



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA FÍSICA

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SCAFFOLDS
INTELIGENTES PARA APLICACIONES EN REGENERACIÓN DE
CARTILAGO”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

FÍSICA

AUTORA: BEVERLY NOEMI AVILEZ VELASCO

DIRECTORA: Biof. MARIA FERNANDA HEREDIA MOYANO MSc.

Riobamba – Ecuador

2022

© 2022, Beverly Noemi Avilez Velasco

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, BEVERLY NOEMI AVILEZ VELASCO, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 25 de julio de 2022

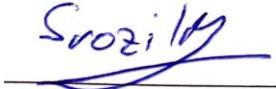


Beverly Noemi Avilez Velasco

2101010417

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA FÍSICA

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; Tipo: Proyecto Investigación, **“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SCAFFOLDS INTELIGENTES PARA APLICACIONES EN REGENERACIÓN DE CARTILAGO”**, realizado por la señorita: **BEVERLY NOEMI AVILEZ VELASCO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Fís. Jiri Svozilik Dr. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-08-09
Biof. María Fernanda Heredia Moyano Mgs. DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN		2022-08-09
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes Mtr. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-08-09

DEDICATORIA

El presente Trabajo de Titulación está dedicado, a todas las personas que en su debido momento me brindaron su apoyo incondicional para lograr sortear todas las vicisitudes que se presentaron en el transcurso de mi carrera. Es así que mi trabajo esta ofrendado a Dios que me ha dotado de sabiduría y entendimiento, a mis padres Noe y Ruth, pilares fundamentales en mi desarrollo intelectual y moral, a mis hermanos Josué y Magali que con su voz de aliento inspiraron esfuerzo y dedicación. Finalmente, una mención especial a mi querido abuelo, Gonzalo, un hombre sabio que supo compartir sus conocimientos empíricos de las ciencias exactas despertando en mí el deseo de conocer más sobre este campo que hoy me apasiona.

Beverly

AGRADECIMIENTO

Me es muy grato en este punto hacer mención a Dios por darme la oportunidad de demostrar mi fortaleza, mi desempeño y mi esfuerzo para lograr el objetivo en mi carrera. Agradezco infinitamente a mis padres por ser un pilar y un ejemplo digno a seguir y que con sus oraciones y buenos deseos siempre fueron mi compañía en la lejanía.

A mis hermanos, cuñado y más familiares por su desinteresada preocupación de mi bienestar y progreso tanto en el ámbito académico como personal, siendo una parte fundamental en mi vida cotidiana.

A la Ing. Catherine Carrasco quien creyó en mí y en el tema de Tesis, brindándome todo el apoyo necesario para el desarrollo de la misma, proporcionándome aliento en momentos difíciles y extenuantes sobre todo en la práctica de mi tesis. A la técnica de laboratorio de Electromagnetismo Gabriela Ureña, por ayudarme como amiga y como profesional en el periodo de realización de mi Proyecto de Titulación, A mis amigos y compañeros Ángel Rodríguez y Emily Altamirano por brindarme su amistad en toda la carrera; por último, agradezco a la Ing. Narcisa Portalanza que fue una de mis primeras amigas y docentes en mi formación académica.

Beverly

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	6
1.1. ¿Qué relación existe entre el oxígeno y el tejido cartilaginoso?.....	6
1.2. Scaffolds.....	6
1.3. Nanopartículas.....	6
1.4. Peróxidos liberadores de oxígeno.....	7
1.4.1. <i>Peróxidos inorgánicos sólidos</i>	8
1.4.2. <i>Peróxido de Calcio</i>	8
1.5. Scaffolds (andamios) a base de hidrogel.....	8
1.6. ¿Qué son los hidrogeles?.....	9
1.6.1. <i>Hidrogeles copolímeros</i>	9
1.6.2. <i>Hidrogeles de redes semi-interpenetradas</i>	10
1.6.3. <i>Hidrogeles de doble red</i>	10
1.6.4. <i>Hidrogeles híbridos</i>	11
1.7. ¿Qué es el GelMA?.....	11
1.8. Técnicas de caracterizaciones.....	12
1.8.1. <i>Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)</i>	12
1.8.2. <i>Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)</i>	13
1.9. Propiedades Mecánicas del hidrogel GelMA.....	14
1.10. Degradabilidad.....	14
1.11. Estudio de hinchamiento.....	15
1.12. Cinética de liberación.....	15

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	17
2.1.	Equipos	17
2.2.	Síntesis del Peróxido de Calcio	21
2.3.	Obtención del PBS	22
2.4.	Síntesis del Irgacure	22
2.5.	Obtención de la Gelatina Metacriolio (GelMA)	22
2.6.	Preparación de los envases para los tests	23
2.7.	Preparación de las muestras	23
2.8.	Exposición UV de las muestras	24
2.8.1.	<i>Montaje del UV</i>	25
2.8.2.	<i>Montaje de caja negra para la exposición UV</i>	26
2.9.	Pruebas de caracterización	27

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	28
3.1.	Resultados FTIR del Peróxido de Calcio	28
3.2.	Resultados FTIR de scaffold inteligentes a base de GelMA	29
3.2.1.	<i>Muestra de control (Concentración 0% de Peróxido de Calcio)</i>	29
3.2.2.	<i>Muestra con 0,1% de concentración de Peróxido de Calcio</i>	30
3.2.3.	<i>Muestra con 1% de concentración de Peróxido de Calcio</i>	31
3.2.4.	<i>Muestra con 2% de concentración de Peróxido de Calcio</i>	32
3.3.	Resultados SEM de scaffold inteligentes a base de GelMA	33
3.3.1.	<i>Muestra de control (Concentración 0% de Peróxido de Calcio)</i>	33
3.3.2.	<i>Muestra con 0,1% de concentración de Peróxido de Calcio</i>	34
3.3.3.	<i>Muestra con 1% de concentración de Peróxido de Calcio</i>	35
3.3.4.	<i>Muestra con 2% de concentración de Peróxido de Calcio</i>	37
3.4.	Análisis de liberación de oxígeno del CPO con investigaciones ya publicadas	37
3.5.	Comparación de resultados con investigaciones ya publicadas	37

CONCLUSIONES	38
RECOMENDACIONES	39
GLOSARIO	
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Elementos para la concentración del PBS.....	22
Tabla 2-2:	Tabla de contenido de cada tubo falcon.....	23
Tabla 3-3:	Medidas de ángulos y perímetros tomados en ImageJ.....	35
Tabla 4-3:	Medidas de ángulos y perímetros tomados en ImageJ.....	36
Tabla 5-3:	Medidas de ángulos y perímetros tomados en ImageJ.....	37
Tabla 6-3:	Comparación de Resultados.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Esquema de la síntesis de las nanopartículas	7
Figura 2-1. Hidrogeles en forma de red tridimensional.	9
Figura 3-1. Fotografía de copolímeros hidrogeles	10
Figura 4-1. Estructura de hidrogeles: (a) semi-IPN; (b) full IPN3.....	10
Figura 5-1. Estructura de las redes poliméricas de doble red (DN): primera red en azul (más entrecruzada), segunda red en rojo (menos entrecruzada).....	11
Figura 6-1. Cadena de Gelatina de metacrililo.....	12
Figura 7-1. Cabeza de hormiga, vista con un microscopio electrónico de barrido	13
Figura 8-1. Absorción [% A] versus longitud de onda [cm-1].....	14
Figura 9-1. Degradabilidad del GelMA	15
Figura 10-2. Agitador Shaker.....	17
Figura 11-2. Balanza Digital.....	18
Figura 12-2. Espectrómetro de infrarrojo.....	19
Figura 13-2. Microscopio electrónico de barrido.....	19
Figura 14-2. Estufa del Laboratorio	20
Figura 15-2. Lámpara UV.....	20
Figura 16-2. Peróxido de Calcio	21
Figura 17-2. Envases para los test.....	23
Figura 18-2. Tubos falcons con cada etiqueta.....	24
Figura 19-2. Exposición UV de las muestras con la caja negra.....	25
Figura 20-2. Exposición UV de las muestras dentro de la caja negra.....	25
Figura 21-2. Montaje UV dentro de la caja negra.....	26
Figura 22-2. Montaje de la caja negra para la exposición UV	26
Figura 23-3. Peróxido de Calcio sintetizado.....	29
Figura 24-3. Muestra de control o concentración 0% en el SEM.	34
Figura 25-3. Muestra con 0,1% de concentración en el SEM.....	34
Figura 26-3. Muestra con 1% de concentración en el SEM.....	36
Figura 27-3. Muestra con 2% de concentración en el SEM.....	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. Espectros FTIR del Peróxido de Calcio.....	28
Gráfico 2-3. Espectro FTIR de la muestra de control.	30
Gráfico 3-3. Espectro FTIR de la muestra 0,1% de concentración.	31
Gráfico 4-3. Espectro FTIR de la muestra 1% de concentración.	32
Gráfico 5-3. Espectro FTIR de la muestra 2% de concentración.	33

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. MANIPULACIÓN DEL GELMA

ANEXO B. PESO TOTAL DE GELMA

ANEXO C. USO DEL VORTEX

ANEXO D. SINTESIS DEL PEROXIDO DE CALCIO

ANEXO E. PREPARACION DEL PEROXIDO DE CALCIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

GeIMA	Gelatina Metacrilóila
Gel	Gelatina
PEG	Polietilenglicol
MPa	MegaPascales
GPa	GigaPascales
CaO₂	Peróxido de Calcio
CPO	Peróxido de Calcio
Na₂CO₃	Percarbonato de Sodio
MgO₂	Peróxido de Magnesio
°C	Grados Celsius
MEB	Microscopía Electrónica de Barrido
FTIR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier
W	Peso
ml	Mililitros
g	Gramos
UV	Ultravioleta
PBS	Buffer Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)
NaCl	Cloruro de Sodio
KCl	Cloruro de Potasio
KH₂PO₄	Fosfato de Potasio
Na₂HPO₄	Fosfato de Sodio
H₂O₂	Peróxido de Hidrogeno
Ca(OH)₂	Hidróxido de Calcio

RESUMEN

Este trabajo de investigación tuvo como finalidad sintetizar y caracterizar scaffolds inteligentes para aplicaciones en regeneración de cartílago para lo cual se obtuvo scaffolds de Gelatina Metacrililoila (GelMA) cargados con partículas inteligentes que liberaron cantidades controladas de Oxígeno; se caracterizó los hidrogeles inteligentes a través de técnicas espectroscópicas y microscopia electrónica, además los resultados obtenidos fueron comparados con resultados que se utilizan actualmente en aplicaciones. Este trabajo de investigación se basó en la construcción de un scaffold a base de hidrogel capaz de promover la regeneración del cartílago, el tipo de investigación conllevó a un método mixto: cualitativo y cuantitativo, para cumplir con los objetivos de estudio se necesitó un modelo de investigación con un enfoque deductivo que dio una perspectiva más amplia y general del estudio en cuestión; por ello el método mixto que se utilizó da una mejor variedad de perspectivas con los datos cuantitativos. Por consiguiente, se desarrolló la obtención del Peróxido de Calcio, juntamente con la elaboración del fotorreticulante “Irgacure en líquido”, paso posterior fueron sintetizados los scaffolds de GelMA y GelMA con nanopartículas de peróxido de calcio (CPO) a diferentes concentraciones. En conclusión, se sintetizó scaffolds inteligentes a base de gelatina metacrililoilo cargadas con partículas de CPO liberadoras de oxígeno con diferentes concentraciones (0% p/v, 0,1% p/v, 1% p/v y 2% p/v), obteniendo como características estructuras porosas y biocompatibles. Donde estos scaffolds son candidato para la aceleración y regeneración de tejidos cartilagosos que poseen en ambiente de hipoxia. Al momento de sintetizar el peróxido de calcio se recomienda realizar un análisis estequiométrico para tener una ecuación balanceada que determina las proporciones entre reactivos y productos, de esta manera no se desperdicia producto y se sabe las cantidades adecuadas para la obtención del peróxido de Calcio.

Palabras clave: <SCAFFOLDS>, <PERÓXIDO DE CALCIO>, <GELATINA METACRILILOILA (GELMA)>, <IRGACURE>, <LIBERADORES DE OXÍGENO>, <CARTÍLAGO>, <HIDROGEL>, <REGENERACIÓN>.


D.B.R.A.I.
Ing. Cristian Castillo



SUMMARY

The aim of this research work was to synthesise and characterise smart scaffolds for cartilage regeneration applications by obtaining Gelatine Methacryloyl Gel (GelMA) scaffolds loaded with smart particles that released controlled amounts of oxygen; the smart hydrogels were characterised using spectroscopic techniques and electron microscopy, and the results obtained were compared with results that are currently used in applications. This research work was based on the construction of a hydrogel-based scaffolds capable of promoting cartilage regeneration, the type of research led to a mixed method: qualitative and quantitative, to meet the study objectives a research model with a deductive approach was needed to give a broader and more general perspective of the study in question; therefore, the mixed method that was used gives a better variety of perspectives with quantitative data. Consequently, the Calcium Peroxide was developed, together with the elaboration of the photoreticulant "Irgacure in liquid", followed by the synthesis of GelMA and GelMA scaffolds with Calcium Peroxide (CPO) nanoparticles at different concentrations. In conclusion, smart scaffolds based on methacryloyl gelatine loaded with oxygen releasing CPO particles with different concentrations (0% w/v, 0.1% w/v, 1% w/v and 2% w/v) were synthesised, obtaining porous and biocompatible structures as characteristics. These scaffolds are candidates for the acceleration and regeneration of cartilaginous tissues in a hypoxic environment. When synthesising calcium peroxide, it is recommended to carry out a stoichiometric analysis to have a balanced equation that determines the proportions between reactants and products, in this way no product is wasted, and the right quantities are known for obtaining calcium peroxide.

Keywords: <SCAFFOLDS>, <CALCIUM PEROXIDE>, <GELATIN METHACRYLOYL (GELMA)>, <IRGACURE>, <OXYGEN RELEASERS>, <CARTILAGE>, <HYDROGEL>, <REGENERATION>.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial se escucha con frecuencia enfermedades acerca del desgaste del cartílago, los mismos que van lentamente postrándoles a sillas o dejando a personas sin la movilidad necesaria, es importante contribuir en la medicina por medio de la física; ayudando así a facilitar la calidad de vida de las personas, dando esperanzas a individuos que nacen con problemas del cartílago o personas de avanzada edad.

En el Ecuador los índices de patologías asociadas con osteoartrosis muestran indicadores altos, el desgaste y pérdida de cartílago es una de las anomalías que representa el 0.5-1% de afectación a la población a nivel mundial (CENSOS, 2018), ésta anomalía por años ha venido siendo un problema generalmente para las personas de la tercera edad, mayor a 60 años, debido a que es una enfermedad progresiva y de comienzo insidioso, sin embargo, también puede afectar a la población más joven, por el estilo de vida que llevan, posibles golpes y exceso de ejercicio de alto impacto, hacen que exista la pérdida progresiva de cartílago, necesitando asistir a tratamiento que muchas veces son tranquilizantes, incluyen corticoides, infiltraciones de plaquetas, terapia combinada alivian los fuertes dolores más no regeneran el cartílago desgastado además son costosos, la prevalencia es mayor en las mujeres a comparación de los hombres 6-8/1 (Álvarez Solorzano and Flores Ledesma, 2020, p. 12).

El Ecuador está en la capacidad de crear nuevas tecnologías en ingeniería tisular y ser parte de trabajos que a nivel mundial están siendo realizados y estudiados, es necesario que las universidades en el país realicen convenios con grupos de investigación a nivel internacional, con la finalidad de solventar la falta de equipamiento, pudiendo de esta forma generar un mayor porcentaje de investigación, participación y conocimiento en temas de investigación como es el uso de biomateriales, mismos que a largo plazo pueden ser aplicados en las personas que padecen enfermedades degenerativas, como la osteoartrosis.

ANTECEDENTES

El cartílago es un tejido que no posee vasos sanguíneos, es decir, que su regeneración lleva mucho más tiempo que los tejidos que están expuestos al aire, como por ejemplo el tejido de la piel, por ello muchos científicos optan que las células alcancen el oxígeno por el método de difusión.

Teniendo en cuenta las ventajas de los en términos de biocompatibilidad a largo plazo junto con los problemas técnicos y éticos que acompañan a las cirugías de revisión, las investigaciones sobre la aplicación de biomateriales biodegradables en lugar de dispositivos protésicos permanentes ayudar en la reparación y regeneración de tejidos se han incrementado vigorosamente (Yoon et al., 2016, p. 2). Como resultado, los biomateriales poliméricos están reemplazando rápidamente a otras clases de materiales, como metales, aleaciones y cerámicas, debido a su versatilidad. Dentro del mercado global de biomateriales implantables, se espera que el sector de biomateriales poliméricos muestre el mayor crecimiento, con una tasa compuesta anual de 22,1%, debido a su potencial prometedor en una amplia gama de aplicaciones biomédicas (Song et al., 2018, p. 6).

Desde 1881 el médico Étienne Jules Marey realizó estudios explicando un dispositivo artificial de un órgano (corazón), pero nunca se alcanzó a construir uno. Cerca de la segunda Guerra Mundial hasta años después comenzaron a comercializar polímeros y metales para implantes. Durante la década de los setenta, fue necesario investigar nuevos materiales para controlar su estructura, ortodoxia y propiedades físicas. Estos materiales fueron cerámicas activas y polímeros biodegradables. Al pasar los años se ha maximizado el conocimiento en estos materiales a tal punto que han logrado la unión de la medicina regenerativa y los materiales con tejidos y células. Finalmente, en el siglo XXI, las propiedades de los materiales e interacción celular se unen para alcanzar el biomaterial correcto para el uso adecuado (Horna, 2011, p. 7).

En el 2010, científicos del Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) realizaron estudios sobre la regeneración del cartílago, este estudio fue una de las primeras investigaciones que permitió que un fármaco ingresare al interior del cartílago para combatir contra la artrosis y regenerar el mismo (Velasco, 2018). La artrosis es una enfermedad que desgasta el cartílago por el motivo de la edad o lesiones que sufren las personas en el diario vivir. Por ello, los científicos del MIT han optado por diseñar un nanotransportador calificado para ingresar al interior del cartílago y trasladar fármacos hasta las células (condrocitos). Este nanotransportador es una molécula que consiste de una parte en forma de esfera a la que se adhiere un fármaco, su estructura con la forma de una rama esta con carga positiva (+) y un combinado llamado polietilenglicol (PEG). Y dado que el cartílago posee carga negativa (-), la carga del nanotransportador se unen al tejido.

Estudios científicos han tratado de encontrar biomateriales similares al cartílago que contengan principalmente colágeno que permitan el movimiento adecuado de las articulaciones sin tocar los huesos, incluso cuando saltamos o corramos por mucho tiempo. Lastimosamente hoy en día no existe dicho material que cumpla las mismas funciones y características de un cartílago (Engel, 2019, p. 26).

Hoy en día se habla mucho de los scaffolds, que son matrices extracelulares en donde las células son sembradas para que luego crezca el nuevo tejido, con estos tejidos se pueden regenerar piel, órganos, articulaciones y sobre todo cartílago. Los scaffolds tienen una estructura permeable y deben tener la consistencia indispensable para simular un tejido como el cartílago. El scaffold está constituido de biomateriales que son materiales aplicados en la producción de mecanismos que se relaciona con sistemas biológicos; este uso de biomateriales se ha desarrollado en gran medida, satisfaciendo funciones en todo el cuerpo. Para que pueda llamarse biomaterial debe constar de tres condiciones, primero debe ser biocompatible (que el organismo no demuestre ninguna reacción o anomalía), segundo no debe ser tóxico y por último debe tener resistencia mecánica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el Ecuador los índices de patologías asociadas con osteoartritis muestran indicadores altos, el desgaste y pérdida de cartílago es una de las anomalías que representa el 0.5-1% de afectación a la población a nivel mundial (CENSOS, 2018), ésta anomalía por años ha venido siendo un problema generalmente para las personas de la tercera edad, mayor a 60 años, debido a que es una enfermedad progresiva y de comienzo insidioso, sin embargo, también puede afectar a la población más joven, por el estilo de vida que llevan, posibles golpes y exceso de ejercicio de alto impacto, hacen que exista la pérdida progresiva de cartílago, necesitando asistir a tratamiento que muchas veces son tranquilizantes, incluyen corticoides, infiltraciones de plaquetas, terapia combinada alivian los fuertes dolores más no regeneran el cartílago desgastado además son costosos, la prevalencia es mayor en las mujeres a comparación de los hombres 6-8/1 (Álvarez Solorzano and Flores Ledesma, 2020, p. 12).

El Ecuador está en la capacidad de crear nuevas tecnologías en ingeniería tisular y ser parte de trabajos que a nivel mundial están siendo realizados y estudiados, es necesario que las universidades en el país realicen convenios con grupos de investigación a nivel internacional, con la finalidad de solventar la falta de equipamiento, pudiendo de esta forma generar un mayor porcentaje de investigación, participación y conocimiento en temas de investigación como es el uso de biomateriales, mismos que a largo plazo pueden ser aplicados en las personas que padecen enfermedades degenerativas, como la osteoartritis.

FORMULACIÓN

¿Cómo sintetizar scaffolds inteligentes basados en gelatina metacrililo GelMA con nanopartículas inteligentes (partículas liberadoras de oxígeno)?

JUSTIFICACIÓN

La osteoartritis resulta ser uno de los problemas que ataca paulatinamente al ser humano, la principal consecuencia es la no regeneración del tejido hialino, debido a la falta de vascularización de este tipo de requiere sufrir varias intervenciones dolorosas y costosas. Es importante buscar nuevos materiales y sintetizarlos que actúen como una matriz extracelular usando biomateriales basados en polímeros naturales que, al tejido. En la actualidad se presentan terapias de corto plazo en las cuales, el individuo ser modificados y reticulados, permitan formar un material que actué como matriz extracelular, con las mismas propiedades de la matriz extracelular nativa, la cual permita un cultivo celular, cargar de nanopartículas inteligentes o cargar un fármaco en su estructura.

El GelMA es una gelatina metacrililo que puede ser reticulada mediante procesos físicos o químicos para mejorar sus propiedades y dar como resultado un andamio en el que parámetros como la temperatura no afecten su estructura y al mismo tiempo este tipo de hidrogeles pueden estar cargados de partículas inteligentes que permitan una liberación controlada de cantidades de oxígeno a través de la porosidad que presentan. Evaluar las propiedades físicas, químicas y mecánicas de los scaffolds es de suma importancia, dependiendo de sus características se podrán asumir que se han obtenido matrices que se asemejen a la matriz extracelular del tejido cartilaginoso.

Este tema de investigación es viable debido a que los reactivos necesarios son facilitados en cierta parte por el proponente y los equipos de los laboratorios que posee la Facultad de Ciencias, da la viabilidad de su realización. El resultado de este estudio beneficiará a la Facultad de Ciencias y a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por ser un tema de interés que permite trabajar en conjunto con otras universidades del exterior y crear vínculos.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar scaffolds inteligentes para aplicaciones en regeneración de cartílago.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar scaffolds de GelMA cargados con partículas inteligentes que liberen cantidades controladas de Oxígeno.
- Caracterizar los hidrogeles inteligentes a través de técnicas espectroscópicas y microscopia electrónica.
- Comparar los resultados entre nuevos y los que se utilizan actualmente en aplicaciones.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. ¿Qué relación existe entre el oxígeno y el tejido cartilaginoso?

El cartílago es uno de los tejidos avasculares, es decir, no poseen vasos sanguíneos por lo tanto las células (condrocitos) están en un ambiente hipóxico y eso dificulta al cartílago en su regeneración, es importante la presencia de oxígeno al momento que se realiza el proceso de regeneración del tejido, porque el oxígeno es un requerimiento para la proliferación celular y la creación de nuevos tejidos. Y aunque estas células del cartílago son adecuadas para soportar un ambiente de hipoxia, es necesario un nivel de oxígeno para realizar su actividad metabólica normalmente (Carrasco Montesdeoca y Salazar Montero, 2021, p. 6).

A comparación del tejido de la piel que trabaja en un ambiente aeróbico, es decir que está expuesto al aire y en este caso estamos hablando de un 100% y, no necesita cantidades de oxígeno es un tejido vascular. el tejido óseo es un tejido que está en constante formación, contiene un proceso de remodelado que tiene como finalidad la reabsorción de una cantidad de hueso hecho por los osteoclastos, este tejido se caracteriza por su rigidez y porque tiene suficientes vasos sanguíneos.

Por último, el tejido cartilaginoso por ser uno de los tejidos que no tienen vasos sanguíneos, necesita cantidades de oxígeno entre 5% y 10%, los condrocitos a ese rango tienen mejor actividad (Carrasco Montesdeoca y Salazar Montero, 2021, p. 7).

1.2. Scaffolds

El scaffold perfecto para regenerar el cartílago debe tener una porosidad mayor al 90%, el diámetro de cada poro debe ser aproximadamente entre 10 nanómetros y 500 micrómetros, además sus propiedades mecánicas deben tener una dureza de 2 a 12 MPa $\frac{1}{2}$ y una fuerza de 100 a 200 MPa, por último, el módulo de compresión debe estar entre 15 a 20 GPa y dentro de las propiedades biológicas debe tener una excelente biocompatibilidad (Rodríguez, 2019, p. 7).

1.3. Nanopartículas

Las nanopartículas son microscópicas de hidrogel, se consideran nanopartículas por presentar tamaños menores de 1×10^{-9} ; se condensan a partir de polimerizaciones de emulsión invertida proporcionando una dispersión estable. Para preparar las nanopartículas se debe tener en cuenta

la estabilidad química y física del agente a trabajar, que tan toxica puede ser la nanopartícula, su perfil de liberación, el método de síntesis.

Para sintetizar las nanopartículas se suelen agrupar en dos categorías que son: “Top down” y “Bottom up” que significa aproximaciones hacia abajo y hacia arriba respectivamente (Márquez et al., 2021, p. 13). El método “top down” consiste en dividir sólidos másicos en partes muy pequeñas, este método se enfoca en involucrar el desgaste y volatilidad de un sólido, seguido por la condensación de los elementos volátiles, mientras que el método “bottom up” es la producción de nanopartículas por medio de la condensación de entidades moleculares en una solución o fase gaseosa.

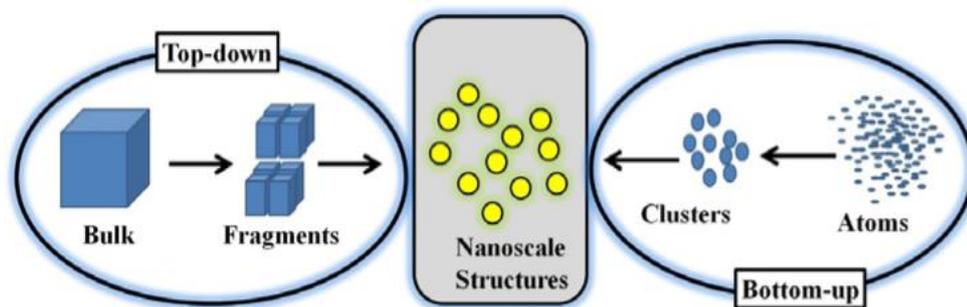


Figura 1-1. Esquema de la síntesis de las nanopartículas

Fuente: Márquez et al., 2021.

Después de haber obtenido las nanopartículas por cualquier método, se clasifican en dos tipos metálicas y no metálicas. Las nanopartículas metálicas tienen resultados mayores de absorción y dispersión de la luz, en efecto estas partículas tienen la disposición de constituirse en sistemas biológicos. Por otra parte, tenemos las nanopartículas no metálicas, que pueden ser de hidrogeles que están constituidos por una malla de polímeros hidrofílicos en escala pequeña. Como inconveniente tenemos la cinética de liberación, que se puede controlar cambiando la velocidad de degradación de los enlaces entrelazados y por medio de estímulos externos, esta degradación se puede controlar por medio de la temperatura y el pH (Kompella et al., 2013, p. 12).

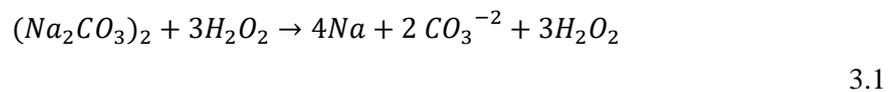
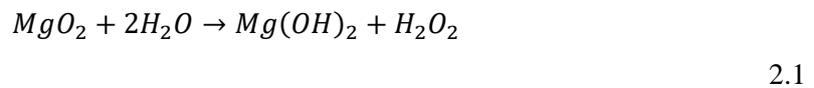
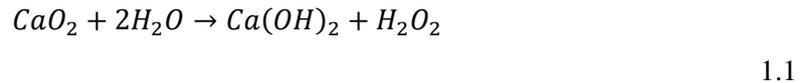
Las nanopartículas a base de peróxidos liberadores de oxígeno son muy importantes debido a que tienen gran versatilidad y la oxigenación se puede controlar, lo que quiere decir es que no debe exceder el rango entre 5% y 10% de oxígeno liberado caso contrario podría dañar la vascularización.

1.4. Peróxidos liberadores de oxígeno

Los materiales inteligentes que emiten oxígeno se pueden generar al instalar peróxidos sólidos, líquidos y fluorados, integrados en fabricaciones de distintas formas como nanopartículas, scaffolds, nanofibras, electrohilado y microesferas (Carrasco Montesdeoca y Salazar Montero, 2021, p. 8).

1.4.1. Peróxidos inorgánicos sólidos

En los últimos años los peróxidos inorgánicos sólidos se han utilizado en la aplicación de ingeniería de los tejidos; los peróxidos más utilizados en este campo son los peróxidos de calcio (CaO₂), percarbonato de sodio (Na₂CO₃) y peróxido de magnesio (MgO₂) (Gholipourmalekabadi et al., 2016, p. 26). Cuando estos materiales reaccionan con el agua se dispersan en peróxidos de hidrogeno. A continuación, las reacciones de los materiales mencionados:



El peróxido de calcio (CaO₂) se convirtió en uno de los nanobiomateriales más usados en la aplicación de tejidos gracias a que posee el 70% de pureza y se encuentra accesible en el ámbito comercial. En cambio, el peróxido de magnesio tiene baja solubilidad por ello tiene una velocidad lenta de reacción (Gholipourmalekabadi et al., 2016, p. 26-27).

1.4.2. Peróxido de Calcio

El compuesto que libera oxígeno de una mejor manera es el peróxido de calcio (16%-18% por peso de oxígeno) también conocido como dióxido de Calcio y su fórmula química es CaO₂, este compuesto químico se colapsa para liberar oxígeno, cuando se pone en contacto con materiales hidratados. Este peróxido se caracteriza por ser estable a la temperatura y se desintegra en el aire húmedo lentamente. Este peróxido pertenece a los sólidos por ser un polvo de color blanco o amarillento que no tiene aroma ni sabor (Schuurman et al., 2013, párr. 5)

1.5. Scaffolds (andamios) a base de hidrogel

Los scaffolds son matrices porosas, poliméricas y biodegradables, cuyo objetivo es que funcione como plataforma para el crecimiento de células, estos scaffolds se fabrican a base de hidrogel. Este proceso consta de cuatro etapas; la primera se trata sobre la disolución que es la preparación de una disolución de un biopolímero, en dicho proceso se emplea el colágeno como materia prima y como disolvente ácido acético, luego viene la segunda etapa que se procede a centrifugar usando un tubo falcón durante siete minutos; la disolución una vez centrifugada se

congela a 40 °C esto consta como la tercera etapa, por último, se realiza la etapa de liofilización durante 24 horas con el objetivo de sublimar el solvente congelado.

1.6. ¿Qué son los hidrogeles?

Los hidrogeles como su palabra lo indica, son geles poliméricos hidrofílicos que se caracterizan por tener una red tridimensional de cadenas flexibles que se hinchan cuando se relacionan con medios acuosos sin perder su forma alcanzando así su mayor nivel de hidratación e índice de hinchamiento. Los hidrogeles tienen un comportamiento de gran movilidad de las cadenas debido a la presencia del agua que poseen.

El hidrogel es un tipo de andamio polimérico, pueden estar constituidos de polímeros naturales y sintéticos, pueden absorber agua, en un 90% de peso, además tienen la característica de intercambiar oxígeno y nutrientes. Los tipos de hidrogeles se pueden clasificar dependiendo de su estructura química y componentes que se utilizan para su síntesis.



Figura 2-1. Hidrogeles en forma de red tridimensional.

Fuente: EcuRed, 2022.

1.6.1. *Hidrogeles copolímeros*

Los hidrogeles se componen de dos o más monómeros que se pueden polimerizar en cadenas aleatorias o de bloques (dependiendo de la reactividad y las condiciones de reacción de los monómeros). Los hidrogeles copolímeros se pueden sintetizar cuando se desee combinar o fortalecer el material para conferir una propiedad particular al monómero (Ramírez et al., 2016, p.3).



Figura 3-1. Fotografía de copolímeros hidrogeles

Fuente: Ramírez, y otros, 2016.

1.6.2. *Hidrogeles de redes semi-interpenetradas*

Este tipo de hidrogeles con redes semi-interpenetradas se componen entre la reticulación y polimerización de los monómeros en presencia del polímero a formar. Quedando atrapado el polímero en una red tridimensional de hidrogeles. Esta es una habilidad diseñada para renovar las propiedades mecánicas del hidrogel e incrementar las propiedades de los polímeros al material final (Ramírez et al., 2016, p. 3).

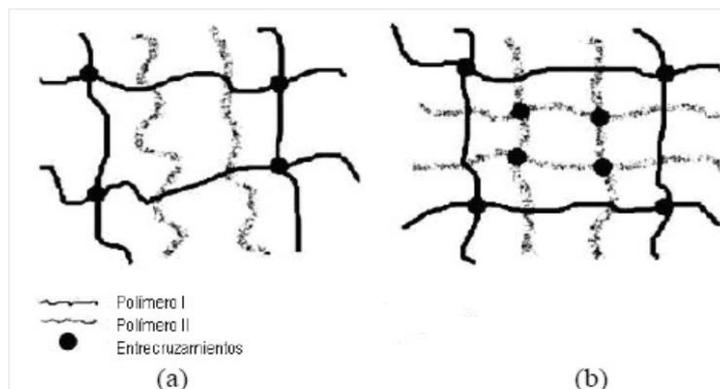


Figura 4-1. Estructura de hidrogeles: (a) semi-IPN; (b) full IPN3

Fuente: Laya, y otros, 2017.

1.6.3. *Hidrogeles de doble red*

Este tipo de hidrogeles constan de dos redes interpenetradas, que lo hacen suave y a la vez fuerte y ofrecen excelentes propiedades mecánicas. Estos hidrogeles suaves y húmedos son buenos candidatos como alternativas a las estructuras de soporte. En cuanto a sus propiedades mecánicas superiores en comparación con los hidrogeles convencionales se obtienen mediante síntesis de dos fases en donde que la red dos se forma a partir de la red uno (Ramírez et al., 2016, p. 4).

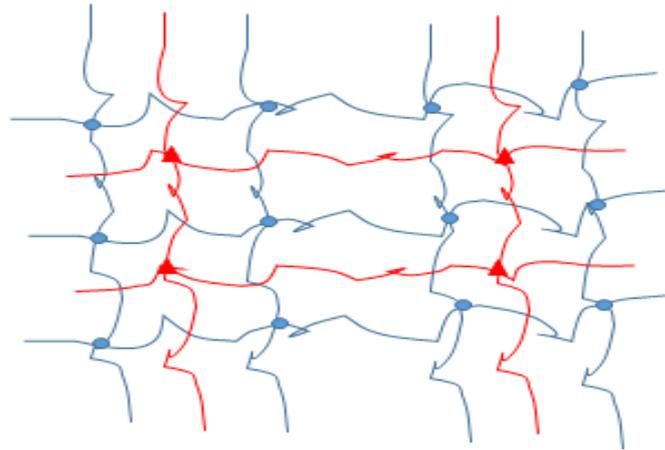


Figura 5-1. Estructura de las redes poliméricas de doble red (DN).

Fuente: Ramírez, y otros, 2016.

1.6.4. Hidrogeles híbridos

Este tipo de hidrogeles se caracteriza por tener una fase orgánica formada por cadenas poliméricas reticulares, así como una fase inorgánica que interactúa químicamente o físicamente. Considerando las propiedades, este tipo de hidrogeles presenta propiedades superiores en cuanto a los hidrogeles tradicionales (Ramírez et al., 2016, 4).

1.7. ¿Qué es el GelMA?

GelMA (Gelatina de metacriloilo), es una gelatina que ha llamado la atención en el ámbito de biomedicina ya que tiene una biocompatibilidad con las células y una disposición para crear hidrogeles polimerizados cuando se encuentra con un fotoiniciador. Científicos y estudios han evidenciado que el GelMA posee una capacidad extraordinaria para regenerar tejidos en 3 dimensiones.

En la revista Biofabrication en el año 2017, se publicó que los hidrogeles a base de GelMA fueron diseñados para la regeneración en medicina, esta gelatina es una biotinta que simula materia prima para la fabricación biológica. A consecuencia de que es fácil de sintetizar, por último, el GelMA cuando esta soluble a temperaturas bajas puede crear gotitas uniformes y una mayor estabilidad a temperaturas ambientes, lo que es una buena opción para realizar bioimpresiones en 3 dimensiones (Nakamura et al., 2021, p. 2).

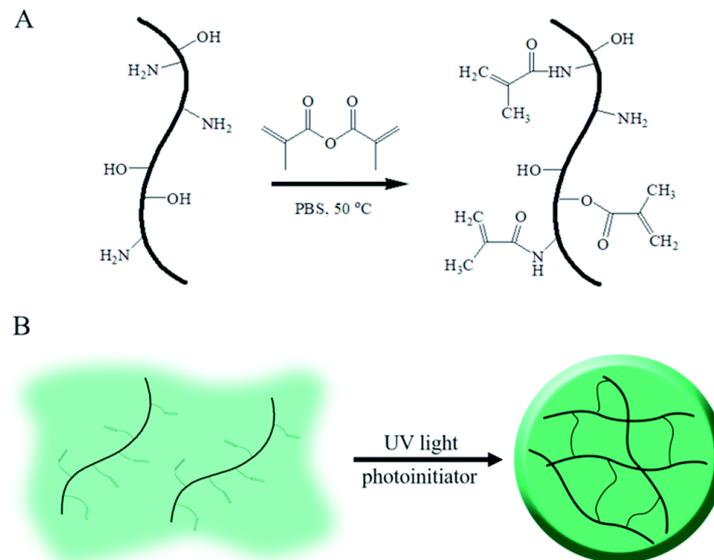


Figura 6-1. Cadena de Gelatina de metacriloilo

Fuente: Dong, y otros, 2019.

1.8. Técnicas de caracterizaciones

En los sólidos se realizan caracterizaciones de distintas formas, esto tiene como objetivo obtener cualitativa y cuantitativamente para aprender como el catalizador consisten simultáneamente en el bulk y en la superficie y sus transformaciones tiene como consecuencia un tratamiento térmico.

1.8.1. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Este método se basa en usar electrones para crear imágenes de cualquier tipo incluyendo los hidrogeles. Estas imágenes son de alta resolución, es decir, que la muestra puede verse estrechamente examinada con una alta amplificación. La producción de estas muestras es parcialmente simple por que la mayor parte de MEB solo deben ser conductoras. En esta técnica la muestra por lo general se cubre con una capa delgada de metal (puede ser el oro) para proporcionarles las propiedades conductoras de la muestra. Luego se arrastra de los electrones acelerados que pasan por el cañón. Un detector calcula la cantidad de electrones transmitidos, lo que da la intensidad de la zona de muestreo en la que se pueden observar figuras tridimensionales, proyectadas en una imagen de televisión.

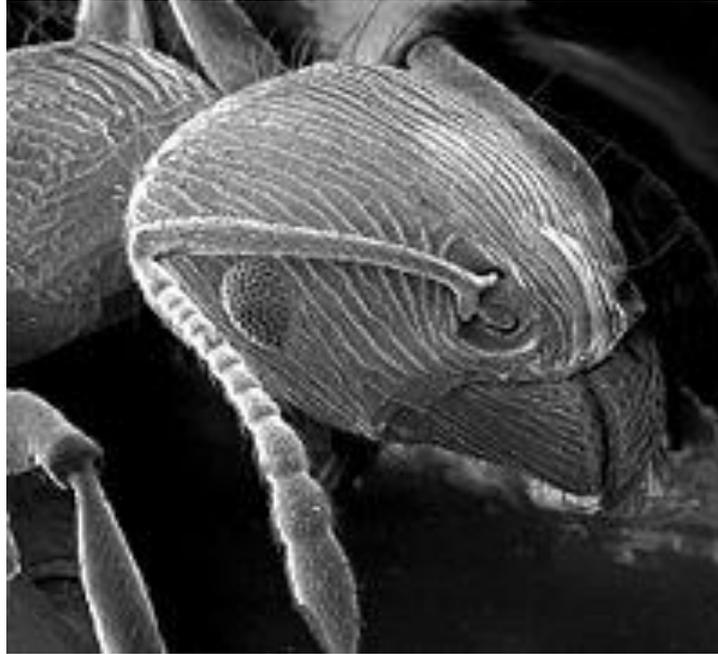


Figura 7-1. Cabeza de hormiga, vista con un microscopio electrónico de barrido.

Realizado por: Ayora, 2004.

1.8.2. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Esta espectroscopía es un método de uso técnico, por lo general se la utiliza para estudiar y comprobar la incorporación de los monómeros en la construcción del hidrogel, además permite la existencia de grupos funcionales que caracterizan cada monómero. En el campo ambiental, donde se aplican los hidrogeles al proceso de pruebas acuosas para eliminar contaminantes tales como metalizaciones pesadas, tintes, aniones, etc. La FTIR tiene la posibilidad de examinar sus interacciones que pasan entre los contaminantes y la matriz reticular.

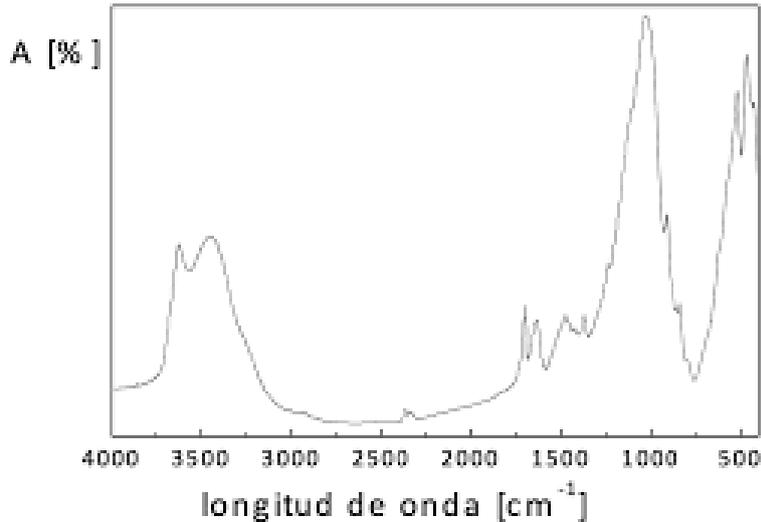


Figura 8-1. Absorción [% A] versus longitud de onda [cm^{-1}].

Fuente: Piqué y Vásquez, 2012.

1.9. Propiedades Mecánicas del hidrogel GelMA

Estas propiedades pueden ser medidas mediante dos pruebas, de compresión y de tracción. Mismas que se pueden regular modificando su concentración de GelMA y el tiempo expuesto en los rayos ultravioleta (UV). Esto se debe a que existe una relación entre el módulo de compresión del hidrogel GelMA y la concentración de ley y potencia, además tenían una relación exponencial con el tiempo (Schuurman et al., 2013, p. 7). Para controlar el módulo de compresión se debe regular el grado de GelMA. Según (Nichol et al., 2010, p. 5) las propiedades mecánicas están relacionadas con la concentración GelMA y el grado de metacrilación. Para aumentar el módulo de compresión del hidrogel, se debe aumentar el grado de metacrilación y mantener la concentración del GelMA.

1.10. Degradabilidad

En el ámbito de la biomedicina, es necesario estudiar la biodegradabilidad en los componentes del hidrogel. Para poder tener un tejido desarrollado y maduro, las células se tienen que regenerar y degradar al ámbito del hidrogel. Anteriormente GelMA ya ha sido comprobado, de la misma manera que la gelatina en su forma original, conserva su sensibilidad a la degradación enzimática. Por ende, el influjo del hidrogel encanalizado por los perfiles nanoliposoma o nanoemulsión debe ser investigado alrededor del movimiento enzimático (Rahali et al., 2017, p. 5-6).

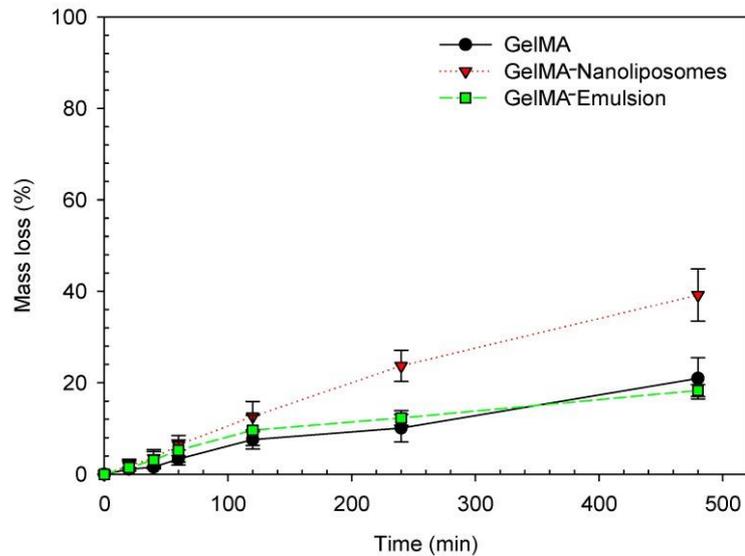


Figura 9-1. Degradabilidad del GelMA

Fuente: Rahali, y otros, 2017.

1.11. Estudio de hinchamiento

El estudio del hinchamiento se da en un medio acuoso, debido a que los hidrogeles se hinchan al tener contacto con el agua, esta técnica se utiliza para cuantificar el agua captada. La cantidad de agua que absorbe un hidrogel se puede medir mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Hinchamiento} = \frac{W - W_0}{W_0} * 100$$

4.1

Donde:

W es el peso del hidrogel a diferentes tiempos.

W₀ es el peso inicial del hidrogel.

1.12. Cinética de liberación

Para que las nanopartículas puedan ser liberadas es necesario que se encuentre en presencia de una solución acuosa. La disolución es el proceso por el cual una sustancia sólida cuando está en un solvente tiene la propiedad de disolverse. Este proceso se llama liberación y abarca tres procesos: disgregación, disolución y difusión.

Por lo general, la velocidad para la liberación se controla por medio de la difusión interior. Cuando tenemos una liberación con una reacción química la degradación de polímeros permite reaccionar con el entorno liberado en sus poros. Las moléculas liberadas del entorno se esparcen a los poros del entorno del hidrogel. (Zarzycki, Modrzejewska y Nawrotek, 2010, p. 12).

Los modelos cinéticos para la liberación de un fármaco se clasifican en dos tipos: Modelo de orden cero y modelo de primer orden, esta investigación se realizará por medio del modelo de orden cero, donde describe sistemas de velocidades constantes en un determinado período de tiempo y se logra representar mediante la siguiente ecuación:

$$Q_t = Q_o + K_o t$$

5.1

Donde:

Q_t : es la cantidad acumulada de las nanopartículas liberadas en un tiempo t .

Q_o : es la cantidad inicial de las nanopartículas.

K : es la constante de la cinética de liberación.

t : es el tiempo en el que se libera el fármaco.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

En el siguiente Proyecto Integrador se desarrolló en primera instancia la obtención del Peróxido de Calcio, juntamente con la elaboración del fotorreticulante “Irgacure en líquido”, paso posterior fueron sintetizados los scaffolds de GelMA y GelMA con nanopartículas de peróxido de calcio (CPO).

2.1. Equipos

- Agitador Shaker

Estos agitadores sirven para mezclar líquidos o preparar disoluciones, por lo general se mezclan volúmenes entre 1-5 galones. Este agitador es fácil de adaptarse a lugares pequeños y es sencillo de trasladar de un lugar a otro; se caracteriza por tener una placa que oscila horizontalmente, generado por un motor eléctrico que vibra a 400 rpm.



Figura 10-2. Agitador Shaker

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

- Balanza Digital

Estas balanzas están diseñadas para pesar o medir la masa de algún cuerpo o sustancia, pero con gran precisión para ello es importante tener una correcta calibración. Su mínima medida es 0,001 gr; además su rápida estabilización es en un lapso de tiempo pequeño y su precisión de los resultados es eficiente.



Figura 11-2. Balanza Digital

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

- Espectrofotómetro de infrarrojo

Este equipo es muy utilizado en los laboratorios para identificar y estudiar grupos funcionales en forma sólida, líquida o gaseosa. Su técnica es por medio de un espectrómetro infrarrojo que produce un espectro del mismo. Sus resultados se pueden visualizar por medios de graficas de transmitancia o absorbancia. Las unidades de longitud de onda IR por lo general son en micrómetros.



Figura 12-2. Espectrómetro de infrarrojo

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

- Microscopio electrónico de barrido

Este microscopio es capaz de producir imágenes de alta calidad del área de una muestra usando las interacciones de electrón-materia. Este tipo de microscopio electrónico aplica un haz de electrones en lugar de un haz de luz para así formar una imagen.



Figura 13-2. Microscopio electrónico de barrido

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

- Estufa

Estas estufas son indispensables en cualquier laboratorio ya sea para secar los propios instrumentos dentro del laboratorio como también para secar ciertas muestras. La estufa es una cámara con cavidad que permite que su temperatura alcance entre la temperatura ambiente hasta 350 °C, estas estufas son fabricadas de acero inoxidable tanto en la parte interior como en la

exterior, además tienen un microprocesador para mantener una temperatura uniforme y manipular digitalmente.



Figura 14-2. Estufa del Laboratorio

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

- Lámpara UV

Son utilizadas en los laboratorios para la iluminación o exposición de materiales con luz UV. Estas lámparas producen radiación ultravioleta que quiere decir, radiación no ionizante por lo que es emitida por el sol o fuentes artificiales; aunque, así como tiene beneficios de producir vitamina D, también es perjudicial para la salud.



Figura 15-2. Lámpara UV

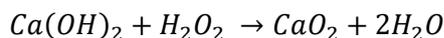
Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

2.2. Síntesis del Peróxido de Calcio

Para obtener el Peróxido de Calcio primero se consiguió los compuestos que fueron Peróxido de Hidrogeno (H_2O_2) al 50% de pureza e Hidróxido de Calcio ($Ca(OH)_2$) técnico, luego se realizaron unos cálculos debido a sus purezas, a continuación, para calcular el 15% de pureza del peróxido de Hidrógeno se realizó un cálculo de concentraciones:

$$\begin{aligned}C_1V_1 &= C_2V_2 \\50\%.V_1 &= 15\%.25 \text{ ml} \\V_1 &= \frac{15\%.25 \text{ ml}}{50\%} \\V_1 &= 7,5 \text{ ml de } H_2O_2 \text{ al } 50\%\end{aligned}$$

Lo que se calculó fue la concentración al 15% (volumen/volumen) del H_2O_2 por lo que teníamos al 50% en el Laboratorio de Electromagnetismo, después se procedió a realizar la estequiometría para comprobar si la ecuación esta balanceada:



Posteriormente, en un balón de aforo de 25 ml, se añadió 7,5 ml de la concentración H_2O_2 al 50%, luego se añadió agua destilada hasta aforar, a continuación se pesó los 6g del $Ca(OH)_2$ en la balanza digital y aparte en un vaso de precipitación se procedió a mezclar la nueva concentración de H_2O_2 y los 6g de $Ca(OH)_2$ hasta conseguir una solución homogénea; después, se tapó el vaso de precipitación con un papel filtro y se realizó pequeños huecos en aquel papel filtro para que se pudiera secar al ambiente por alrededor de una semana; por último, para realizar la caracterización, se tuvo que triturar la mezcla con una espátula hasta que quedara hecho polvo.

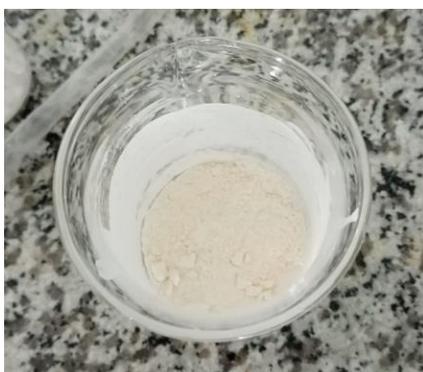


Figura 16-2. Peróxido de Calcio

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

2.3. Obtención del PBS

El PBS (Buffer Fosfato Salino) se obtuvo a partir de los elementos y concentraciones como se observa a continuación en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2: Elementos para la concentración del PBS

Elemento	Fórmula	Concentración (g/L)	Concentración (mmol/L)
Cloruro de Sodio	NaCl	8,0	137
Cloruro de Potasio	KCl	0,2	2,7
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄	0,24	1,8
Fosfato de Sodio	Na ₂ HPO ₄	1,44	10

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

Primero se procedió a medir dichas cantidades mencionadas en la Tabla 1-2, luego en un vaso de precipitación se agregó 800ml de agua Vivant (debido a que no contiene cloro como el agua potable y por ende es más pura) y se disolvió las concentraciones mencionadas de las sales, después se agregó agua destilada hasta obtener un volumen de 1 litro, por último, se procedió a ajustar con el Hidróxido de Sodio (NaOH) el pH hasta que estuviera en 7,4.

2.4. Síntesis del Irgacure

Para la preparación del Irgacure se necesitó el compuesto llamado Irgacure y el PBS que se obtuvo en el punto (2.2.), este paso fue muy sencillo ya que en un tubo falcon se procedió a tapar con aluminio en la parte exterior del envase por ser un material fotosensible. Posterior se agregó 15ml de PBS y 0,375 g de Irgacure, después esta mezcla fue colocada en una estufa durante 5 minutos a una temperatura de 30 °C, finalmente se usó el vortex (agitador de tubos falcon) por 10 minutos para una mejor homogenización.

2.5. Obtención de la Gelatina Metacriolio (GelMA)

Para la síntesis del GelMA primero se pesó 15 g de gelatina de piel porcina (de SIGMA), en 150 ml de PBS, se homogenizó la síntesis con la ayuda de un agitador magnético durante una hora y con un temperatura constante de 50 °C hasta disolver completamente la gelatina, se añadió 12 ml de anhídrido metacrilico gota a gota, manteniendo la agitación durante una hora a una temperatura de 50 °C, finalmente se agregó 300ml de PBS a la solución final y se agitó por 15

minutos más, la solución fue filtrada al vacío y dializada por 5 días, usando membranas de diálisis de 30 cm de largo aproximadamente, las membranas fueron colocadas en vasos de precipitación con suficiente agua destilada hasta que queden totalmente sumergidas, este proceso se realizó durante una semana y cambiando de agua diariamente.

Al finalizar este proceso se trasladó las muestras de las membranas a tubos falcon de 50 ml para poder realizar el proceso de liofilización (proceso que duro aproximadamente 15 días).

2.6. Preparación de los envases para los tests

Para este apartado se necesitó 4 portaobjetos, tapas de unos mili-envases y cinta adhesiva; en cada porta objeto se colocó 4 tapas y se señalaron: 0%, 0.1%, 1% y 2% que son las concentraciones del CPO.



Figura 17-2. Envases para los test

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

2.7. Preparación de las muestras

Las muestras fueron colocadas en 4 tubos falcon completamente aislados de la luz, para evitar la reacción del fotorreticulador, en la Tabla 2 - 2 se detallan las concentraciones respectivas.

Tabla 2-2: Tabla de contenido de cada tubo falcon

Tubo Falcon	GelMA	PBS	CPO	Irgacure
1	0,75 gr	4 ml	0%	1ml
2	0,75 gr	4 ml	0.1%	1ml
3	0,75 gr	4 ml	1%	1ml
4	0,75 gr	4 ml	2%	1ml

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

Fue añadido 0,75 gr de GelMA en 4 ml de PBS y se colocó a la estufa durante 5 minutos a 50 °C, la homogenización se llevó a cabo con vortex por otros 5 minutos, terminado ese tiempo se agregó el CPO en diferentes concentraciones para cada tubo falcon, nuevamente de colocó en la estufa por 5 minutos más a 50 °C y se volvió a agitar durante 5 minutos; finalmente se añadió 1

ml de Irgacure y se agitó por 5 minutos. Este proceso se realizó con cada una de las diferentes concentraciones y se la dejó reposar en una gradilla.



Figura 18-2. Tubos falcons con cada etiqueta

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

2.8. Exposición UV de las muestras

Para este proceso se necesitó los envases para las tests, una micropipeta de 150 μ m, una fuente UV y una caja negra, para ello se realizó el montaje adecuado y seguro de la fuente UV en el laboratorio de óptica, la fuente se instaló a 10 cm de la mesa donde se expuso las muestras; con la ayuda de una caja negra se logró cubrir el montaje de la fuente UV para protegerse de la irradiación, las muestras fueron expuestas durante 120 segundos para obtener hidrogeles GelMA con cadenas reticuladas para el libre movimiento celular dentro de la matriz.

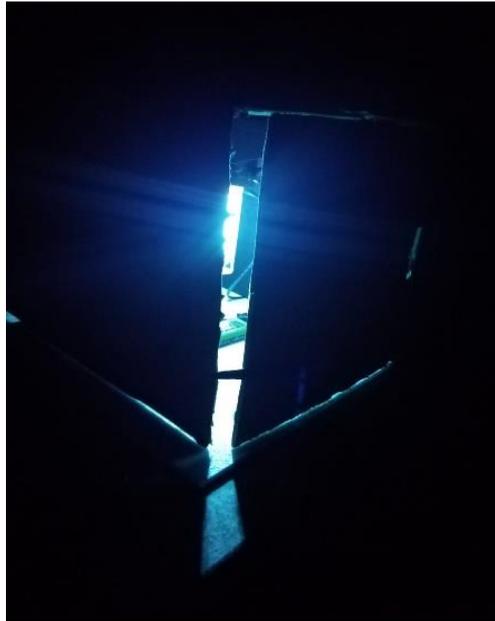


Figura 19-2. Exposición UV de las muestras con la caja negra

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.



Figura 20-2. Exposición UV de las muestras dentro de la caja negra

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

2.8.1. Montaje del UV

Se procedió a realizar un montaje para la fuente UV, en la mesa óptica apropiada para este dispositivo, con el fin de evitar perturbaciones al momento de exponer las muestras, se usó un

soporte universal y una tuerca para sujetar la fuente de manera vertical como se muestra en la Fig. 19., para mayor estabilidad se colocó un espuma-Flex debajo de todo el equipo montado, además se añadió la caja negra al montaje y se usó un regulador de energía.



Figura 21-2. Montaje UV dentro de la caja negra

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

2.8.2. Montaje de caja negra para la exposición UV

En un cartón grande, se realizaron algunos cortes en la parte superior y lateral y fueron cubiertas sus paredes con una tela de color negro, como se muestra en la Figura 22-2.



Figura 22-2. Montaje de la caja negra para la exposición UV

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

2.9. Pruebas de caracterización

- Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Este equipo se encuentra en el laboratorio de Química Instrumental de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH es de la marca Jasco FT/IR-4100. El proceso consiste en conectar el equipo a un tomacorriente de 110 V, se requiere esperar 30 minutos hasta que los parámetros de análisis estén listos para comenzar a realizar las micrografías, antes de colocar las muestras se debe limpiar el área donde serán colocadas. Para realizar el barrido espectral se utiliza el programa Spectra Analysis para procesar el espectro,

- Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Este equipo se encuentra en el laboratorio de Materiales de la Facultad de Mecánica de la ESPOCH, su uso lo llevo a cabo el técnico docente a cargo; en primer instante se prendió el equipo y se procedió a extraer los portaobjetos; posteriormente se limpió, se situó pequeños pedazos de cinta conductora de doble cara, dos en cada sector y se colocó todas las muestras en el anterior nombrado situándolas de una manera correcta, luego se rosó aire comprimido para evitar el polvo e inmediatamente se volvió a poner el portaobjetos donde corresponde y se comenzó con la prueba obteniendo imágenes que fueron guardadas en un CD, finalmente fueron tratadas en el programa ImagenJ donde se encuentra el perímetro de cada poro y estos datos obtenidos son graficados en OriginPro 9.0.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos a partir de las caracterizaciones FTIR y SEM de scaffolds inteligentes a base de la gelatina metacrilato, comprendidos durante el periodo académico de enero a julio de 2022, en los laboratorios de la institución.

3.1. Resultados de la caracterización FTIR del Peróxido de Calcio

Una vez ya sintetizado y caracterizado el peróxido de Calcio los resultados fueron los siguientes:

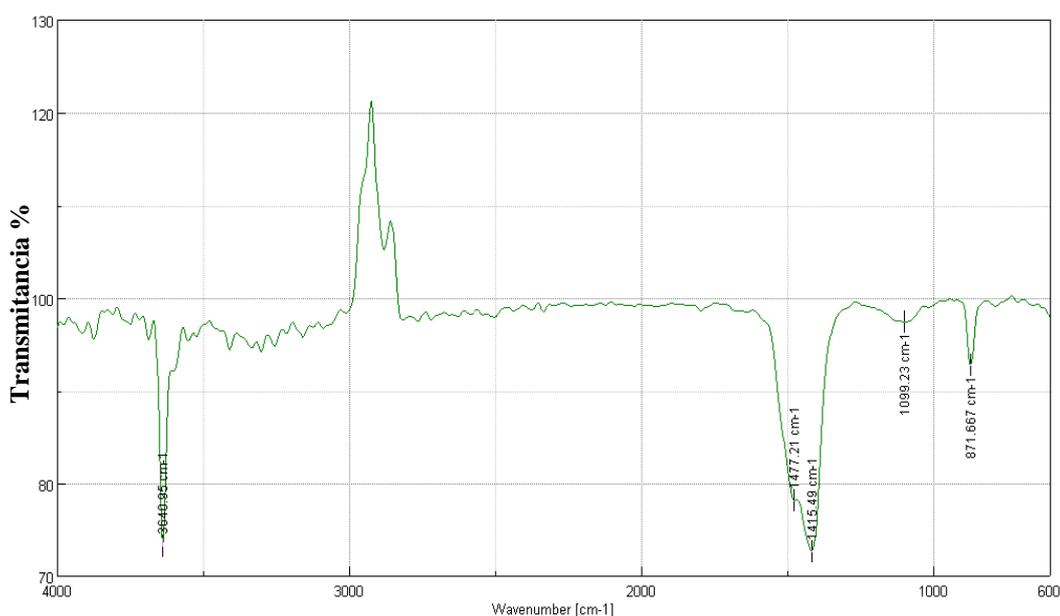


Gráfico 1-3. Espectros FTIR del Peróxido de Calcio

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

Para realizar un análisis de esta caracterización tomamos en cuenta valores determinados en función del número de onda, lo cual está estipulado en tablas y esto ayuda a conocer cada uno de los grupos funcionales que existen en cada banda de la gráfica.

- Como punto N.º 1. A $3640.95 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$ aparece el grupo -OH en alcoholes y fenoles, estiramiento OH (sólidos y líquidos), teniendo una transmitancia aproximada de 73.1984%.
- Como punto N.º 2. A $1477.21 \text{ (cm}^{-1}\text{)}$, aparece el grupo CH₂ en compuesto alifático, flexión CH₂ (tijeras) vibración, teniendo una transmitancia aproximada de 78.1633%.

- Como punto N.º 3. A 1415.49 (cm-1) aparece el grupo C-N en amidas primarias, estiramiento C-N (banda de amida III), teniendo una transmitancia aproximada de 72.6452%.
- Como punto N.º 4. A 1099.23 (cm-1) aparece el grupo Si-O-Si en siloxanos, estiramiento antisimétrico Si-O-Si, teniendo una transmitancia aproximada de 97.415%.
- Como punto N.º 5. A 871.667 (cm-1) aparece el grupo peróxido, estiramiento O-O, teniendo una transmitancia aproximada de 92.8107%.

El peróxido final se obtuvo en estado sólido y fue triturado hasta que quedó en polvo, de color amarillento y sin olor, como se muestra en la Figura 23-3.



Figura 23-3. Peróxido de Calcio sintetizado

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.2. Resultados de la caracterización FTIR de scaffold inteligentes a base de GelMA

El espectro FTIR de la síntesis de scaffold inteligentes muestra en general los grupos funcionales químicos y los grupos funcionales metacrílicos, para cada concentración se tomaron n=3.

3.2.1. Muestra de control (Concentración 0% de Peróxido de Calcio)

Como se puede observar en el Grafico. 2-3 se encuentran 3 líneas de grafica (negra, roja y azul) que representan los espectros FTIR de las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. En las 3 muestras se encuentra un pico que representa el grupo aminoácido con deformación de NH_3^+ ; sin embargo, existe una diferencia de transmitancia entre las 3 muestras, observando así que la

muestra 3 tiene menor transmitancia y la muestra 1 discrepa con las muestras 2 y 3 sin importar que tuvieron el mismo tratamiento, esto se debe a que al momento de caracterizar se trizan las pastillas y no se pueden observar con exactitud los grupos funcionales. Pero aun así la muestra 2 y 3 se forma de mejor manera los picos que van de 1631 a 1639 cm^{-1} .

Se observó que la muestra 1 debido a que la estructura no encajo bien con el equipo no se pudo tener una mejor gráfica y a 91,098% de transmitancia queda alejada de la muestra 2 y 3. Por otro lado, tenemos otro pico que está en 3301 cm^{-1} aproximadamente, este pico representa acetilenos con estiramiento $\equiv C - H$, así mismo la muestra 3 tiene una menor transmitancia, seguida de la muestra 2.

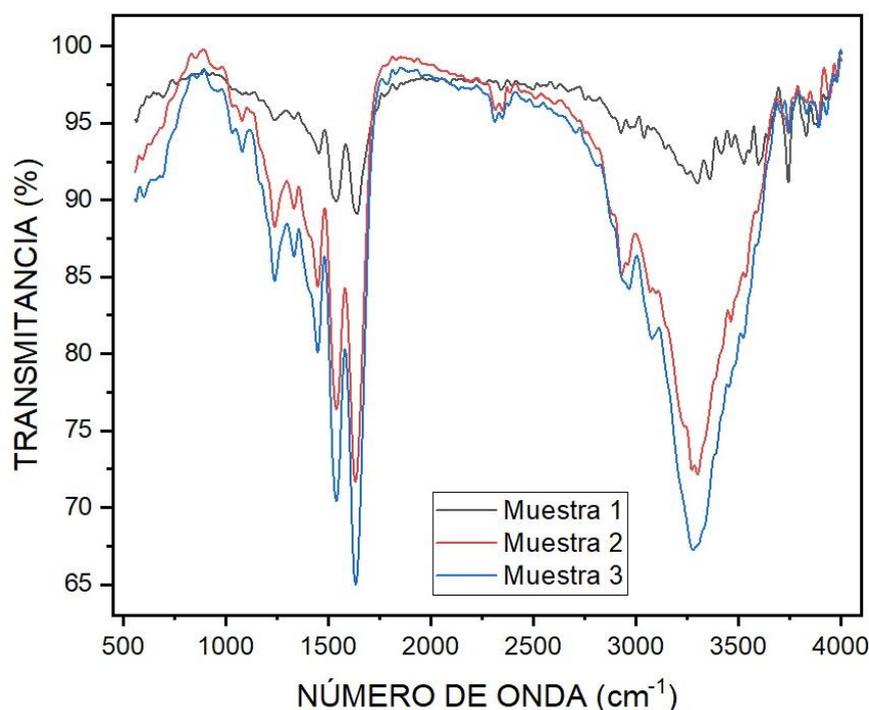


Gráfico 2-3. Espectro FTIR de la muestra de control.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.2.2. Muestra con 0,1% de concentración de Peróxido de Calcio

En este apartado de igual manera se presentan 3 líneas de color negro, rojo y azul; las cuales representan los espectros del FTIR, se realizaron 3 muestras de esta concentración por lo tanto serán llamadas muestras 1, 2 y 3 respectivamente con los colores antes dichos. Se puede visualizar que las 3 muestras tienen los mismos sesgos por lo que al analizar tomaremos los picos más pronunciados.

Primero tenemos un pico de $1631,48\text{ cm}^{-1}$ que pertenece al grupo aminoácido con deformación de NH_3^+ en las 3 muestras, lo que varía es la transmitancia que va desde 69,8804 a 76,4353%; quedando la muestra 1 con la menor transmitancia y la muestra 3 como la de mayor transmitancia. Otro pico que se puede observar es de $3297,68\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente que representa al grupo amidas secundarias con estiramiento $-\text{NH}$ en sólidos y también en polipéptidos y proteínas, además la transmitancia es de 75,7802% que se mantiene en las 3 muestras. Todo esto se puede corroborar en el gráfico 3-3.

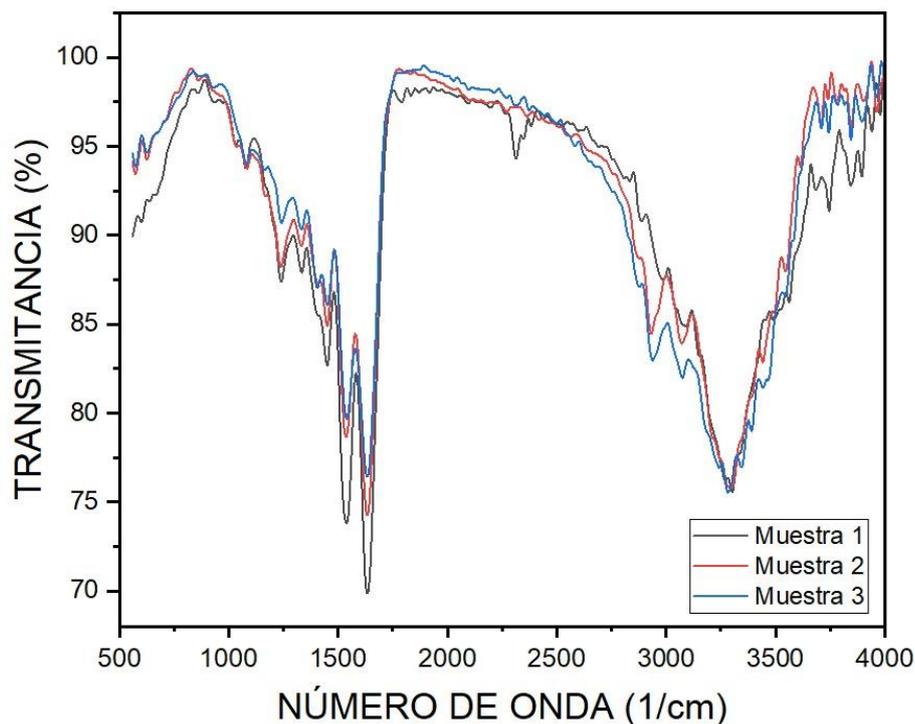


Gráfico 3-3. Espectro FTIR de la muestra 0,1% de concentración.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.2.3. Muestra con 1% de concentración de Peróxido de Calcio

Se puede visualizar en el Gráfico 4-3 que existe 3 líneas graficas de colores (negra, roja y azul) que representan las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Estas muestras representan el espectro FTIR de la concentración 1% de peróxido de Calcio.

Tenemos un pico pronunciado que representa al grupo aminoácido con deformación de NH_3^+ en las 3 muestras tiene un número de onda de $1635,34\text{ cm}^{-1}$ con diferentes transmitancias entre las 3 muestras que son 68,9945%; 78,4064% y 62,9229% respectivamente, quedando la tercera muestra como la de menor transmitancia. Por otro lado, tenemos un pico del grupo amidas secundarias con estiramiento $-\text{NH}$ en sólidos, también en polipéptidos y proteínas, este pico se encuentra entre los $3297\text{-}3328\text{ cm}^{-1}$, aquí las muestras varían en su transmitancia entre 65,616%

y 79,0241% quedando la muestra 3 como la de menor transmitancia y con un pico más pronunciado. Teniendo en cuenta que todas las muestras tienen el mismo tratamiento, sin embargo, varían las gráficas por lo que al momento de caracterizar se trizan o no son bien colocas en el espectro.

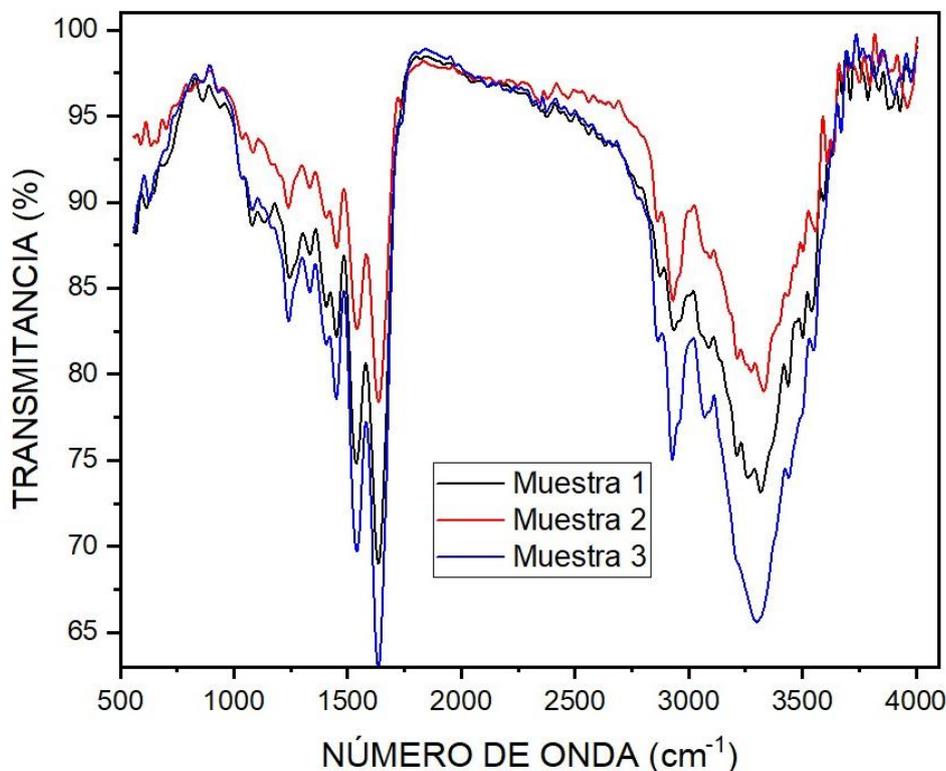


Gráfico 4-3. Espectro FTIR de la muestra 1% de concentración.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.2.4. Muestra con 2% de concentración de Peróxido de Calcio

En el Gráfico 5-3 se observan 3 líneas gráficas de colores (negra, roja y azul) que representan las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Estas muestras representan el espectro FTIR de la concentración 2% de peróxido de Calcio.

Se visualiza un pico que se encuentra en la longitud de onda de $1635,34\text{ cm}^{-1}$ que representa al grupo aminoácido con deformación de NH_3^+ , así mismo su transmitancia varía entre 83,7416% y 86,1653% quedando la muestra 2 como la de menor transmitancia. Por otro lado, se puede apreciar distorsión en los siguientes picos, esto puede ser debido a la textura de la muestra al momento de caracterizar. El siguiente pico se encuentra en el grupo $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2-$ en compuestos alifáticos con estiramientos CH simétricos y antisimétricos y se encuentra en la longitud de onda de $2927,41\text{ cm}^{-1}$ con una transmitancia alrededor de 84,7252%. Por último, el tercer pico se encuentra en $3313,11\text{ cm}^{-1}$ que pertenece al grupo de $-\text{OH}$ en oximas con

estiramiento O–H, este pico se forma entre 3200 cm^{-1} y 3300 por lo que existe distorsión y su transmitancia se encuentra $82,7388\%$ y $84,6661\%$, sin embargo, la muestra 2 tiene menor transmitancia.

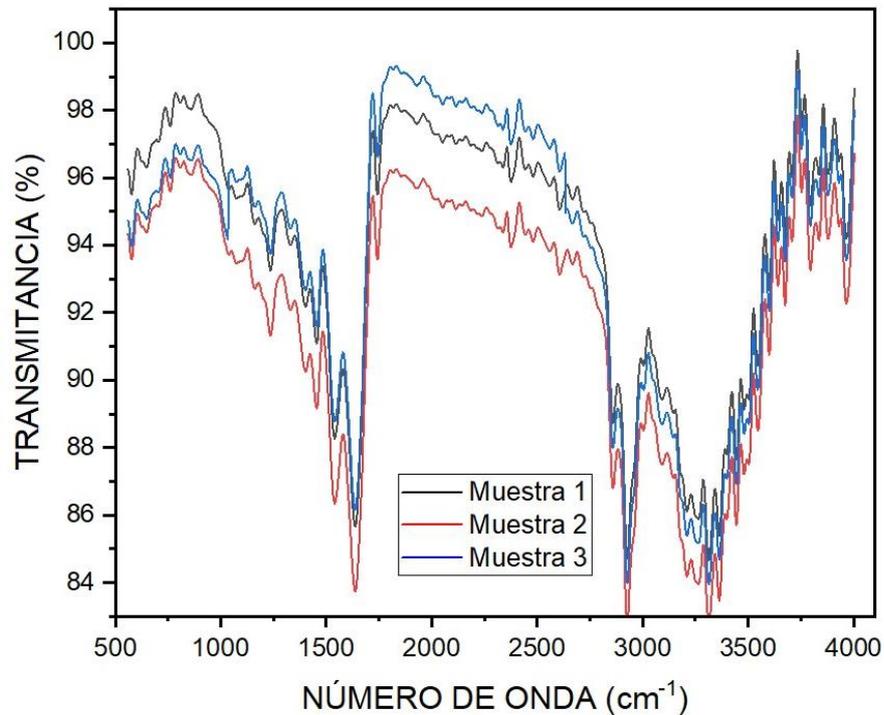


Gráfico 5-3. Espectro FTIR de la muestra 2% de concentración.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.3. Resultados de la caracterización SEM de scaffold inteligentes a base de GelMA

Para la medida de la porosidad se usó el software ImagenJ, se tomaron 10 poros al azar de cada muestra y se midió el perímetro y ángulo, fue calculado el promedio, desviación estándar, máximo y mínimo del grupo de datos. Los datos más relevantes fueron los del perímetro.

3.3.1. Muestra de control (Concentración 0% de Peróxido de Calcio)

Esta muestra se realizó con un lente x35 a una escala de $500\text{ }\mu\text{m}$ y un voltaje de aceleración de 12 kV ; en la Fig. 24-3 se puede observar que no existe porosidad en la estructura del scaffold, lo que se puede visualizar es una estructura plana debido a que no contiene partículas inteligentes de scaffolds.

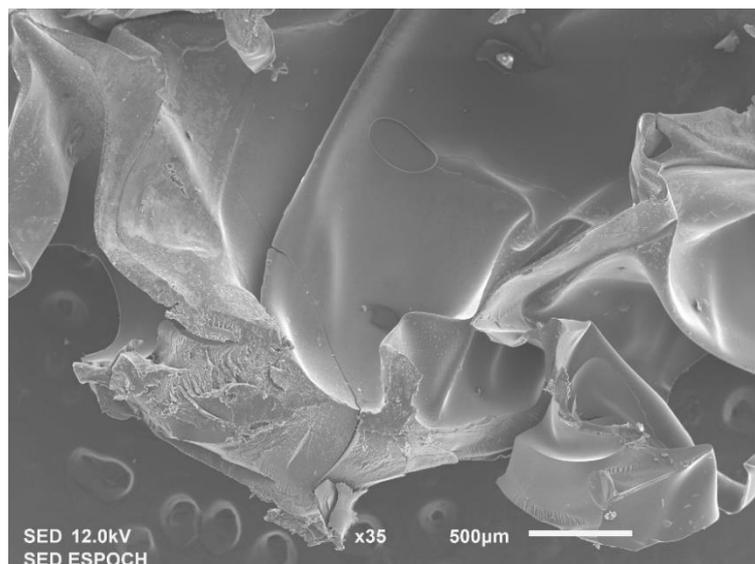


Figura 24-3. Muestra de control o concentración 0% en el SEM.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.3.2. Muestra con 0,1% de concentración de Peróxido de Calcio

Esta muestra se realizó con un lente x70 a una escala de 200 µm y un voltaje de aceleración de 12 kV; en la Fig. 25-3 se puede observar una cantidad de poros que se encuentra en la estructura del scaffold y para ello procedemos a obtener las medidas necesarias para poder calcular su promedio y desviación estándar.

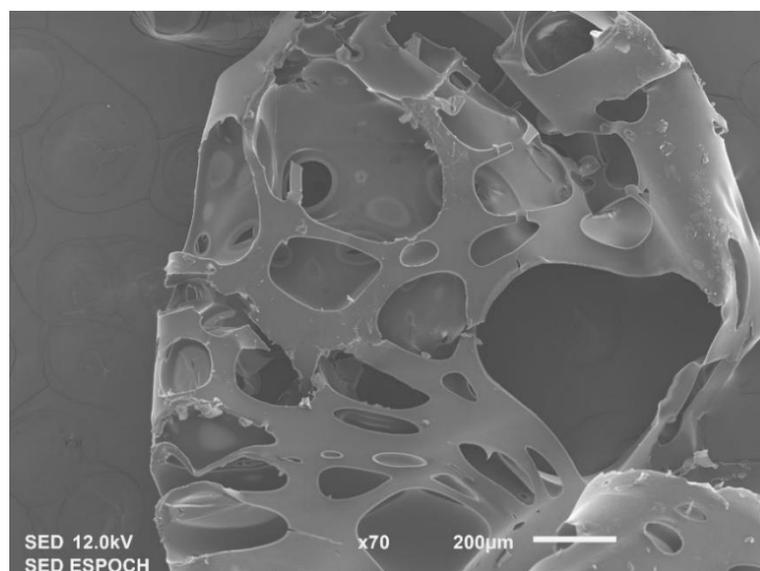


Figura 25-3. Muestra con 0,1% de concentración en el SEM.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

En la tabla 3-3, se detallan las medidas realizadas, por ello se puede afirmar que la inclusión de nanopartículas de CPO al 0.1%, aumentó la porosidad del GelMA, su perímetro máximo es de

5,683 um, mientras que el perímetro mínimo mide 0,781 um; con una desviación estándar de 1,509 um y un promedio para las 10 de 3,044 um.

Tabla 3-3: Medidas de ángulos y perímetros tomados en ImageJ

Nº	Ángulo (°C)	Perímetro (um)
1	-63,435	2,236
2	-154,231	4,025
3	-7,765	2,082
4	-106,260	0,781
5	171,781	5,683
6	8,881	4,049
7	-73,540	1,434
8	-151,113	4,140
9	-8,673	3,730
10	-69,075	2,275
Promedio	-45,343	3,044
Desviación Estándar	95,032	1,509
Máximo	171,781	5,683
Mínimo	-151,113	0,781

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.3.3. *Muestra con 1% de concentración de Peróxido de Calcio*

Esta muestra se realizó con un lente x1300 a una escala de 10 um y un voltaje de aceleración de 12 kV; en la Fig. 26-3 se puede observar una cantidad de poros en menor cantidad y con un perímetro menor en la estructura del scaffold.

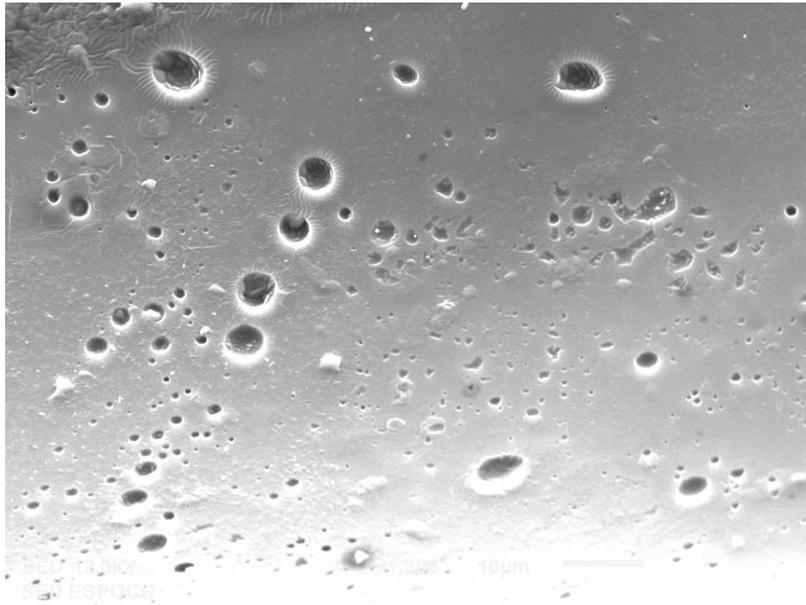


Figura 26-3. Muestra con 1% de concentración en el SEM.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

En la Tabla 4-3, se detallan las medidas obtenidas, un perímetro máximo de 4,786 μm , mientras que el perímetro mínimo mide 1,790 μm ; con una desviación estándar de 1,103 μm , el perímetro de las 10 medidas fue de 2,773 μm .

Tabla 4-3: Medidas de ángulos y perímetros tomados en ImageJ

Nº	Ángulo (°C)	Perímetro (μm)
1	-52,306	3,475
2	-40,764	4,786
3	-20,925	4,550
4	-90,000	2,000
5	132,274	1,858
6	-164,476	2,335
7	-168,111	2,427
8	160,560	2,253
9	-160,560	2,253
10	-77,905	1,790
Promedio	-48,221	2,773
Desviación Estándar	115,528	1,103
Máximo	160,560	4,786
Mínimo	-168,111	1,790

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.3.4. Muestra con 2% de concentración de Peróxido de Calcio

Esta muestra se realizó con un lente x650 a una escala de 20 μm y un voltaje de aceleración de 9 kV; en la Fig. 27-3, se visualizan poros con fracturas y así mismo un poro que no tiene fracturas.

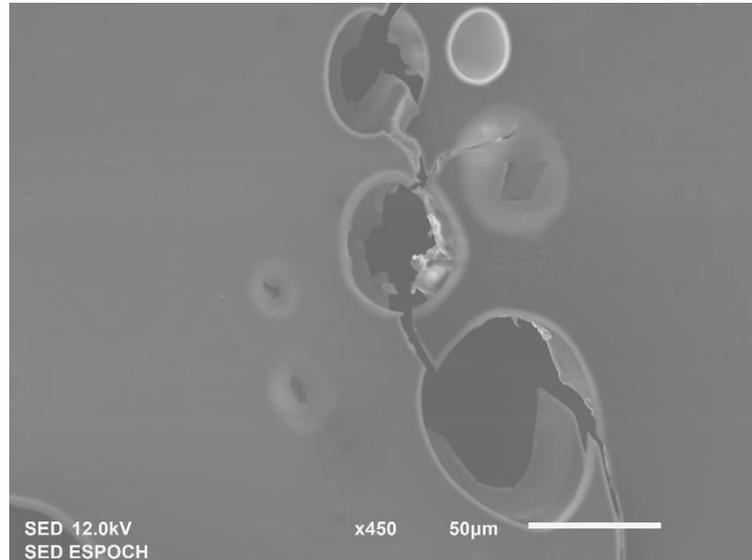


Figura 27-3. Muestra con 2% de concentración en el SEM.

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

En la Tabla 5-3, se detallan las medidas obtenidas, un perímetro máximo de 2,115 μm , mientras que el perímetro mínimo mide 0,732 μm ; con una desviación estándar de 0,529 μm , el perímetro de las 10 medidas fue 1,307 μm .

Tabla 5-3: Medidas de ángulos y perímetros tomados en ImageJ

Nº	Ángulo (°C)	Perímetro (μm)
1	-49,574	1,108
2	27,474	0,881
3	-53,616	0,738
4	-75,256	1,228
5	-160,017	0,732
6	-68,000	1,742
7	146,070	2,071
8	-95,906	0,911
9	-167,196	2,115
10	-60,832	1,539
Promedio	-55,685	1,307

Desviación Estándar	90,161	0,529
Máximo	146,070	2,115
Mínimo	-167,196	0,732

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

3.4. Análisis de liberación de oxígeno del CPO con investigaciones ya publicadas

Según Carrasco y Salazar (2021, p. 9) en su artículo “Hidrogeles inteligentes que entregan oxígeno para la regeneración del tejido cartilaginoso: Una revisión” dicen que las nanopartículas del peróxido de Calcio es el mejor biomaterial, porque tiene mayor pureza, mejores características y sobre todo se puede controlar su oxigenación, en su estudio refleja un coeficiente de solubilidad de 1,65 g/L a una temperatura de 20 °C y su cantidad de oxígeno liberado es de $22 \pm 3,3$ mg/L. Por lo que se usa en varias aplicaciones, en especial la regeneración de tejidos.

Según García, Rodríguez y Velandia (2020, p. 12) en su tesis “Desarrollo de un biomaterial a partir de peróxido de calcio encapsuladas en alginato como alternativa de prevención para la isquemia distal digital generada por vasopresores” argumentan que debido a las propiedades químicas y físicas el peróxido de calcio tiene una gran capacidad de oxígeno, este muestra un potencial de liberación de 0,2222 g O₂/ g CPO. Asimismo, su tasa de liberación es baja por lo que al momento de relacionarla con alguna concentración no va haber contrariedades.

Según Suvarnapathaki et al. (2019, p. 3) en su artículo “Breathing life into engineered tissues using oxygen-releasing biomaterials” deducen que dependiendo el coeficiente de solubilidad se libera la cantidad de oxígeno en los peróxidos sólidos, el más destacado es el peróxido de calcio que produce mayor cantidad de oxígeno en varias aplicaciones, este peróxido cuenta con $22 \pm 3,3$ mg/L de oxígeno liberado, su mecanismo de liberación es por medio de la descomposición hidrolítica.

3.5. Comparación de resultados con investigaciones ya publicadas

En este apartado se realizó una tabla con diferentes artículos, donde se aprecia las diferentes variables, efectos que producen las propiedades mecánicas, los resultados obtenidos en sus estudios y las respectivas referencias.

Tabla 6-3. Comparación de Resultados

Variable Regulables	Efecto en las propiedades mecánicas	Resultados	Referencias
Concentración de GelMA	Bajo módulo de hinchamiento y alto de compresión	Al 10% (p/v) de hidrogeles de GelMA, hay un 60±10% de la porosidad con un tamaño promedio de 250±65mm de poro.	(Carrasco y Salazar, 2021, p. 15)
Concentración de peróxido de calcio (CaO ₂)	Fuerza de 100-200 MPa, Dureza de 2-12 MPam ^{1/2} y un módulo de compresión de 15-20 GPa.	Gran porosidad (mayor al 90%)	(Rodrigo, 2019, p.7)
Concentración de peróxido de calcio (CaO ₂)	El módulo de compresión esta entre (427,88 kPa y 833,73 kPa)	Alta porosidad y tamaño de poro promedio.	(García, Rodríguez y Velandia, 2020, p. 22)

Realizado por: Avilez Velasco, Beverly, 2022.

Comparando los resultados que se utilizan actualmente en aplicaciones con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se puede observar que dependiendo las concentraciones de peróxido de calcio cambia su módulo de compresión, pero los resultados siempre deben tener una porosidad mayor a 90%, además el perímetro entre cada poro debe estar aproximadamente entre 10 nanómetros y 500 micrómetros. Y su módulo de compresión debe estar entre 15 a 20 GPa.

Con la previa información vista se puede afirmar que en la muestra de concentración 0% p/v tenemos una estructura plana sin porosidad porque lo que no contiene partículas de CPO, en cambio las muestras de concentración 0,1% p/v, 1% p/v y 2% p/v tienen una estructura de porosidad que se encuentra en el rango aceptable de poros para la aplicación de tejidos.

CONCLUSIONES

- En este trabajo de titulación se sintetizó scaffolds inteligentes a base de gelatina metacrililo cargadas con partículas de CPO liberadoras de oxígeno con diferentes concentraciones (0% p/v, 0,1% p/v, 1% p/v y 2% p/v), obteniendo como características estructuras porosas y biocompatibles. Donde estos scaffolds son candidato para la aceleración y regeneración de tejidos cartilagosos que poseen en ambiente de hipoxia.
- Se dedujo que entre más alta es la concentración del CPO existe mayor rigidez en los scaffolds para la adhesión celular combinadas con una resistencia suficientemente prolongada.
- Se concluye que los biomateriales a base de Gelatina Metacrililo (GelMA) cubiertos con nanopartículas inteligentes de CPO (liberadoras de oxígeno) en un ambiente de hipoxia propaga oxígeno que permite la existencia de y proliferación de condrocitos, lo que podría conducir a la regeneración completa del cartílago.
- Se caracterizó las muestras con concentraciones diferentes de CPO en el scaffolds a través de la microscopia electrónica de barrido que nos entrega imágenes de su universo celular a longitud de micrómetros dando como resultados 3,044 μm ; 2,773 μm y 1,307 μm que son aceptables en el rango de porosidad para la aplicación de tejidos. Por otro lado, al momento de caracterizar en el FTIR nos manda como resultados los grupos funcionales que existen en las muestras con la finalidad de comprobar que es un material biocompatible.
- Se compararon los resultados obtenidos en este estudio con resultados que actualmente son aplicables y llegando a la conclusión puede observar que dependiendo las concentraciones de peróxido de calcio cambia su módulo de compresión.

RECOMENDACIONES

- Antes de utilizar cualquier material en el laboratorio se recomienda lavar con jabón y agua destilada para evitar la contaminación al momento de preparar o poner compuestos importantes en los envases, además para entrar en el laboratorio es necesario utilizar mandil y guantes.
- Al momento de sintetizar el peróxido de calcio se recomienda realizar un análisis estequiométrico para tener una ecuación balanceada que determina las proporciones entre reactivos y productos, de esta manera no se desperdicia producto y se sabe las cantidades adecuadas para la obtención del peróxido de Calcio.
- Al momento de preparar las muestras se recomienda utilizar mascarilla para evitar los olores fuertes que provoca dichas muestras.
- Por otra parte, se recomienda realizar cálculos necesarios antes de preparar las muestras por 3 razones:
- Primero, para evitar pérdidas en los materiales, ya que son difíciles de conseguir y de alto costo.
- Segundo, para que al momento de preparar las muestras ya tenga presente cuando tiene que añadir a la preparación.
- Tercero, para que tenga un mejor seguimiento.
- Se recomienda cubrir los tubos falcon con aluminio o cinta negra para que al momento de añadir el irgacure no empiece a reticular la muestra
- Para realizar la exposición UV de las muestras es necesario realizar una caja negra y además utilizar lentes para tener una mayor precaución contra los rayos UV.
- Se recomienda que al momento de caracterizar en el SEM las muestras sean metalizadas, pues al no ser conductoras el sistema no puede analizarlas perfectamente ya que el haz de electrones no se centra en el área adecuada.
- Por último, al momento de poner la muestra en los envases se recomienda poner plástico de cocina para que al momento de gelificar las muestras se puedan desprender con mayor facilidad.

GLOSARIO

Espectro: La gama completa de todos los tipos de radiación que tienen tanto campos eléctricos como magnéticos, y que se desplazan en ondas. Este espectro abarca desde la radiación de energía baja que se traslada en ondas largas (López, 2014, párr. 3).

Espectroscopía: es el estudio de la descomposición de la luz midiendo de esa manera distintas longitudes de onda de luz visible y no visible (IEQFB, 2021, párr.2).

GelMA: es una gelatina que posee la mayoría de los grupos metacrilamida³ y en menor cantidad grupos metacrilato; por ello se llama metacrilato de gelatina y en abreviaturas más conocido como GelMA (Sun et al., 2018, párr. 2).

Scaffolds: son andamios que están diseñados con distintos tamaños de poros, para que se puedan adherir y evaluar de distintos tipos celulares.

Transmitancia: es la razón de la luz transmitida respecto a la luz incidente, esto se lleva a cabo basándonos en contextos geométricos determinados (Ibáñez et al., 2006, pp. 47).

BIBLIOGRAFÍA

ADMIN. Hidrogeles inyectables para la ingeniería de cartílago y tejido óseo - investigación del hueso | Artículos 2021. Oval engine ering [en línea]. 2021 [consultado el 27 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://es.ovalengineering.com/injectable-hydrogels-563545>

ÁLVAREZ SOLORZANO, D.I. y FLORES LEDESMA, J.J., 2020. Prevalencia de artritis reumatoide en pacientes atendidos en el Hospital General Naval de Guayaquil pertenecientes a la Armada del Ecuador en el periodo del 2017 - 2019. [en línea], [Consulta: 5 octubre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/15361>

CARRASCO-MONTESDEOCA, C.Y. y SALAZAR-MONTERO, P.B., 2021. Hidrogeles inteligentes que entregan oxígeno para la regeneración del tejido cartilaginoso: Una revisión. Polo del Conocimiento [en línea], vol. 6, no. 7, pp. 805-823. [Consulta: 5 octubre 2021]. ISSN 2550-682X. DOI 10.23857/PC.V6I7.2889. Disponible en: <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es/article/view/2889/html>

GARCÍA RIVERO, D.C., RODRÍGUEZ SUÁREZ, J.L. y VELANDIA QUINTERO, Y.T., 2020. Desarrollo de un biomaterial a partir de peróxido de calcio encapsuladas en alginato como alternativa de prevención para la isquemia distal digital generada por vasopresores. [en línea]. [Consulta: 5 agosto 2022]. Disponible en: https://repository.unab.edu.co/bitstream/handle/20.500.12749/12427/2020_Tesis_Diana_Cristina_Garcia_Rivero.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

GHOLOUPOURMALEKABADI, M., JAJARMI, V., REZVANI, Z., GHAFFARI, M., VERMA, K.D., SHIRINZADEH, H. y MOZAFARI, M., 2016. Oxygen-generating nanobiomaterials for the treatment of diabetes: A tissue engineering approach. Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials, pp. 331-353. DOI 10.1016/B978-0-323-42865-1.00012-X.

HORNA, D., 2011. Estructura composición y superficie como vectores directores en el diseño de biomateriales. Aplicación al desarrollo de scaffolds poliméricos y a superficies bioactivas Realizada [en línea]. S.l.: Institut Químic de Sarrià. [Consulta: 5 octubre 2021]. Disponible en: www.url.es.

IZARRO, 2014. Medicina regenerativa para empresas punteras en producción | izaro.com. Izaro Tecnologías de fabricación y gestión. IMHE, Plast21, Qualitas. [en línea]. 30 de junio de 2014 [consultado el 27 de septiembre de 2021]. Disponible en: <https://www.izaro.com/medicina-regenerativa-para-empresas-punteras-en-produccion/c-1403877808/>

KOMPELLA, U.B., AMRITE, A.C., RAVI, R.P. y DURAZO, S.A., 2013. Nanomedicines for Back of the Eye Drug Delivery, Gene Delivery, and Imaging. Progress in retinal and eye research [en línea], vol. 36, pp. 172. [Consulta: 5 octubre 2021]. DOI 10.1016/J.PRETEYERES.2013.04.001. Disponible en: </pmc/articles/PMC3926814/>.

LOPEZ, ERNESTO. El espectro electromagnético. Campus de Gipuzkoa - UPV/EHU [en línea]. 2014 [consultado el 26 de mayo de 2022]. Disponible en: <http://www.sc.ehu.es/sbweb/fisica/cuantica/negro/espectro/espectro.htm>

MÁRQUEZ, E., DAVID, D., MORENO, H., PRADO, M., SANTIYÁN, M., SOLER RODRÍGUEZ, F., PÉREZ, M. y ÍNDICE, L., 2021. LAS NANOPARTÍCULAS Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS. ,

NAKAMURA, A., MURATA, D., FUJIMOTO, R., TAMAKI, S., NAGATA, S., IKEYA, M., TOGUCHIDA, J. y NAKAYAMA, K., 2021. Bio-3D printing iPSC-derived human chondrocytes for articular cartilage regeneration. Biofabrication, vol. 13, no. 4. DOI 10.1088/1758-5090/AC1C99.

RAMÍREZ, A., BENÍTEZ, J.L., ROJAS DE ASTUDILLO, L. y ROJAS DE GÁSCUE, B., 2016. Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. [en línea]. [Consulta: 5 octubre 2021]. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0255-69522016000200002.

RODRÍGUEZ LÓPEZ, V., 2019. Trabajo Fin De Grado Sistemas De Liberación De Fármacos En Implantes Óseos. [en línea], pp. 101. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ.pdf>.

SCHUURMAN, W., LEVETT, P.A., POT, M.W., VAN WEEREN, P.R., DHERT, W.J.A., HUTMACHER, D.W., MELCHELS, F.P.W., KLEIN, T.J. y MALDA, J., 2013. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromolecular bioscience* [en línea], vol. 13, no. 5, pp. 551-561.

[Consulta: 13 marzo 2022]. ISSN 1616-5195. DOI 10.1002/MABI.201200471. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23420700/>.

SONG, R., MURPHY, M., LI, C., TING, K., SOO, C. y ZHENG, Z., 2018. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy* [en línea], vol. 12, pp. 3117-3145. [Consulta: 5 octubre 2021]. DOI 10.2147/DDDT.S165440. Disponible en: <https://www.dovepress.com/current-development-of-biodegradable-polymeric-materials-for-biomedica-peer-reviewed-fulltext-article-DDDT>.

SUN, M., SUN, X., WANG, Z., GUO, S., YU, G. y YANG, H., 2018. Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue. *Polymers* [en línea], vol. 10, no. 11. [Consulta: 2 marzo 2022]. ISSN 20734360. DOI 10.3390/POLYM10111290. Disponible en: [/pmc/articles/PMC6401825/](https://pmc/articles/PMC6401825/).

SUVARNAPATHAKI, S., WU, X., LANTIGUA, D., NGUYEN, M.A. y CAMCI-UNAL, G., 2019. Breathing life into engineered tissues using oxygen-releasing biomaterials. *NPG Asia Materials* [en línea], [Consulta: 6 agosto 2022]. DOI 10.1038/s41427-019-0166-2. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41427-019-0166-2>.

VELASCO, E., 2018. Científicos del MIT idean una terapia para regenerar los cartílagos con artrosis. [en línea]. [Consulta: 5 octubre 2021]. Disponible en: <https://www.lavanguardia.com/ciencia/cuerpo-humano/20181128/453222174907/terapia-regenerar-cartilagos-artrosis-mit.html>.

YOON, H.J., SHIN, S.R., CHA, J.M., LEE, S.-H., KIM, J.-H., DO, J.T., SONG, H. y BAE, H., 2016. Cold Water Fish Gelatin Methacryloyl Hydrogel for Tissue Engineering Application. *PLOS ONE* [en línea], vol. 11, no. 10, pp. e0163902. [Consulta: 5 octubre 2021]. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0163902. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0163902>.

ZARZYCKI, R., MODRZEJEWSKA, Z. y NAWROTEK, K., 2010. (PDF) Drug release from hydrogel matrices. *ResearchGate* [en línea]. [Consulta: 13 octubre 2021]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/228503143_Drug_release_from_hydrogel_matrices.

ANEXOS

ANEXO A. MANIPULACIÓN DEL GELMA



ANEXO B. PESO TOTAL DE GELMA



ANEXO C. USO DEL VORTEX



ANEXO D. SINTESIS DEL PEROXIDO DE CALCIO



ANEXO E. PREPARACION DEL PEROXIDO DE CALCIO

