nanocelulosa proporciona un entorno adecuado y propicio para la unión y proliferación celular, debido a una mejor interacción célula-andamio. Los macroporos (>100) en los ABs de nanocelulosa/quitosano son favorables para la penetración, migración y proliferación celular, mientras que, los microporos (<50) proporcionan un intercambio favorable de nutrientes y productos de desechos del mecanismo celular (**Tang et al., 2017**).

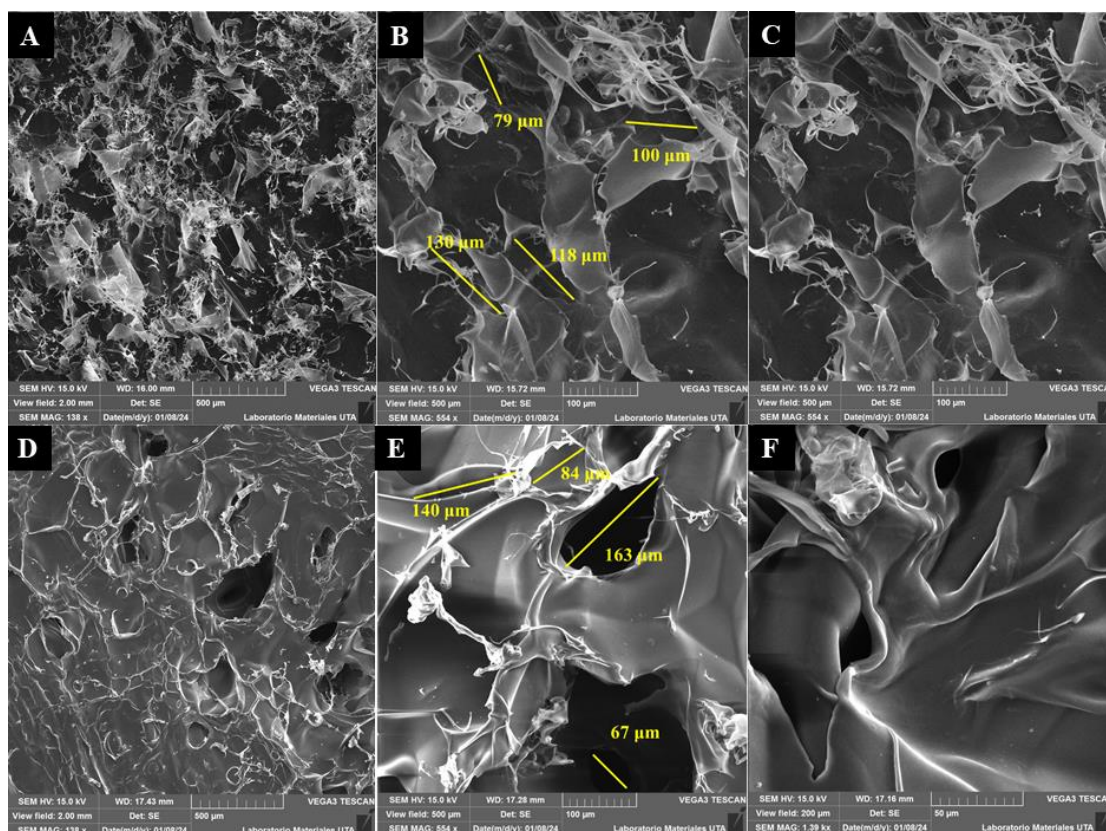


Figura 9. Evaluación morfológica de los ABs de nanocelulosa/quitosano liofilizados. Micrografías de la porosidad de los ABs híbridos con SEM (A, B, C) de la superficie a MAG de 138 x, 554 x y 1.38 kx y (D, E, F) del corte transversal a MAG de 138 x, 554 x y 1.39 kx. Las imágenes fueron obtenidas en los Laboratorios Materiales UTA.

De acuerdo a la investigación de **Oryan & Sahviah (2017)**, la cicatrización de heridas es un proceso dinámico que consta de cinco fases secuenciales: hemostasia, inflamación, migración, proliferación y maduración. Las heridas críticas necesitan técnicas de ingeniería de tejidos, como el uso de andamios. Los ABs deben tener una porosidad uniforme con poros de tamaño macro y micro. Los microporos ayudan a la comunicación entre células y los macroporos favorecen el crecimiento y la migración de células mesenquimales y vasos sanguíneos de la piel. Las heridas graves necesitan la eliminación del tejido necrótico y deben cubrirse con un injerto adecuado que proporcione reemplazo de piel y estimule el proceso de curación.

Por tal motivo, **Hosseini & Shafiee (2021)**, mencionan que, en la regeneración del tejido cutáneo, los poros con un tamaño entre 20 y 120 μm permiten un crecimiento

adecuado del tejido al igual que el transporte de oxígeno y nutrientes. Además, **Torres-Sánchez et al., (2017)**, en su estudio mencionan que, los andamios con poros entre 45 y 106 μm presentan una mayor adhesión celular, mientras que, los andamios con poros mayores a 300 μm proporcionan un espacio para el crecimiento interno, favorecen la proliferación celular y vascularización.

Según **Murphy & O'Brien (2010)**, en la regeneración ósea el requisito mínimo del tamaño del poro oscila entre 75 y 100 μm y con un rango óptimo de 100 a 135 μm para una correcta infiltración y migración de células de osteoblastos. Sin embargo, los poros mayores a 300 μm ayudan a la vascularización y al crecimiento óseo. En la investigación de **Abbasi et al., (2020)**, se señala que los osteoblastos tienen un tamaño aproximadamente entre 10 y 50 μm , pero para la regeneración del hueso mineralizado después de la implementación, los osteoblastos prefieren poros más grandes entre 100 y 200 μm . Esto ayuda a la infiltración de los macrófagos, eliminación de bacterias y la infiltración de otras células que intervienen en el proceso de colonización, migración y vascularización *in vivo*.

En la artritis, la pérdida de cartílago es la característica más destacada, ya que, la regeneración del cartílago es un proceso difícil y tedioso. Es así que gracias a los logros biotecnológicos se han podido sugerir una amplia variedad de andamios y diversas fuentes de MSC para la regeneración del tejido conectivo, particularmente del cartílago. Se ha demostrado que andamios con tamaños de poro entre 200 a 400 μm y con forma ovalada a redonda ayudan al funcionamiento de los osteoblastos y a la diferenciación de los condrocitos, además aquellos andamios que poseen macroporos que oscilan entre 150 y 355 μm y que están interconectados con microporos ($< 50 \mu\text{m}$) favorecen el crecimiento interno en el tejido fibrocartilaginoso, evitando la degeneración del cartílago articular (**Bružauskaitė et al., 2016**).

En base a los resultados obtenidos, los ABs de nanocelulosa presentan mayor cantidad de macroporos con microporos interconectados, con una superficie rugosa adecuada para el crecimiento celular. Los ABs de quitosano tienen una estructura menos porosa debido a la viscosidad de la solución impidiendo la formación de una estructura porosa,

además, las paredes de los poros son lisas, lo cual, puede afectar la unión celular. Finalmente, en los ABs de nanocelulosa/quitosano, la combinación de los biopolímeros permitió obtener una estructura homogénea con macro y microporos interconectados debido al entrecruzamiento de los biopolímeros, además de una superficie rugosa adecuada para el proceso de regeneración del tejido.

3.1.3.2. Evaluación de la porosidad

La porosidad indica el porcentaje de vacíos que posee una estructura porosa y que a la vez afecta el crecimiento celular. Según **Lutzweiler et al., (2020)**, la mayoría de los andamios poseen porosidades entre el 70 y 90 %. Los ABs con porosidades bajas tienen una superficie mayor siendo favorable para una correcta unión celular, mientras que, los ABs con altas porosidades, tienden a presentar una densidad celular menor retrasando la proliferación celular. Sin embargo, una mayor porosidad permite una correcta difusividad de nutrientes y una mayor permeabilidad de agua.

La determinación del porcentaje de porosidad en los diferentes tipos de ABs se realizó mediante el método de infiltración del material o desplazamiento del líquido empleando alcohol deshidratado (etanol). Este es un líquido apolar que no disuelve las fibras poliméricas y es capaz de penetrar fácilmente los poros sin causar contracción ni hinchamiento del andamio (**Pooshidani et al., 2021**).

En la **Figura 10**, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de porosidad, en donde los ABs de nanocelulosa mostraron el 89.38 ± 0.90 %, los ABs de quitosano un 87.72 ± 0.70 % y los ABs híbridos un 88.94 ± 0.77 % de porosidad. Estos resultados se compararon con un análisis de varianza ANOVA, mediante el cual, se identificó que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p\text{-value} > 0.05$) entre la media del % de porosidad entre un tipo de andamio y otro, con un nivel del 95 % de confianza. Sin embargo, comparando las medias entre grupos de andamios, se identificó, que entre los ABs de nanocelulosa y ABs de quitosano si presentan diferencias significativas (**ANEXO I**). La diferencia entre los valores obtenidos se

puede atribuir a los errores de medición en el método de infiltración con etanol, ya que, tiene una alta tasa de evaporación (Pooshidani et al., 2021).

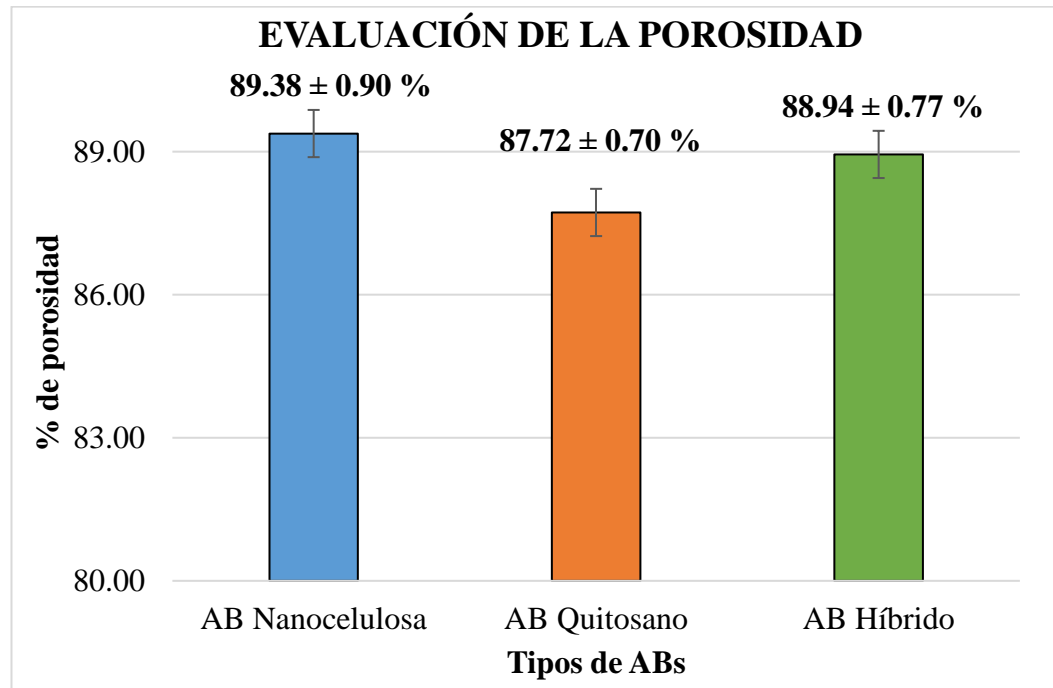


Figura 10. Porcentaje de porosidad de los andamios biológicos liofilizados.

Mediante el método de infiltración con etanol, se obtuvo un porcentaje promedio de porosidad para los ABs de nanocelulosa del 89.38 ± 0.90 %, los ABs de quitosano con 87.72 ± 0.70 % y los híbridos con 88.94 ± 0.77 %. No existe diferencia significativa entre los ABs con un nivel del 95 % de confianza.

Según Ferreira et al., (2023), en su estudio sobre materiales porosos de nanocelulosa, explica que, los andamios a base de este biopolímero poseen una porosidad del 89 %, en donde la porosidad, alineación de los poros y las propiedades mecánicas se ajustan controlando la velocidad de enfriamiento durante el proceso de liofilización. Además, Rizal et al., (2021) en su investigación menciona que, los ABs de nanocelulosa debido a la débil adhesión de las nanofibras entre sí, estos presentan una mayor porosidad. En cuanto a los ABs de quitosano, en un estudio realizado por Ikeda et al., (2014), demostró que, los ABs a base de este biopolímero con diferentes concentraciones presentaron una porosidad entre el 75 al 85 %. Se observó que, a medida que aumentaba la concentración de quitosano la porosidad disminuía. Debido

a que el aumento en la viscosidad de la solución da lugar a la formación de agregados que afectan drásticamente la porosidad.

Aunque no existieron diferencias significativas con la porosidad de los ABs híbridos, de acuerdo al estudio realizado por **Rizal et al., (2021)**, una mejora en la porosidad de los ABs de quitosano al mezclarse con nanocelulosa, ocurre por una mejor interconexión de las nanoestructuras de nanocelulosa y quitosano, ya que, estas se entrecruzan y optimizan las interacciones entre los bloques de construcción.

De acuerdo con el estudio de **Ferreira et al., (2023)** sobre ABs híbridos de nanocelulosa/alcohol polivinílico (PVA) para la regeneración del tejido de la piel y curación de heridas, la porosidad de estos andamios se encontró en un rango de 88 y 95 %, en donde, la estructura proporcionó un microambiente ideal para que los fibroblastos y queratinocitos se adhieran y proliferen adecuadamente.

Según **Nosrati et al., (2021)**, los ABs con una porosidad que oscila entre el 60 y 90 % son considerados aptos para la curación de heridas, dado que, son capaces de proporcionar una estructura idónea para el intercambio de oxígeno, nutrientes, para la actividad celular y para la producción de una nueva ECM.

En cambio, para el tejido óseo, de acuerdo a las investigaciones de **Abbasi et al., (2020)**, se requiere una porosidad mayor al 90 % para asegurar una adecuada diferenciación, formación y desarrollo del tejido o también conocido como el proceso de osteogénesis. Un punto que se debe considerar, es que el tipo de polímero también afecta la porosidad, interconectividad, tamaño de poros y las propiedades del andamio.

En base a los resultados, los ABs de nanocelulosa son altamente porosos debido a la falta de adhesión de las fibras entre sí, los ABs de quitosano debido a la viscosidad de la solución disminuyen su porosidad y los ABs híbridos mejoran la porosidad debido al entrecruzamiento e interacción entre las estructuras de los biopolímeros. Como consecuencia, la porosidad de los ABs híbridos disminuyen en comparación a la

porosidad de los ABs de nanocelulosa y aumentan en relación con los de quitosano. Sin embargo, los tres tipos de ABs obtuvieron un % de porosidad apto para su aplicación en la regeneración del tejido de la piel y óseo.

3.1.3.3. Evaluación de la capacidad de absorción de agua

El potencial de hinchazón de los andamios, indica la capacidad que estos tienen para retener agua en su estructura, sin embargo, esta característica no solo afecta la morfología y la estructura del andamio, sino también a las células en crecimiento. Una adecuada absorción, revela que el andamio es capaz de prevenir la pérdida de líquidos y nutrientes necesarios para el crecimiento celular (**Yang et al., 2010**). Según **Norsati et al., (2021)**, los andamios deben proporcionar un ambiente húmedo para prevenir la deshidratación de la herida y a la vez eliminar los excesos de exudados de la herida.

La capacidad de absorción de agua se determinó en relación al hinchamiento de los diferentes tipos de ABs, para lo cual, se realizaron mediciones de los pesos de los andamios sumergidos en agua durante 6 h en intervalos de 30 min. En la **Figura 11**, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad de absorción de agua, en donde los ABs de nanocelulosa alcanzaron un hinchamiento del 2084.68 ± 352.04 %, los ABs de quitosano 2524.31 ± 244.54 % y los ABs híbridos un 2418.33 ± 221.00 %. Mediante el análisis de varianza ANOVA, se determinó que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$) entre la media del % de Absorción de agua entre un Tipo de Andamio y otro, con un nivel del 95 % de confianza. Las principales diferencias significativas existieron al comparar las medias de los % de porosidad de los ABs de nanocelulosa con los ABs de quitosano y entre los % de los ABs de nanocelulosa con los ABs híbridos. Mientras que, al comparar los % de porosidad de los ABs de quitosano con los ABs híbridos, se identificó como un grupo homogéneo sin una diferencia significativa (**ANEXO I**).

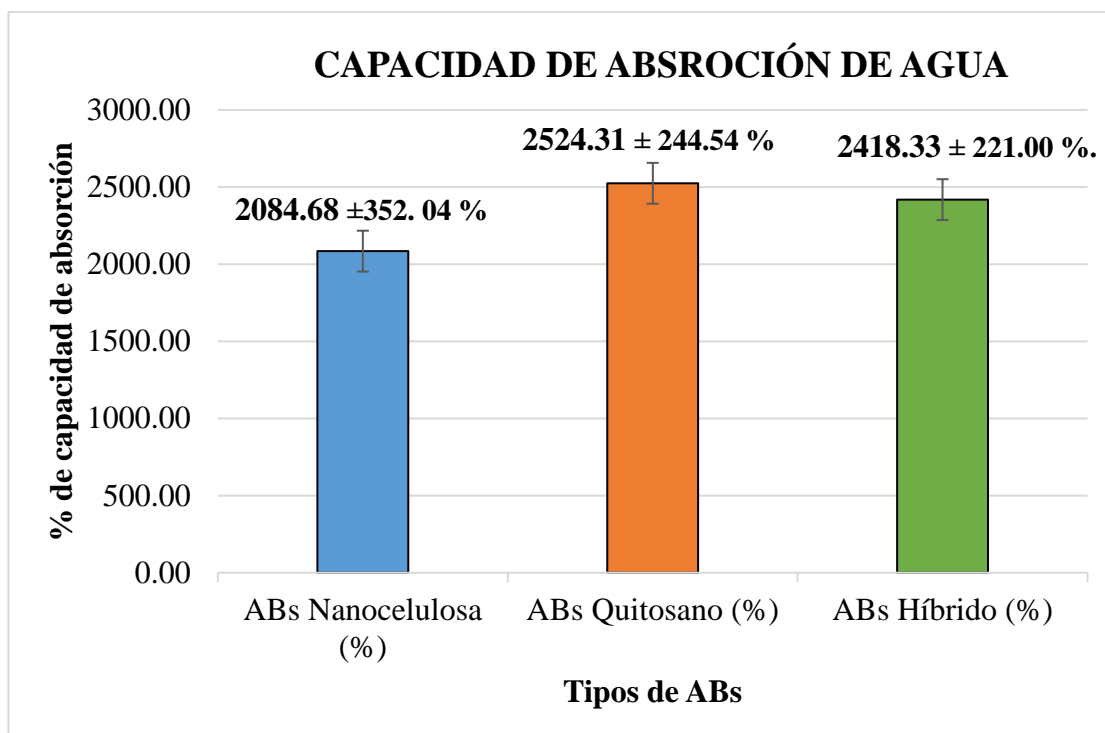


Figura 11. Porcentaje de la capacidad de absorción de agua de los ABs.

Mediante el método de hinchamiento con agua destilada, se obtuvieron los siguientes resultados sobre el porcentaje de absorción de agua: los ABs de nanocelulosa con 2084.68 ± 352.04 %, los ABs de quitosano con 2524.31 ± 244.54 % y los híbridos con 2418.33 ± 221.00 %. Estos resultados mostraron una diferencia significativa entre los ABs con un nivel del 95 % de confianza.

De acuerdo con la investigación de **Patel et al., (2021a)**, una buena eficiencia en el hinchamiento de los andamios de nanocelulosa, se debe a la disponibilidad de grupos hidroxilos en la estructura del biopolímero, dando lugar a la formación de enlaces de hidrógeno, facilitando la retención de agua en la estructura porosa. En el estudio de **Nwe et al., (2009)**, mencionan que, el tamaño de los poros, la porosidad y el patrón de distribución de los poros en el andamio afectan la absorción de agua. Cabe mencionar que, la nanocelulosa en agua, se puede dispersar y generar suspensiones estables, lo cual, podría afectar la capacidad de absorción. Los resultados de absorción de agua de los ABs de nanocelulosa, se compararon con los resultados obtenidos por **Lackner et al., (2022)**, en su estudio sobre andamios de nanocelulosa como portadores para inmovilizar la enzima glicosiltransferasa, en donde obtuvieron que los andamios sin la enzima presentaron una mejor absorción de aproximadamente 1570 ± 40 %, en cambio

aquellos reticulados con la enzima, disminuyeron su porosidad impidiendo la penetración de agua en la estructura del andamio.

Se identificó que los ABs de quitosano presentaron una mayor absorción de agua con respecto a los demás ABs. Esto ocurre porque el quitosano contiene en su estructura el grupo hidroxilo (-OH) y amina primaria (-NH₂), ayudándolo a aumentar su afinidad por el agua, por la formación de enlaces de hidrógeno (**Yang et al., 2010**). Según **Rodríguez-Vázquez et al., (2015)**, cuando los ABs de quitosano se colocan en medios líquidos, las membranas de quitosano se hinchan y retienen un volumen de agua determinado que se encuentra absorbido en el medio de la red tridimensional. Para ser utilizados con fines biomédicos, deben absorber líquido del cuerpo para la transferencia celular, además deben permitir una distribución adecuada de nutrientes, metabolitos y factores de crecimiento, a través de medios extracelulares.

En cuanto a los ABs híbridos, la combinación de la nanocelulosa y quitosano, genera una alta eficiencia de hinchamiento en este tipo de andamios, lo que se atribuye a que la nanocelulosa al ser un compuesto hidrofílico, actúa como un agente de conexión entre las cadenas poliméricas, mejorando la resistencia para una adecuada absorción y retención de agua en la estructura (**Patel et al., 2021a**). De igual forma, el quitosano es capaz de formar enlaces de hidrógeno con otros biopolímeros debido a la presencia de los grupos polares (-OH y -NH₂) en su estructura (**Felfel et al., 2019**). De acuerdo al estudio de **Ooi et al., (2020)**, en donde elaboraron andamios de nanoceulosa/colágeno para el tratamiento de heridas, obtuvieron una tasa de hinchamiento superior a 1500 % alcanzando aproximadamente $2037,97 \pm 125,94$ % de absorción de agua.

La capacidad de absorción de agua está relacionada con el tamaño, distribución e interconexión de los poros y la capacidad de los biopolímeros para formar enlaces hidrógenos, los cuales ayudan a mejorar la afinidad con el agua y a la vez a una mejor retención en la estructura tridimensional. Esto asegura un ambiente húmedo ideal para la migración de células epidérmicas y la aceleración del proceso de reepitelización de la herida.

3.1.3.4. Evaluación de la biodegradabilidad

Los biomateriales deben tener la capacidad de degradarse *in vivo* con el tiempo, para que los nuevos tejidos puedan crecer y reemplazar las funciones fisiológicas de los tejidos viejos (Zhou et al., 2023). El tamaño de los poros interviene en el proceso de degradación de los andamios. Una mayor porosidad conduce a una mayor permeabilidad y reducción a la resistencia de compresión promoviendo el proceso de degradación del andamio (Abbasi et al., 2020). De acuerdo con Liu et al., (2018), la velocidad de degradación del andamio, debe ser proporcional a la velocidad de regeneración del tejido.

Las serina proteasas y las metaloproteinasas de matriz, son ejemplos de enzimas presentes en las lesiones. Estas enzimas destruyen el tejido dañado, limpiándolo de productos de degradación de proteínas y a la vez permitiendo la formación del nuevo tejido. En este sentido, se espera que las enzimas interactúen con el andamio como sustrato, dando como resultado su biodegradación (Egorikhina et al., 2021).

Con el fin de simular las condiciones en el cuerpo humano, se utilizó plasma sanguíneo, un fluido biológico que se componen principalmente de coagulantes como el fibrinógeno; proteínas plasmáticas como la albúmina y globulina, que ayudan a mantener la presión osmótica; electrolitos como el sodio, bicarbonato, calcio, cloruro y potasio que ayudan a mantener el pH sanguíneo; inmunoglobulinas para combatir infecciones y enzimas (Mathew et al., 2023).

Dado que, los andamios no se lograron degradar completamente durante los 7 días, se consideró realizar la prueba hasta se degraden completamente. De acuerdo a los datos obtenidos y al análisis de varianza ANOVA, se identificó que existe diferencia estadísticamente significativa ($p\text{-value} < 0.05$) entre la media del % de biodegradación entre un tipo de andamio y otro, con un nivel del 95 % de confianza. Las principales diferencias significativas existieron al comparar las medias de los % de biodegradabilidad de los ABs de nanocelulosa con los ABs de quitosano y entre los %

de los ABs de nanocelulosa con los ABs híbridos. Mientras que, al comparar los % de biodegradabilidad los ABs de quitosano con los ABs híbridos, se identificó como un grupo homogéneo sin diferencia significativa (ANEXO I). En la **Figura 12**, se observa el proceso de degradación de los andamios a lo largo de los días. A los 7 días, los ABs de quitosano tuvieron el 74.48 % de biodegradación, los ABs híbridos el 69.66 % y los ABs de nanocelulosa el 55.28 %. Para el día 14, los ABs de quitosano se degradaron completamente, seguidos por los ABs híbridos en el día 16 y los ABs de nanocelulosa alcanzaron una degradación total para el día 18.

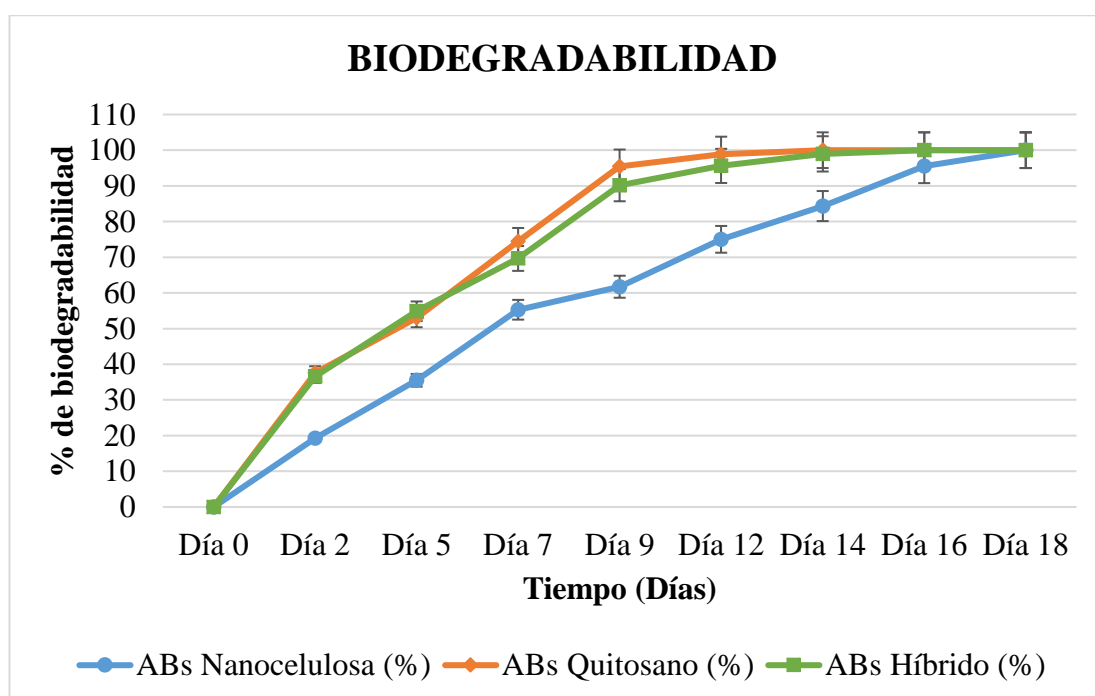


Figura 12. *Biodegradabilidad de los ABs por días.*

La figura muestra los resultados obtenidos en la prueba de biodegradabilidad con plasma sanguíneo hasta que los andamios alcanzaron una degradación completa. Los ABs de quitosano lograron degradarse en 14 días, los ABs híbridos en 16 días y finalmente los ABs de nanocelulosa en 18 días.

Cabe mencionar que, en los primeros días de degradación (día 7 de incubación), la morfología del armazón se mantuvo regular y completa. Sin embargo, en los días posteriores, comenzaron con una ligera desintegración y la textura del andamio empezó a volverse más frágil, dificultando su manipulación.

Según **Abdul et al., (2020)**, la ausencia de enzimas que degraden la celulosa, como la celulasa, hace que los ABs de nanocelulosa tengan una menor velocidad de biodegradación *in vivo* en comparación con los ABs de quitosano. Sin embargo, el plasma al contener entre un 92 % de agua y un 8 % de sólidos, puede dar lugar a una degradación hidrolítica (**Mathew et al., 2023**). Es así que, la nanocelulosa al ser un compuesto hidrolítico, se puede disolver en el agua debido a la formación de puentes de hidrogeno y formar una suspensión, dando lugar a la degradación del andamio. Además, por la falta de adhesión de las fibras de nanocelulosa entre sí, genera una estructura altamente porosa, promoviendo la degradación del andamio.

En el caso del ABs de quitosano, este tuvo una biodegradación más rápida, debido a que, en el plasma sanguíneo está presente la enzima lisozima, una endocarbohidrasa presente en secreciones corporales (**Wrobel et al., 2017**). Según **Kim et al., (2018)**, la lisozima tiene una alta especificidad para hidrolizar el enlace 1,4-beta entre los residuos acetilados, N-acetilglucosamina y N-acetil-D-glucosamina, fragmentándolo en secciones más simples y formando subproductos, la glucosamina, que no es tóxica para las células.

En cuanto a los ABs híbridos, **Riva et al., (2015)**, en su estudio sobre películas de quitosano/nanocelulosa, menciona que, el entrecruzamiento de la nanocelulosa con las cadenas de quitosano da lugar a una estructura más estable con poros interconectados y más pequeños. Esto posibilita la retención de agua, células y fluidos biológicos, lo cual afecta directamente la biodegradabilidad. Además, al estar compuesto por estos dos biopolímeros (nanocelulosa/quitosano) puede ocurrir una degradación hidrolítica y enzimática. Así mismo, los ABs híbridos exhiben un mayor porcentaje de degradación que los ABs de nanocelulosa porque las enzimas se pueden infiltrar y distribuirse mejor por la estructura y no solo por la superficie, generando una mejor degradación del andamio.

Según **Egorikhina et al., (2021)**, una degradación rápida del biomaterial puede afectar la proliferación celular y posteriormente la regeneración del tejido nuevo. Por el contrario, una degradación lenta puede provocar inflamación crónica y cicatrices en el

futuro. Por tal motivo la velocidad de degradación del andamio, debe ser proporcional a la velocidad de regeneración del tejido. Tomando en cuenta que, el tiempo promedio de cicatrización de las heridas es aproximadamente 3 semanas, los ABs de quitosano, al tener una degradación rápida (aprox 7 días) no asegurarían un crecimiento celular adecuado, por el contrario, los ABs de nanocelulosa y los ABs híbridos al presentar una degradación más lenta (entre 16 y 18 días), asegurarían una adecuada adhesión y proliferación celular para la regeneración del tejido (**Liu et al., 2018**).

Los resultados obtenidos revelan que la velocidad de degradación de los andamios depende del biopolímero con el que se elaboró, la porosidad, las enzimas y compuestos con los que el biomaterial va interactuar para la regeneración del tejido u órgano.

Luego de la obtención de nanocelulosa vegetal y su aplicación como biopolímero en la elaboración de andamios biológicos, únicamente de nanocelulosa y combinados de nanocelulosa con quitosano, se identificó mediante las pruebas morfológicas y de biodegradabilidad, que estas estructuras presentan propiedades idóneas para su uso en el campo biomédico. Por lo tanto, se pueden usar en estudios posteriores para evaluar el crecimiento celular.

CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Mediante la evaluación morfológica se evidenció que, tras los tratamientos químicos con NaOH y NaClO, es posible eliminar hemicelulosa, lignina, ceras, grasas y otros componentes no celulósicos, que una vez eliminados ayudan a la desfibrilación de la celulosa. Luego, tras la hidrólisis ácida y el proceso con ultrasonidos se logró la ruptura del enlace glucosídico que une las unidades de glucosa generando fragmentos más pequeños, de este modo, se obtuvo un rendimiento del 23.8 % de nanocelulosa extraída de residuos de banano. En el análisis FT-IR se identificó las bandas correspondientes a los principales grupos funcionales de la celulosa y nanocelulosa, tales como: C-O-C, -OH, -CH, -CO, -CC. Los espectros fueron similares con pequeñas variaciones en la longitud de onda y % de transmitancia, dado que, se analizó la misma muestra, pero en menor tamaño.
- Tras el proceso de liofilización se obtuvieron andamios de nanocelulosa, quitosano e híbridos (nanocelulosa/quitosano) completamente secos. Se elaboraron dichos andamios para la evaluación de las características de la nanocelulosa frente a otros biopolímeros. Los ABs de nanocelulosa presentaron una textura blanda con coloración blanquecina, los ABs de quitosano una textura rígida y dura con coloración amarillenta y los ABs híbridos una textura normal con una coloración ligeramente amarillenta.
- Para que un andamio sea apto para su empleo en IT debe tener una estructura porosa interconectada con un tamaño de poro adecuado dependiendo el tejido, una adecuada porosidad para el transporte de oxígeno, nutrientes y vascularización, y debe degradarse de forma natural en el cuerpo sin la necesidad de un tratamiento invasivo para su extracción. Mediante el análisis SEM y la infiltración con etanol se identificó que los ABs de nanocelulosa

presentan una mayor porosidad con un tamaño de poro promedio de $133.33 \pm 55.68 \mu\text{m}$ y $89.38 \pm 0.90 \%$ de porosidad y los ABs de nanocelulosa/quitosano con un tamaño de poro promedio de $110.13 \pm 33.29 \mu\text{m}$ con el $88.94 \pm 0.77 \%$ de porosidad, en comparación con los ABs de quitosano que resultaron menos porosos con un tamaño promedio de poro de $69.92 \pm 42.27 \mu\text{m}$ con un $87.72 \pm 0.70 \%$ de porosidad. De igual forma los ABs de nanocelulosa y los ABs de nanocelulosa/quitosano presentaron una adecuada tasa de absorción de $2089.68 \pm 352.04 \%$ y $2418.33 \pm 221.0 \%$ respectivamente, encontrándose apropiados para un correcto transporte de oxígeno, nutriente y eliminación de desechos. Así mismo, en la evaluación de biodegradabilidad, los ABs de nanocelulosa sufren una degradación a los 18 días, pero al combinarlo con quitosano el andamio logra degradarse en menor tiempo, 16 días, los resultados mostraron que pueden degradarse en los fluidos biológicos sin complicación.

- Finalmente, la valorización de los residuos orgánicos mediante la extracción de biopolímeros, como la nanocelulosa, mediante hidrólisis ácida y ultrasónicos, es una opción para la sustitución de polímeros sintéticos. En el campo biomédico, la nanocelulosa, es utilizada como biomaterial por sus excelentes propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad. Esto se comprobó con la elaboración de andamios únicamente de nanocelulosa y andamios compuestos de nanocelulosa/quitosano, pudiendo identificar que estos andamios presentan buena porosidad, capacidad de absorción de agua y biodegradabilidad. Cabe mencionar que, la combinación de los biopolímeros, ayudó a mejorar las propiedades del andamio, por tal motivo, la nanocelulosa se podría combinar con otros biopolímeros para ajustar las propiedades y obtener andamios según los requerimientos deseados para su aplicación en IT.

4.2. Recomendaciones

- Realizar extracciones de nanocelulosa, variando las concentraciones de NaOH y H₂SO₄, con el fin de identificar cómo influye la concentración de los reactivos tras los tratamientos, en el rendimiento de la nanocelulosa.
- Probar técnicas de secado para la nanocelulosa, por ejemplo, liofilización.
- Elaborar andamios de nanocelulosa mediante otras técnicas como bioimpresión 3D e identificar como cambian las propiedades de los andamios.
- Evaluar los andamios con pruebas de viabilidad celular, para conocer si los andamios a base de nanocelulosa son aptos para el crecimiento celular.
- Realizar pruebas de biodegradabilidad utilizando otras soluciones como tampones o enzimas.
- Combinar la nanocelulosa con otros biopolímeros, para conocer mejor cómo la combinación de biopolímeros ayuda a mejorar las propiedades de los andamios.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R., & Nguyen, N. (2020). Porous scaffolds for bone regeneration. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>
- Abdul, H., Jummaat, F., Yahya, E., Olaiya, N., Adnan, A., Abdat, M., Nasir, N., Sukari, A., Uthaya, U., Bairwan, R., & Suriani, A. (2020). A review on micro- to nanocellulose biopolymer scaffold forming for tissue engineering applications. *Polymers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/POLYM12092043>
- Ahmad, N., & Zakaria, M. (2019). Oligosaccharide from hemicellulose. In *Lignocellulose for Future Bioeconomy* (pp. 135–152). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816354-2.00008-6>
- Akinjokun, A., Petrik, L., Ogunfowokan, A., Ajao, J., & Ojumu, T. (2021). Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from cocoa pod husk (CPH) biomass wastes. *Heliyon*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06680>
- Akter, F. (2016). What is Tissue Engineering? In *Tissue Engineering Made Easy* (pp. 1–2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805361-4.00001-1>
- Alaribe, F., Manoto, S., & Motaung, S. (2016). Scaffolds from biomaterials: Advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Biologia*, 71(4), 353–366. <https://doi.org/10.1515/biolog-2016-0056>
- Altaner, C., Thomas, L., Fernandes, A., & Jarvis, M. (2014). How cellulose stretches: Synergism between covalent and hydrogen bonding. *Biomacromolecules*, 15(3), 791–798. <https://doi.org/10.1021/bm401616n>
- Alzate-Acevedo, S., Díaz-Carrillo, Á., Flórez-López, E., & Grande-Tovar, C. (2021). Recovery of Banana Waste-Loss from Production and Processing: A Contribution to a Circular Economy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17), 5282. <https://doi.org/10.3390/molecules26175282>
- Arifin, N., Sudin, I., Ngadiman, N., & Ishak, M. (2022). A Comprehensive Review of Biopolymer Fabrication in Additive Manufacturing Processing for 3D-Tissue-

<https://doi.org/10.3390/polym14102119>

- Ashammakhi, N., Ghavaminejad, A., Tutar, R., Fricker, A., Roy, I., Chatzistavrou, X., Apu, E., Nguyen, K., Ahsah, T., Pountos, I., & Catterson, E. J. (2022). Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*. Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2021.0012>
- Benaïmeche, O., Seghir, N., Sadowski, Ł., & Mellas, M. (2020). The Utilization of Vegetable Fibers in Cementitious Materials. In *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials: Volume 1-5* (Vol. 1–5, pp. 649–662). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.11596-6>
- Biswal, T. (2019). Biopolymers for tissue engineering applications: A review. In *Materials Today: Proceedings* (Vol. 41, pp. 397–402). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.628>
- Brown, P., Handorf, A., Bae Jeon, W., & Li, W. (2013). Stem Cell-based Tissue Engineering Approaches for Musculoskeletal Regeneration. *Current Pharmaceutical Design*, 19(19), 3429–3445. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990350>
- Bružauskaitė, I., Bironaitė, D., Bagdonas, E., & Bernotienė, E. (2016). Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes—different cell effects. *Cytotechnology*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10616-015-9895-4>
- Chami, A., & Robert, S. (2013). Self-assembly and intermolecular forces when cellulose and water interact using molecular modeling. *Journal of Nanomaterials*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/745979>
- Cheah, Y., Yunus, M., Fauzi, M., Tabata, Y., Hiraoka, Y., Phang, S., Chia, M., Buyong, M., & Yazid, M. (2023). Gelatin–chitosan–cellulose nanocrystals as an acellular scaffold for wound healing application: fabrication, characterisation and cytocompatibility towards primary human skin

cells. *Cellulose*, 30(8), 5071–5092. <https://doi.org/10.1007/s10570-023-05212-w>

Christy, N., Basha, K., & Kumari, S. (2022). Multifunctional organic and inorganic hybrid bionanocomposite of chitosan/poly (vinyl alcohol)/nanobioactive glass/nanocellulose for bone tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 135. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2022.105427>

Cichosz, S., & Masek, A. (2019). Cellulose fibers hydrophobization via a hybrid chemical modification. *Polymers*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/polym11071174>

Ciftci, D., Flores, R., & Saldaña, M. (2018). Cellulose Fiber Isolation and Characterization from Sweet Blue Lupin Hull and Canola Straw. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(7), 2773–2781. <https://doi.org/10.1007/s10924-017-1164-5>

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

Costa, A., Naranjo, J., Londono, R., & Badylak, S. (2017). Biologic Scaffolds. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(9), a025676. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025676>

Cvrček, L., & Horáková, M. (2018). Plasma Modified Polymeric Materials for Implant Applications. In *Non-Thermal Plasma Technology for Polymeric Materials: Applications in Composites, Nanostructured Materials, and Biomedical Fields* (pp. 367–407). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813152-7.00014-7>

Dai, Z., Ronholm, J., Tian, Y., Sethi, B., & Cao, X. (2016). Sterilization techniques for biodegradable scaffolds in tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering*. SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/2041731416648810>

- de Carvalho, C., Sgambato, N., Ferreira, N., Guimarães, C., & Furtado, A. (2015). Isolation and characterization of nanocrystalline cellulose from corn husk. *Materials Letters*, *148*, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.02.047>
- Du, H., Liu, W., Zhang, M., Si, C., Zhang, X., & Li, B. (2019). Cellulose nanocrystals and cellulose nanofibrils based hydrogels for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.020>
- Dwivedi, C., Pandey, I., Pandey, H., Ramteke, P., Pandey, A., Mishra, S., & Patil, S. (2017). Electrospun Nanofibrous Scaffold as a Potential Carrier of Antimicrobial Therapeutics for Diabetic Wound Healing and Tissue Regeneration. In *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems: Design and Fabrication* (pp. 147–164). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52727-9.00009-1>
- Echeverría, M., Malollari, K., & Komvopoulos, K. (2021). Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.617141>
- Elitok, M., Gunduz, E., Gurses, H., & Gunduz, M. (2018). Tissue engineering: Towards development of regenerative and transplant medicine. In *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life* (Vol. 1, pp. 471–495). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00020-8>
- Eltom, A., Zhong, G., & Muhammad, A. (2019). Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review. *Advances in Materials Science and Engineering*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/3429527>
- Evans, E., & Ballén, F. (2018). Banana Market. *IFAS Extension University of Florida*. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/FE901>

- FAO. (2023). Banana Market Review 2022. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. <https://www.fao.org/3/cc6952es/cc6952es.pdf>
- Felfel, R., Gideon-Adeniyi, M., Zakir Hossain, K., Roberts, G., & Grant, D. (2019). Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*, *204*, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.002>
- Fernandes, A., Cruz, L., Esteves, B., & Evtuguin, D. (2023). Nanotechnology Applied to Cellulosic Materials. *Materials*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/ma16083104>
- Ferreira, F., Souza, A., Ajdary, R., de Souza, L., Lopes, J., Correa, D., ... Rojas, O. (2023). Nanocellulose-based porous materials: Regulation and pathway to commercialization in regenerative medicine. *Bioactive Materials*. KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.06.020>
- Frykberg, R., & Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in Wound Care*, *4*(9), 560–582. <https://doi.org/10.1089/wound.2015.0635>
- Gond, R., Gupta, M., & Jawaid, M. (2021). Extraction of nanocellulose from sugarcane bagasse and its characterization for potential applications. *Polymer Composites*, *42*(10), 5400–5412. <https://doi.org/10.1002/pc.26232>
- Gopakumar, D., Thomas, S., & Grohens, Y. (2016). Nanocelluloses as Innovative Polymers for Membrane Applications. In *Multifunctional Polymeric Nanocomposites Based on Cellulosic Reinforcements* (pp. 253–275). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44248-0.00008-0>
- Grabska-Zielińska, S., Sionkowska, A., Reczyńska, K., & Pamuła, E. (2020). Physico-Chemical Characterization and Biological Tests of Collagen/Silk Fibroin/Chitosan Scaffolds Cross-Linked by Dialdehyde Starch. *Polymers*, *12*(2), 372. <https://doi.org/10.3390/polym12020372>
- Griffin, M., Naderi, N., Kalaskar, D., Malins, E., Becer, R., Thornton, C., Whitaker, I., Mosahebi, A., Butler, P., & Seifalian, A. (2018). Evaluation of Sterilisation Techniques for Regenerative Medicine Scaffolds Fabricated with Polyurethane

Nonbiodegradable and Bioabsorbable Nanocomposite Materials. *International Journal of Biomaterials*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6565783>

Guáitara, S. (2022). *Elaboración de andamios biológicos a partir de biopolímeros naturales mediante métodos manuales y bioimpresión 3D para aplicaciones en ingeniería de tejidos*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/36566>

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>

Han, F., Wang, J., Ding, L., Hu, Y., Li, W., Yuan, Z., Guo, Q., Zhu, C., Yu, L., Wang, H., Zhao, Z., Jia, L., Li, J., Yu, Y., Zhang, W., Chu, G., Chen, S., & Li, B. (2020). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083>

Harmsen, P., Huijgen, W., López, L., & Bakker, R. (2010). Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. *Food and Biobased Research*, 1–49. Retrieved from <http://www.ecn.nl/docs/library/report/2010/e10013.pdf>

Hikal, W., Said-Al Ahl, H., Bratovcic, A., Tkachenko, K., Sharifi-Rad, J., Kačániová, M., Elhourri, M., & Atanassova, M. (2022). Banana Peels: A Waste Treasure for Human Being. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2022, 7616452. <https://doi.org/10.1155/2022/7616452>

Hospodarova, V., Singovszka, E., & Stevulova, N. (2018). Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials. *American Journal of Analytical Chemistry*, 09(06), 303–310. <https://doi.org/10.4236/ajac.2018.96023>

Hosseini, M., & Shafiee, A. (2021). Engineering Bioactive Scaffolds for Skin Regeneration. *Small*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/sml.202101384>

- Ikeda, T., Ikeda, K., Yamamoto, K., Ishizaki, H., Yoshizawa, Y., Yanagiguchi, K., Yamada, S., & Hayashi, Y. (2014). Fabrication and characteristics of chitosan sponge as a tissue engineering scaffold. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/786892>
- IMARC. (2023). *Informe del mercado de cuidado de heridas 2023*. <https://www.benzinga.com/pressreleases/23/09/34310599/informe-del-mercado-de-cuidado-de-heridas-2023-analisis-de-tamano-compartir-y-tendencias>
- Irastorza-lorenzo, A., Sánchez-Porras, D., Ortiz-Arrabal, O., M. de Frutos, Esteban, E., Fernández, J. Janer A., Campos, A., Campos F., & Alaminos, M. (2021). Evaluation of marine agarose biomaterials for tissue engineering applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22041923>
- Jiang, T., James, R., Kumbar, S., & Laurencin, C. (2014). Chitosan as a Biomaterial: Structure, Properties, and Applications in Tissue Engineering and Drug Delivery. In *Natural and Synthetic Biomedical Polymers* (pp. 91–113). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396983-5.00005-3>
- Kaur, P., Sharma, N., Munagala, M., Rajkhowa, R., Aallardyce, B., Shastri, Y., & Agrawal, R. (2021). Nanocellulose: Resources, Physio-Chemical Properties, Current Uses and Future Applications. *Frontiers in Nanotechnology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnano.2021.747329>
- Khan, M., & Perveen, B. (2010). Transformation of agricultural wastes into sugar by *Trichoderma viride*. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 4(1), 103–108.
- Khan, S., Khan, S., Khan, L., Farooq, A., Akhtar, K., & Asiri, A. (2018). Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization. In *Handbook of Materials Characterization* (pp. 317–344). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_9

- Kim, S., Cui, Z. K., Koo, B., Zheng, J., Aghaloo, T., & Lee, M. (2018). Chitosan-Lysozyme Conjugates for Enzyme-Triggered Hydrogel Degradation in Tissue Engineering Applications. *ACS Applied Materials and Interfaces*, *10*(48), 41138–41145. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b15591>
- Koyyada, A., & Orsu, P. (2021). Recent Advancements and Associated Challenges of Scaffold Fabrication Techniques in Tissue Engineering Applications. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40883-020-00166-y>
- Krishani, M., Shin, W., Suhaimi, H., & Sambudi, N. (2023). Development of Scaffolds from Bio-Based Natural Materials for Tissue Regeneration Applications: A Review. *Gels*. MDPI. <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 and Biotechnology*. Open Science Publishers LLP Inc. <https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100321>
- Kumar, P., Sai, S., Venkatesh, D., Venkat, P., Shree, V., Chithananthan, C., Choudhar, S., Surender, K., & Geetha, K. (2019). An Update on Overview of Cellulose, Its Structure and Applications. In *Cellulose*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84727>
- Li, M., & Yang, L. (2023a). Biomedical metallic materials based on nanocrystalline and nanoporous microstructures: Properties and applications. In *Nanomedicine: Technologies and Applications* (pp. 555–584). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818627-5.00030-0>
- Li, M., He, B., Chen, Y., & Zhao, L. (2021b). Physicochemical Properties of Nanocellulose Isolated from Cotton Stalk Waste. *ACS Omega*, *6*(39), 25162–25169. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02568>
- Liu, C., Zeng, Y., Kankala, R., Zhang, S., Chen, A., & Wang, S. (2018). Characterization and preliminary biological evaluation of 3D-printed porous

- scaffolds for engineering bone tissues. *Materials*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/ma11101832>
- Łopianiak, I., & Butruk-Raszeja, B. A. (2020). Evaluation of sterilization/disinfection methods of fibrous polyurethane scaffolds designed for tissue engineering applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 1–18.
<https://doi.org/10.3390/ijms21218092>
- Lou, C., Wen, S., Chung, H., Lu, C., & Lin, J. (2013). Application of Porous Chitosan/Gelatin Bone Scaffolds Used in Bone Tissue Engineering. *In Applied Mechanics and Materials*, 365-366 (), 1050–1053. Trans Tech Publications, Ltd. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.365-366.1050>
- Lu, Y., Lu, Y. C., Hu, H. Q., Xie, F. J., Wei, X. Y., & Fan, X. (2017). Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods. *Journal of Spectroscopy*. Hindawi Limited.
<https://doi.org/10.1155/2017/8951658>
- Mandal, A., & Chakrabarty, D. (2011). Isolation of nanocellulose from waste sugarcane bagasse (SCB) and its characterization. *Carbohydrate Polymers*, 86(3), 1291–1299. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.030>
- Martelli, A., Bellucci, D., & Cannillo, V. (2023). Additive Manufacturing of Polymer/Bioactive Glass Scaffolds for Regenerative Medicine: A Review. *Polymers*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym15112473>
- Mateo, S., Peinado, S., Morillas-Gutiérrez, F., La Rubia, M., & Moya, A. (2021). Nanocellulose from agricultural wastes: Products and applications—a review. *Processes*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/pr9091594>
- Mathew, J., Sankar, P., & Varacallo, M. (2023). *Physiology, Blood Plasma*. *StatPearls* (pp. 1–3). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397761>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7125842>
- Melesse, G., Hone, F., & Mekonnen, M. (2022). Extraction of Cellulose from Sugarcane Bagasse Optimization and Characterization. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/1712207>

- Melikoglu, A., Bilek, S., & Cesur, S. (2019). Optimum alkaline treatment parameters for the extraction of cellulose and production of cellulose nanocrystals from apple pomace. *Carbohydrate polymers*, 215, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.03.103>
- Mishra, P., Pavelek, O., Rasticova, M., Mishra, H., & Ekielski, A. (2022a). Nanocellulose-Based Biomedical Scaffolds in Future Bioeconomy: A Techno-Legal Assessment of the State-of-the-Art. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 789603. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.789603>
- Mishra, S., Prabhakar, B., Kharkar, P., & Pethe, A. (2022b). Banana Peel Waste: An Emerging Cellulosic Material to Extract Nanocrystalline Cellulose. *ACS Omega*. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06571>
- Modenbach, A., & Nokes, S. (2014). Effects of sodium hydroxide pretreatment on structural components of biomass. *Transactions of the ASABE*. American Society of Agricultural and Biological Engineers. <https://doi.org/10.13031/trans.56.10046>
- Mohd, N., Jaffar, S., Saallah, S., Misson, M., Siddiquee, S., Roslan, J., & Lenggoro, W. (2022). Aislamiento de nanocristales de celulosa de cáscara de plátano mediante microondas de un solo recipiente y un sistema de hidrólisis oxidativa suave. *Nanomateriales*, 12(19). <https://doi.org/10.3390/nano12193537>
- Mombini, S., Mohammadnejad, J., Bakhshandeh, B., Narmani, A., Nourmohammadi, J., Vahdat, S., & Zirak, S. (2019). Chitosan-PVA-CNT nanofibers as electrically conductive scaffolds for cardiovascular tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 278–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.046>
- Moon, R., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3941–3994. <https://doi.org/10.1039/c0cs00108b>
- Murphy, C., & O'Brien, F. (2010). Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Cell Adhesion and Migration*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cam.4.3.11747>

- Naderi, H., Matin, M., & Bahrami, A. (2011). Review paper: Critical issues in tissue engineering: Biomaterials, cell sources, angiogenesis, and drug delivery systems. *Journal of Biomaterials Applications*. <https://doi.org/10.1177/0885328211408946>
- Naseri, N., Poirier, J. M., Girandon, L., Fröhlich, M., Oksman, K., & Mathew, A. (2016). 3-Dimensional porous nanocomposite scaffolds based on cellulose nanofibers for cartilage tissue engineering: Tailoring of porosity and mechanical performance. *RSC Advances*, 6(8), 5999–6007. <https://doi.org/10.1039/c5ra27246g>
- Nocera, A., Comín, R., Salvatierra, N., & Cid, M. (2018). Development of 3D printed fibrillar collagen scaffold for tissue engineering. *Biomedical Microdevices*, 20(2). <https://doi.org/10.1007/s10544-018-0270-z>
- Nokoorani, Y., Shamloo, A., Bahadoran, M., & Moravvej, H. (2021). Fabrication and characterization of scaffolds containing different amounts of allantoin for skin tissue engineering. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95763-4>
- Nosrati, H., 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*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00755-7>
- Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). The Freeze-Drying of Foods-The Characteristic of the Process Course and the Effect of Its Parameters on the Physical Properties of Food Materials. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(10), 1488. <https://doi.org/10.3390/foods9101488>
- Nwe, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2009). The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*, 2(2), 374–398. <https://doi.org/10.3390/ma2020374>

- O'Brien, F. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Ochoa-Villarreal, M., Aispuro-Hernandez, E., Vargas-Arispuro, I., & Angel, M. (2012). Plant Cell Wall Polymers: Function, Structure and Biological Activity of Their Derivatives. In *Polymerization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/46094>
- Olson, J., Atala, A., & Yoo, J. (2011). Tissue engineering: current strategies and future directions. *Chonnam medical journal*, 47(1), 1–13. <https://doi.org/10.4068/cmj.2011.47.1.1>
- OMS. (2023). Guidance on solid waste and health. *World Health Organization*. <https://www.who.int/tools/compendium-on-health-and-environment/solid-waste>
- Ooi, K., Haszman, S., Wong, Y., Soidin, E., Hesham, N., Mior, M., Tabata, Y., Ahmad, I., Fauzi, M., & Yunus, M. (2020). Physicochemical characterization of bilayer hybrid nanocellulose-collagen as a potential wound dressing. *Materials*, 13(19), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ma13194352>
- Oryan, A., & Sahviah, S. (2017). Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124>
- Pandey, V., Gajić, G., Sharma, P., & Roy, M. (2022). Soil and phytomanagement for adaptive phytoremediation practices. In *Adaptive Phytoremediation Practices* (pp. 135–179). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-823831-8.00002-5>
- Patel, D., Dutta, S., Shin, W., Ganguly, K., & Lim, K. (2021a). Fabrication and characterization of 3D printable nanocellulose-based hydrogels for tissue engineering. *RSC Advances*, 11(13), 7466–7478. <https://doi.org/10.1039/d0ra09620b>
- Patel, J., & Parsania, P. (2017). Characterization, testing, and reinforcing materials of biodegradable composites. In *Biodegradable and Biocompatible Polymer Composites: Processing, Properties and Applications* (pp. 55–79). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100970-3.00003-1>

- Patel, P., Modi, A., Minipara, D., & Kumar, A. (2021b). Microbial biosurfactants in management of organic waste. *In Sustainable Environmental Clean-Up* (pp. 211-230). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823828-8.00010-4>
- Perić, Ž., Rider, P., Alkildani, S., Retnasingh, S., Pejakić, M., Schnettler, R., Gosau, M., Jung, O., & Barbeck, M. (2020). An introduction to bone tissue engineering. *International Journal of Artificial Organs*. SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/0391398819876286>
- Phanthong, P., Reubroycharoen, P., Hao, X., Xu, G., Abudula, A., & Guan, G. (2018). Nanocellulose: Extraction and application. *Carbon Resources Conversion*. KeAi Publishing Communications Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2018.05.004>
- Phirom-on, K., & Apiraksakorn, J. (2022). Eco-friendly extraction of banana peel cellulose using a wood charcoal ash solution and application of process wastewater as a naturally-derived product. *Bioresource Technology Reports*, 19. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101174>
- 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>
- Pooshidani, Y., Zoghi, N., Rajabi, M., Haghbin Nazarpak, M., & Hassannejad, Z. (2021). Fabrication and evaluation of porous and conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 32(4). <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06519-5>
- Poulose, A., Parameswaranpillai, J., George, J., Gopi, J., Krishnasamy, S., Dominic C., Hameed, N., Salim, N., Radoor, S., & Sienkiewicz, N. (2022). Nanocellulose: A Fundamental Material for Science and Technology Applications. *Molecules*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27228032>
- Radakisnin, R., Abdul, M., Mohd, M., Mat, M., Meng, C., & Alshahrani, H. (2021). Physical, thermal, and mechanical properties of highly porous polylactic acid/cellulose nanofibre scaffolds prepared by salt leaching

- technique. *Nanotechnology Reviews*, 10(1), 1469–1483.
<https://doi.org/10.1515/ntrev-2021-0098>
- Rajab, T., O'Malley, T., & Tchantchaleishvili, V. (2020). Decellularized scaffolds for tissue engineering: Current status and future perspective. *Artificial Organs*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/aor.13701>
- Rajasekharan, R., Paul, S., Madhavan, A., Sindhu, R., Binod, P., Awasthi, M., & Pandey, A. (2023). Green strategies for extraction of nanocellulose from agricultural wastes—Current trends and future perspectives. In *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* (pp. 269–288). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95156-2.00006-4>
- Ramos-Zúñiga, R., Segura-Duran, I., González-Castañeda, R., & González Ríos, J. (2022). The challenges of the bioactive scaffolds in nervous system: From their molecular conformation to their therapeutic efficiency. *Neurology Perspectives*. Ediciones Doyma, S.L. <https://doi.org/10.1016/j.neurop.2021.07.007>
- Rebelo, M., Alves, T., de Lima, R., Oliveira, J., Vila, M., Balcão, V., Severino, P., & Chaud, M. (2015). Scaffolds and tissue regeneration: An overview of the functional properties of selected organic tissues. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33482>
- Reddy, M., Ponnamma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. (2021). A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds. *Polymers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/polym13071105>
- Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M., & Julier, Z. (2020). Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 469. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00469>

- Ribeiro, R., Pohlmann, B., Calado, V., Bojorge, N., & Pereira, N. (2019). Production of nanocellulose by enzymatic hydrolysis: Trends and challenges. *Engineering in Life Sciences*. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800158>
- Rizal, S., Yahya, E., Abdul, H., Abdullah, C., Marwan, M., Ikramullah, I., & Muksin, U. (2021). Preparation and characterization of nanocellulose/chitosan aerogel scaffolds using chemical-free approach. *Gels*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/gels7040246>
- Rodríguez-Vázquez, M., Vega-Ruiz, B., Ramos-Zúñiga, R., Saldaña-Koppel, D., & Quiñones-Olvera, L. (2015). Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2015/821279>
- Roldán, S., Vargas, C., Mejía, M., Zapata, J., & Moncada, M. (2016). Ingeniería de tejidos y aplicaciones. *Instituto Tecnológico Metropolitano*. https://www.google.com.ec/books/edition/Ingenier%C3%ADa_de_tejidos_y_aplicaciones/e8Y3DwAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=0
- Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering C*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>
- Salati, M., Khazai, J., Tahmuri, A., Samadi, A., Taghizadeh, A., Taghizadeh, M., Zarrintaj, P., Ramsey, J., Habibzadeh, S., Seidi, F., Saeb, M., & Mozafari, M. (2020). Agarose-Based biomaterials: Opportunities and challenges in cartilage tissue engineering. *Polymers*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/POLYM12051150>
- Samrot, A., Sathiyasree, M., Rahim, S., Renitta, R., Kasipandian, K., Krithika Shree, S., Rajalakshmi, D., Shobana, N., Dhiva, S., Sabesan, G., & Chinni, S. (2023). Scaffold Using Chitosan, Agarose, Cellulose, Dextran and Protein for Tissue Engineering—A Review. *Polymers*. MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym15061525>

- Sanaguano, S. (2021). *Obtención de nanocelulosa a partir de la hoja de mazorca de maíz (Zea mays L.) mediante el proceso de hidrólisis ácida*. [Tesis de grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. DSpace ESPOCH. <http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/14991>
- Santiago, B., Moreira, M., Feijoo, G., & González-García, S. (2022). Environmental comparison of banana waste valorisation strategies under a biorefinery approach. *Waste Management, 142*, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2022.02.005>
- Sayakulu, N., & Soloi, S. (2022). The Effect of Sodium Hydroxide (NaOH) Concentration on Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) Cellulose Yield. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 2314). Institute of Physics. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/2314/1/012017>
- Sharma, C., Thankam, F., Chandy, T., & Thomas, V. (2022b). Tissue Engineering. Current Status and Challenges. *Elsevier Science*. https://www.google.com.ec/books/edition/Tissue_Engineering/Y5xBEAAAQBAJ?hl=es-419&gbpv=0
- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Bhatt, V., & Dhot, P. (2019a). Tissue Engineering; Current Status & Futuristic Scope. *Journal of medicine and life, 12*(3), 225–229. <https://doi.org/10.25122/jml-2019-0032>
- Solís N., Vega, J., Rodríguez, E., & Meseguer, L. (2019). Estudio del efecto de la adición de nanocelulosa obtenida del desecho del rastrojo de piña en mezclas para materiales de construcción. *Revista Iberoamericana de Polímeros, 20*(1), 21-43.
- Soni, B., Hassan, E., & Mahmoud, B. (2015). Chemical isolation and characterization of different cellulose nanofibers from cotton stalks. *Carbohydrate Polymers, 134*, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.031>
- Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., & Jayasekhar Babu, P. (2023). Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing, 1*, 100011. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100011>

- Subramanian, P., Sriramajayam, S., Vijayakumary, P., Raja, K., Reddy, M., & Research, P. (2022). n. ~ 1861 ~ *The Pharma Innovation Journal*, 11(6), 1861–1867. Retrieved from www.thepharmajournal.com
- Sultana, N. (2018a). Mechanical and biological properties of scaffold materials. In *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications* (pp. 1–21). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100979-6.00001-X>
- Sultana, N., Hassan, M., & Lim, M. (2014b). *Scaffolding Biomaterials. SpringerBriefs in Materials*, 1–11. doi:10.1007/978-3-319-09755-8_1
- Tang, A., Li, J., Zhao, S., Liu, T., Wang, Q., & Wang, J. (2017). Biodegradable tissue engineering scaffolds based on nanocellulose/PLGA nanocomposite for NIH 3T3 cell cultivation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(6), 3888–3895. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13115>
- Tonelli, F. (2017a). *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering || Tissue Engineering.*, (), 315–324. doi:10.1016/B978-0-444-63660-7.00012-7
- Tonelli, F., de Cássia, N., de Medeiros, R., Pinto, M., Tonelli, F., & Resende, R. (2017b). Tissue Engineering: The Use of Stem Cells in Regenerative Medicine. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Human and Animal Health Applications* (pp. 315–324). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00012-7>
- Torres-Sanchez, C., Al Mushref, F., Norrito, M., Yendall, K., Liu, Y., & Conway, P. P. (2017). The effect of pore size and porosity on mechanical properties and biological response of porous titanium scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 77, 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.249>
- Vijayan, J., Chandrashekar, A., Prabhu, T., & Kalappa, P. (2022). Polyurethane and its composites derived from bio-sources: Synthesis, characterization and adsorption studies. *Polymers and Polymer Composites*, 30. <https://doi.org/10.1177/09673911221110347>

- Wei, Q., Deng, N., Guo, J., & Deng, J. (2018). Synthetic Polymers for Biomedical Applications. *International Journal of Biomaterials*. Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/7158621>
- Weller, C., Team, V., & Sussman, G. (2020). First-Line Interactive Wound Dressing Update: A Comprehensive Review of the Evidence. *Frontiers in Pharmacology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00155>
- Winnett, J., Jumbu, N., Cox, S., Gibbons, G., Grover, L., Warnett, J., Williams, M., Dancer, C., & Mallick, K. (2022). In-vitro viability of bone scaffolds fabricated using the adaptive foam reticulation technique. *Biomaterials Advances*, 136. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212766>
- Wrobel, D., Marcinkowska, M., Janaszewska, A., Appelhans, D., Voit, B., Klajnert-Maculewicz, B., Štofik, M., Bryszewska, M., Herma, R., Duchnowicz, P., & Maly, J. (2017). Influence of core and maltose surface modification of PEIs on their interaction with plasma proteins—Human serum albumin and lysozyme. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 152, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.12.042>
- Wu, Y., Ma, H., Wang, J., & Qu, W. (2021). Production of chitosan scaffolds by lyophilization or electrospinning: which is better for peripheral nerve regeneration?. *Neural regeneration research*, 16(6), 1093–1098. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.300463>
- Wulandari, W., Rochliadi, A., & Arcana, I. (2016). Nanocellulose prepared by acid hydrolysis of isolated cellulose from sugarcane bagasse. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* (Vol. 107). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/107/1/012045>
- Yadav, C., Saini, A., Zhang, W., You, X., Chauhan, I., Mohanty, P., & Li, X. (2021a). Plant-based nanocellulose: A review of routine and recent preparation methods with current progress in its applications as rheology modifier and 3D bioprinting. *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.038>

- Yadav, P., Beniwal, G., & Saxena, K. (2021b). A review on pore and porosity in tissue engineering. In *Materials Today: Proceedings* (Vol. 44, pp. 2623–2628). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.661>
- Yahya, E., Amirul, A., Abdul Khalil, H., Olaiya, N., Iqbal, M., Jummaat, F., Sofea A., & Adnan, A. (2021). Insights into the role of biopolymer aerogel scaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *Polymers*, *13*(10). <https://doi.org/10.3390/polym13101612>
- Yang, B., Li, X., Shi, S., Kong, X., Guo, G., Huang, M., Wei, F., Zhao, X., & Qian, Z. (2010). Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers*, *80*(3), 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.12.044>
- Yin, K., Divakar, P., & Wegst, U. (2019). Plant-Derived Nanocellulose as Structural and Mechanical Reinforcement of Freeze-Cast Chitosan Scaffolds for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, *20*(10), 3733–3745. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00784>
- Zarrintaj, P., Manouchehri, S., Ahmadi, Z., Saeb, M., Urbanska, A., Kaplan, D., & Mozafari, M. (2018). Agarose-based biomaterials for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.01.060>
- 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. (2023). Study on the influence of scaffold morphology and structure on osteogenic performance. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1127162>

ANEXOS

ANEXO A. Pretratamiento del material vegetal.



Figura 13. Preparación del residuo de banano.

A. Lavado del residuo vegetal B. Secado del residuo vegetal. C. Pulverizado del residuo.
D. Pretratamiento del residuo vegetal en polvo.

ANEXO B. Extracción de celulosa.

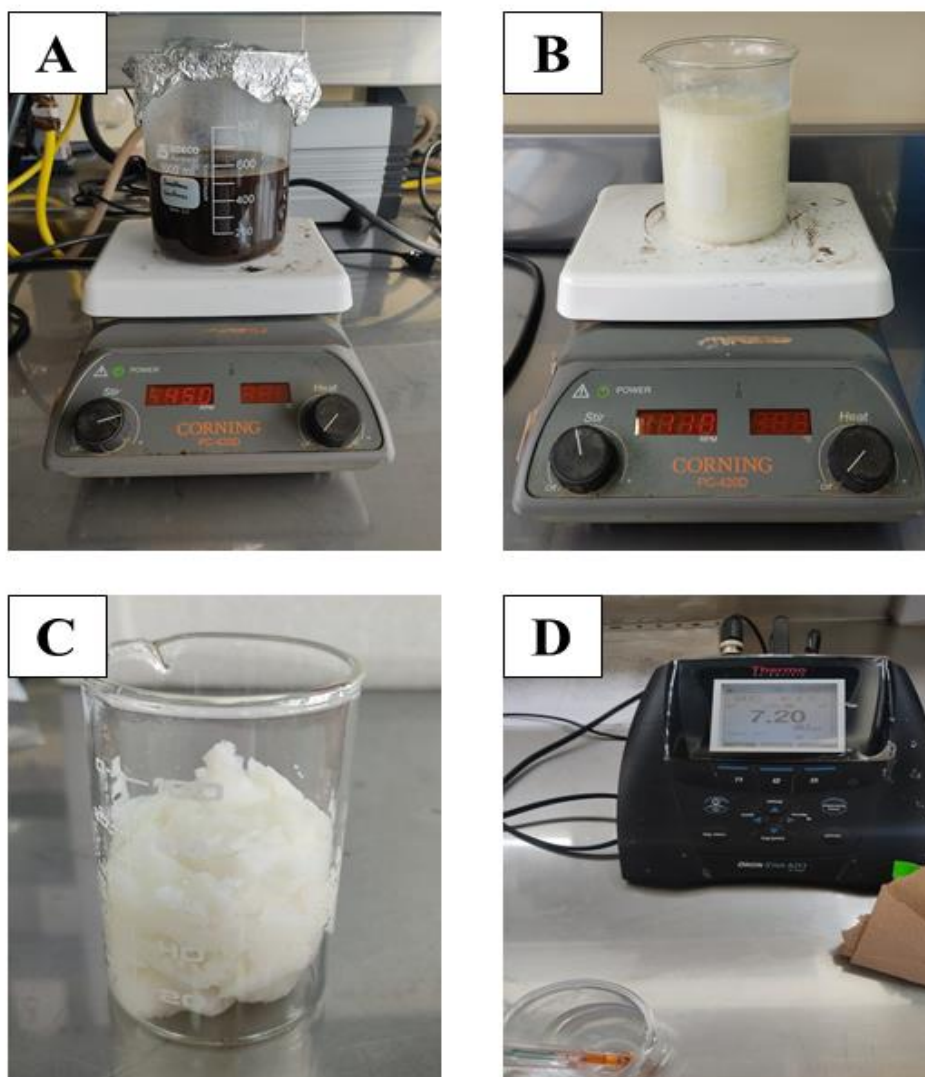


Figura 14. *Extracción de celulosa del residuo del banano.*

- A.** Tratamiento del residuo en polvo con NaOH 5 %. **B.** Blanqueamiento con NaClO 1 %.
C. Filtrado de celulosa **D.** Medición del pH del agua de lavado de la celulosa.

ANEXO C. Extracción de nanocelulosa vegetal.

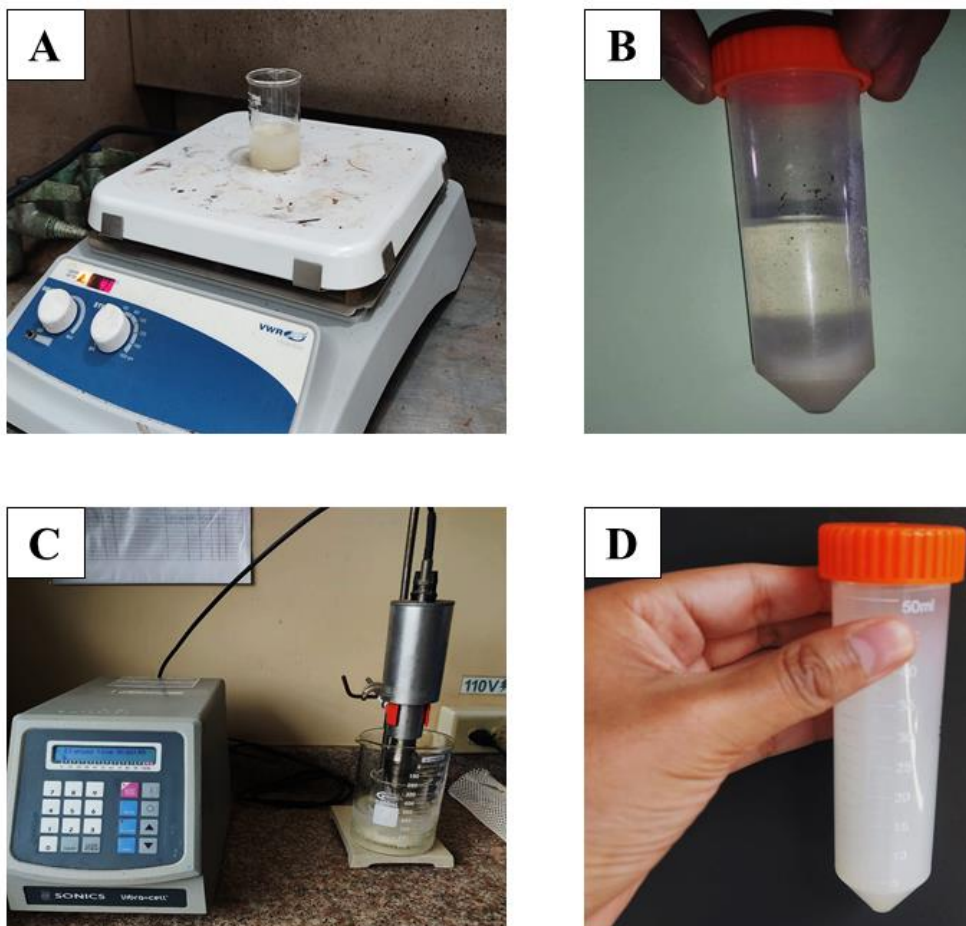


Figura 15. *Extracción de nanocelulosa del residuo del banano.*

A. Tratamiento de la celulosa con H_2SO_4 65 %. **B.** Eliminación del medio de reacción mediante centrifugación. **C.** Tratamiento ultrasónico. **D.** Suspensión obtenida de nanocelulosa.

ANEXO D. Elaboración de andamios biológicos.

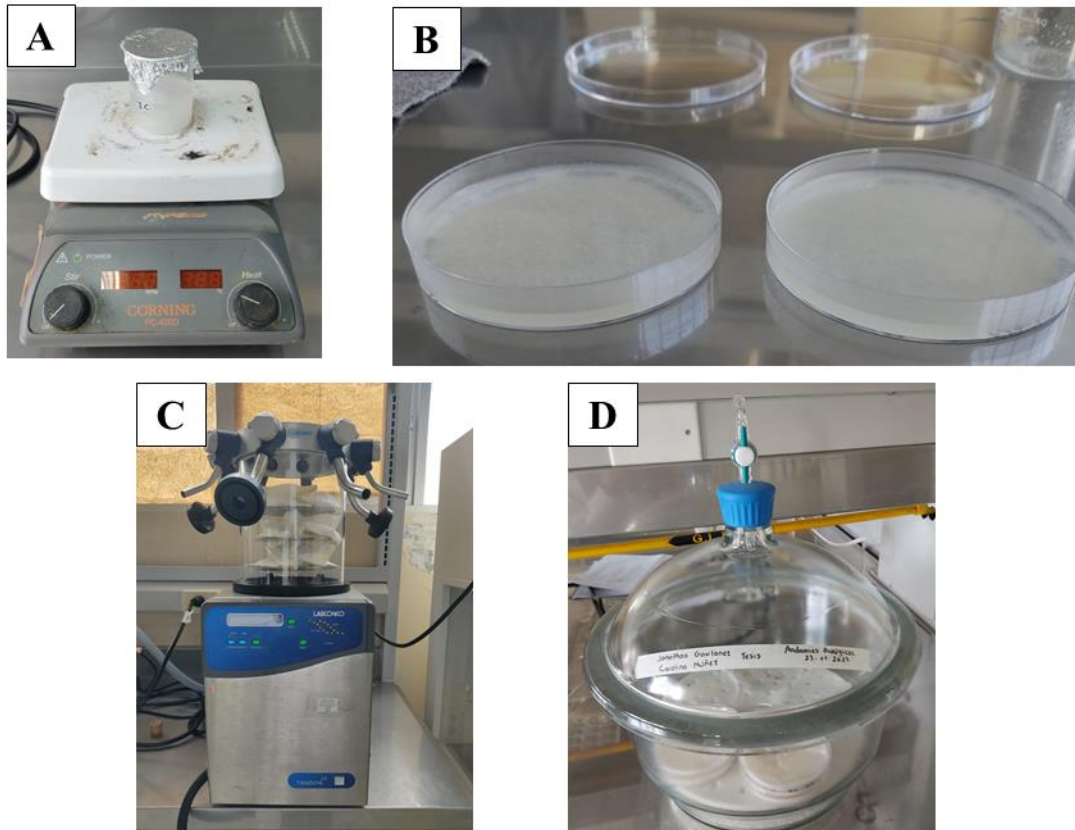


Figura 16. *Extracción de nanocelulosa del residuo del banano.*

A. Elaboración de la solución con biopolímeros. **B.** Plaqueo de la solución. **C.** Liofilización de los andamios. **D.** Almacenamiento.

ANEXO E. Evaluación de la porosidad de los andamios.

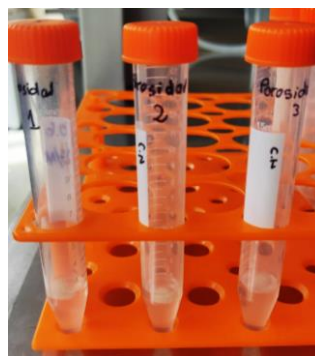


Figura 17. *Evaluación del % de porosidad de los andamios.*

Desplazamiento del líquido con etanol para la determinación del % de porosidad de los ABs.

ANEXO F. Evaluación de la capacidad de absorción de agua de los andamios.

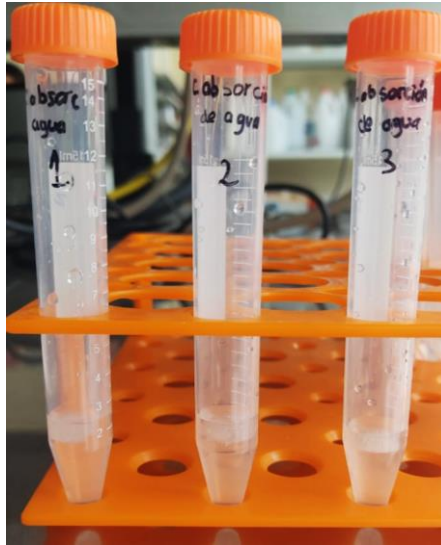


Figura 18. Evaluación del % de capacidad de absorción de agua de los andamios. Método de hinchamiento para la determinación del % de capacidad de absorción de los ABs.

ANEXO G. Evaluación de la biodegradabilidad de los andamios.

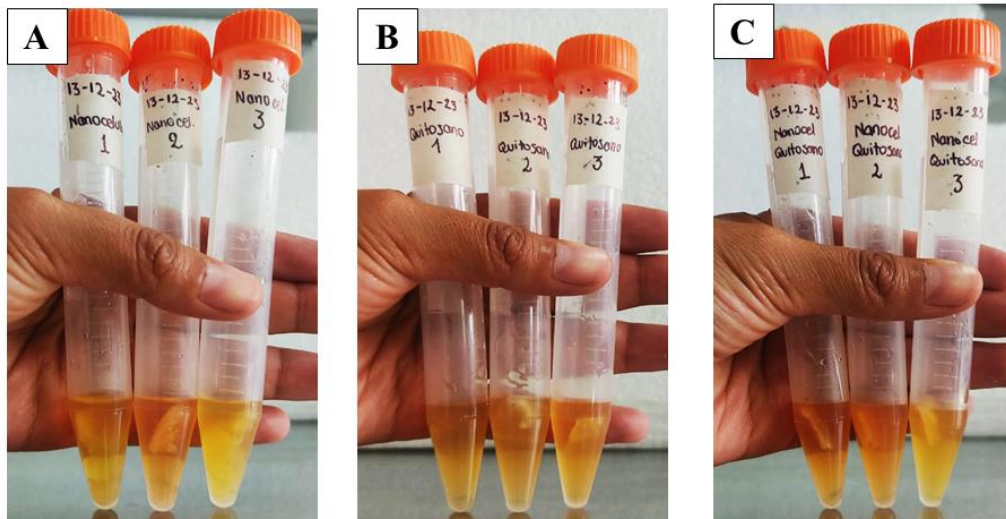


Figura 19. Evaluación del % de biodegradabilidad de los andamios. Prueba de biodegradabilidad con plasma sanguíneo. **A.** ABs de Nanocelulosa. **B.** ABs de Quitosano. **C.** ABs de Nanocelulosa/Quitosano

ANEXO H. Tablas con datos obtenidos para las pruebas morfológicas y biológicas.

Tabla 4. Pesos obtenidos para la evaluación del % de porosidad de los ABs.

Andamios	Nº	Wseco (mg)	Wfinal (mg)	% de porosidad
Nanocelulosa	1	7,3	39,7	89,97
	2	7,5	35,6	88,34
	3	7,1	38,1	89,83
Qitosano	1	8,1	40,3	88,28
	2	8	35,5	86,95
	3	7,9	38,3	87,94
Híbrido	1	9	29,2	89,79
	2	8,1	23,7	88,30
	3	8,7	26,2	88,74

Tabla 5. Promedio y desviación estándar de los porcentajes de porosidad de los ABs.

	% de porosidad	Desviación estándar
ABs Nanocelulosa	89,38	0,904
ABs Qitosano	87,72	0,696
ABs Híbrido	88,94	0,766

Tabla 6. Pesos obtenidos para la evaluación del % de absorción de agua de los ABs.

Tiempo	Nº	Nanocelulosa	Qitosano	Híbrido
0:00	1	6,3	7,9	10
	2	6,0	7,4	9,3
	3	6,1	7,9	10,2
0:30	1	178,5	174,3	181,4
	2	198,2	203,8	211,0
	3	183,7	242,9	236,0
1:00	1	169,2	197,3	206,5
	2	136,9	208,8	204,4
	3	165,7	238,9	241,3

1:30	1	158,9	213,5	219,7
	2	122,6	211,7	218,7
	3	141,3	232,9	232,5
2:00	1	157,1	208,1	215,8
	2	122,1	201,8	224,5
	3	139,5	228,2	304,2
2:30	1	146,9	237,2	259,1
	2	125,6	192,7	214,4
	3	134,3	217,7	305,3
3:00	1	142,2	224,2	274,3
	2	115,3	203,3	218,8
	3	144,7	235,4	294,6
3:30	1	135,4	227,4	269,5
	2	123,7	198,0	225,4
	3	132,9	231,5	286,3
4:00	1	128,1	233,2	275,1
	2	117,9	191,7	218,8
	3	136,2	210,3	288,5
4:30	1	124,7	197,3	261,4
	2	116,4	146,2	298,4
	3	115,7	213,8	256,8
5:00	1	123,4	184,7	259,8
	2	111,2	169,8	291,3
	3	116,2	204,3	252,4
5:30	1	122,2	187,3	252,6
	2	107,3	154,6	292,3
	3	106,7	188,9	235,7
6:00	1	117,5	185,2	203,3
	2	106,1	148,7	257,3
	3	102,3	167,2	224,1

Tabla 7. *Porcentajes obtenidos sobre la absorción de agua de los ABs.*

Tiempo	N°	Abs Nanocelulosa (%)	ABs Quitosano (%)	ABs Híbrido (%)
0:00	1	0,00	0,00	0,00
	2	0,00	0,00	0,00
	3	0,00	0,00	0,00
0:30	1	2733,3	2106,3	1714,0
	2	3203,3	2654,1	2168,8
	3	2911,5	2974,7	2213,7
1:00	1	2585,7	2397,5	1965,0
	2	2181,7	2721,6	2097,8
	3	2616,4	2924,1	2265,7
1:30	1	2422,2	2602,5	2097,0
	2	1943,3	2760,8	2251,6
	3	2216,4	2848,1	2179,4
2:00	1	2393,7	2534,2	2058,0
	2	1935,0	2627,0	2314,0
	3	2186,9	2788,6	2882,4
2:30	1	2231,7	2902,5	2491,0
	2	1993,3	2504,1	2205,4
	3	2101,6	2655,7	2893,1
3:00	1	2157,1	2738,0	2643,0
	2	1821,7	2647,3	2252,7
	3	2272,1	2879,7	2788,2
3:30	1	2049,2	2778,5	2595,0
	2	1961,7	2575,7	2323,7
	3	2078,7	2830,4	2706,9
4:00	1	1933,3	2851,9	2651,0
	2	1865,0	2490,5	2252,7
	3	2132,8	2562,0	2728,4
4:30	1	1879,4	2397,5	2514,0
	2	1840,0	1875,7	3108,6

	3	1796,7	2606,3	2417,6
5:00	1	1858,7	2238,0	2498,0
	2	1753,3	2194,6	3032,3
	3	1804,9	2486,1	2374,5
5:30	1	1839,7	2270,9	2426,0
	2	1688,3	1989,2	3043,0
	3	1649,2	2291,1	2210,8
6:00	1	1765,1	2244,3	1933,0
	2	1668,3	1909,5	2666,7
	3	1577,0	2016,5	2097,1

Tabla 8. Promedio de los porcentajes y desviación estándar de la absorción de agua de los ABs.

Tiempo	ABs Nanocelulosa (%)	ABs Quitosano (%)	ABs Híbrido (%)
0:00	0,00	0,00	0,00
0:30	2949,38	2578,36	2032,18
1:00	2461,26	2681,05	2109,51
1:30	2193,98	2737,15	2176,01
2:00	2171,85	2649,94	2418,11
2:30	2108,91	2687,43	2529,84
3:00	2083,65	2755,01	2561,31
3:30	2029,85	2728,18	2541,84
4:00	1977,04	2634,82	2544,04
4:30	1838,70	2293,16	2680,08
5:00	1805,66	2306,22	2634,92
5:30	1725,73	2183,74	2559,93
6:00	1670,15	2056,74	2232,24
Promedio	2084,68	2524,31	2418,33
Desviación estándar	352,04	244,54	221,00

Tabla 9. Pesos obtenidos en la evaluación de biodegradabilidad de los ABs.

Tiempo	N°	AB Nanocelulosa	AB Quitosano	AB Híbrido
Día 0	1	19,8	23,7	22,5
	2	20	22,2	24,1
	3	20,8	21,2	21,5
Día 2	1	15,2	15,6	16,6
	2	17,3	12,2	11,8
	3	16,4	14,1	14,5
Día 5	1	11,9	11,3	10,2
	2	13,5	9,7	9,6
	3	13,7	10,5	10,8
Día 7	1	10,5	5,1	6,7
	2	9,3	7,3	6,8
	3	7,2	4,7	7,1
Día 9	1	8,7	1,3	1,9
	2	8,5	1,1	2,7
	3	5,9	0,7	2,1
Día 12	1	5,9	0,5	0,9
	2	4,8	0,3	1,1
	3	4,4	0	1
Día 14	1	3,3	0	0
	2	2,7	0	0,3
	3	3,5	0	0,4
Día 16	1	0,9	0	0
	2	0,8	0	0
	3	1	0	0
Día 18	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0

Tabla 10. *Porcentajes obtenidos en la evaluación de biodegradabilidad de los ABs.*

Tiempo	N°	AB Nanocelulosa (%)	AB Quitosano (%)	AB Híbrido (%)
Día 0	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	0	0	0
Día 2	1	23,2	34,2	26,2
	2	13,5	45,0	51,0
	3	21,2	33,5	32,6
Día 5	1	39,90	52,32	54,67
	2	32,50	56,31	60,17
	3	34,13	50,47	49,77
Día 7	1	46,97	78,48	70,22
	2	53,50	67,12	71,78
	3	65,38	77,83	66,98
Día 9	1	56,06	94,51	91,56
	2	57,50	95,05	88,80
	3	71,63	96,70	90,23
Día 12	1	70,20	97,89	96,00
	2	76,00	98,65	95,44
	3	78,85	100,00	95,35
Día 14	1	83,33	100,00	100,00
	2	86,50	100,00	98,76
	3	83,17	100,00	98,14
Día 16	1	95,45	100,00	100,00
	2	96,00	100,00	100,00
	3	95,19	100,00	100,00
Día 18	1	100,00	100,00	100,00
	2	100,00	100,00	100,00
	3	100,00	100,00	100,00

Tabla 11. Promedio de los porcentajes de biodegradabilidad de los ABs.

Tiempo	ABs Nanocelulosa (%)	ABs Quitosano (%)	ABs Híbrido (%)
Día 0	0	0	0
Día 2	19,3	37,6	36,6
Día 5	35,51	53,03	54,87
Día 7	55,28	74,48	69,66
Día 9	61,73	95,42	90,19
Día 12	75,02	98,85	95,59
Día 14	84,34	100,00	98,96
Día 16	95,55	100,00	100,00
Día 18	100,00	100,00	100,00
Promedio	65,8	82,4	80,7
Desviación estándar	26,00	24,54	23,98

ANEXO I. Análisis estadístico

POROSIDAD

Resumen Estadístico para % Porosidad

Tipo de Andamio	N°	Media	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
Nanocelulosa	3	89,38	0,903383	1,01072%	88,34	89,97	1,63
Quitosano	3	87,72	0,690966	0,787664%	86,95	88,28	1,33
Nanocelulosa / Quitosano	3	88,94	0,765528	0,860692%	88,3	89,79	1,49
Total	9	88,68	1,01136	1,14043%	86,95	89,97	3,02

Tabla ANOVA para % de porosidad por Tipo de Andamio.

Variable dependiente: % de porosidad

Factor: Tipo de andamio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,42362	2	2,21181	3,53	0,0970
Intra grupos	3,75913	6	0,626522		
Total (Corr.)	8,18276	8			

Pruebas de Múltiple Rangos para % Porosidad por Tipo de Andamio.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo de Andamio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ABs quitosano	3	87,7233	X
ABs híbrido	3	88,9433	XX
ABs nanocelulosa	3	89,38	X

Las letras que forman una misma columna, no presentan diferencia significativa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ABs nanocelulosa - ABs quitosano	*	1,65667	1,5814
ABs nanocelulosa - ABs híbrido		0,436667	1,5814
ABs quitosano - ABs híbrido		-1,22	1,5814

* indica una diferencia significativa.

CAPACIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA

Resumen Estadístico para Absorción

Tipo de Andamio	Nº	Media	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo
Nanocelulosa	12	2084,68	352,044	16,8872%	1670,15	2949,38
Quitosano	12	2524,32	244,537	9,68726%	2056,74	2755,01
Nanocelulosa/ Quitosano	12	2418,33	220,998	9,13843%	2032,18	2680,08
Total	36	2342,44	330,439	14,1066%	1670,15	2949,38

Tabla ANOVA para % de Absorción de agua por Tipo de Andamio.

Variable dependiente: % de absorción de agua

Factor: Tipo de andamio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,26335E6	2	631676,	8,15	0,0013
Intra grupos	2,55831E6	33	77524,4		
Total (Corr.)	3,82166E6	35			

Pruebas de Múltiple Rangos para % Absorción por Tipo de Andamio.

Método: 95,0 porcentaje LSD

Andamio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ABs nanocelulosa	12	2084,68	X
ABs híbrido	12	2418,33	X
ABs quitosano	12	2524,32	X

Las letras que forman una misma columna, no presentan diferencia significativa

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ABs nanocelulosa - ABs quitosano	*	-439,637	231,263
ABs nanocelulosa - ABs híbrido	*	-333,654	231,263
ABs quitosano - ABs híbrido		105,982	231,263

* indica una diferencia significativa.

BIODEGRADABILIDAD

Resumen Estadístico para % de Biodegradabilidad

Tipo de Andamio	Nº	Media	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo	Máximo	Rango
Nanocelulosa	24	65,84	27,6002	41,9201%	13,5	100,0	86,5
Qitosano	24	82,4179	23,8662	28,9576%	33,5	100,0	66,5
Nanocelulosa/ Qitosano	24	80,7362	23,5698	29,1936%	26,2	100,0	73,8
Total	72	76,3314	25,8368	33,8481%	13,5	100,0	86,5

Tabla ANOVA para % de Biodegradabilidad por Tipo de Andamios

Variable dependiente: % de Biodegradabilidad

Factor: Tipo de andamio

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	3996,43	2	1998,21	3,18	0,0479
Intra grupos	43398,8	69	628,968		
Total (Corr.)	47395,2	71			

Pruebas de Múltiple Rangos para % de Biodegradabilidad por Tipo de Andamios

Método: 95,0 porcentaje LSD

Tipo de Andamio	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ABs nanocelulosa	24	65,84	X
ABs híbrido	24	80,7362	X
ABs quitosano	24	82,4179	X

Las letras que forman una misma columna, no presentan diferencia significativa.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ABs nanocelulosa - ABs quitosano	*	-16,5779	14,4429
ABs nanocelulosa - ABs híbrido	*	-14,8962	14,4429
ABs quitosano - ABs híbrido		1,68167	14,4429

* indica una diferencia significativa.