

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA

TESIS

Caracterización de nanoandamios sintetizados a partir de polihidroxiбутirato (PHB)
modificados con cristal bioactivo a tres diferentes proporciones

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

Presentado por:

BACH. JUAN MANUEL MONTOYA SALAZAR

ASESOR:

Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

COASESOR:

M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

CAJAMARCA – PERÚ

2022

COPYRIGHT ©
JUAN MANUEL MONTOYA SALAZAR
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Montoya, S. 2022. **Caracterización de nanoandamios sintetizados a partir de polihidroxitirato (PHB) modificados con cristal bioactivo a tres diferentes proporciones/** Juan Manuel Montoya Salazar.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

Co-Asesor: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –

UNC 2022

**CARACTERIZACIÓN DE NANOANDAMIOS SINTETIZADOS A PARTIR DE
POLIHIDROXIBUTIRATO (PHB) MODIFICADOS CON CRISTAL
BIOACTIVO A TRES DIFERENTES PROPORCIONES**

AUTOR: Bach. Juan Manuel Montoya Salazar

ASESORA: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

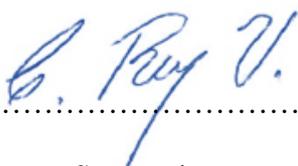
CO-ASESOR: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz.

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo –
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



.....
Presidente
Ronald Fernando Zelada Mazmela



.....
Secretaria
Claudia Carolina Rodríguez Ulloa



.....
Vocal
Luis Gilberto García Izquierdo

Cajamarca, 2022 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 9:12 del 06 de octubre del año 2022, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente II -304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: "Caracterización de nanoandamios sintetizados a partir de polihidroxitbutirato (PHB) modificados con cristal bioactivo a tres diferentes proporciones", del Bachiller en: Ciencias Biológicas Juan Manuel Montoya Salazar.

Siendo las 10:27 am del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: **APROBADO - EXCELENTE**, con el calificativo de **19**, con lo cual el Bachiller en Ciencia Biológicas se encuentra **APTO** para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Jurado Evaluador:

Presidente: M.Cs. Ronald Fernando Zelada Mazmela

Secretario: Dr. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Vocal: Dr. Luis Gilberto García Izquierdo

Asesor: Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

Co-asesor: M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

Presidente

Ronald Fernando Zelada Mazmela

Asesora

Dra. Consuelo Plasencia Alvarado

Secretaria

Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co asesor

M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz

Vocal

Luis Gilberto García Izquierdo

Tesista

Juan Manuel Montoya Salazar

A:

Mi familia por su apoyo constante durante mi desarrollo profesional. Su esfuerzo, dedicación y cariño me han permitido llegar hasta donde estoy

Todas las personas que creyeron verdaderamente en mí y en mi manera algo diferente de entender y hacer las cosas

Agradecimiento:

Agradezco a mis profesores, en especial a aquellos que, pese a las muchas limitaciones y obstáculos presentados en el camino, supieron transmitir los conocimientos necesarios para mi desarrollo profesional, afrontando con ingenio y perseverancia los innumerables retos enmarcados en la tarea del educador.

Agradezco a mis asesores la Dra. Consuelo Plasencia Alvarado y el M. Sc. Omar Pairazamán Quiroz, por guiarme en el desarrollo de este trabajo, aportando con sus conocimientos y experiencia lo necesario para su culminación.

Agradezco al M. Sc. Héctor Almanzor Chinchay Espino por los conocimientos impartidos en el curso de Bionanotecnología y el apoyo brindado durante el análisis de los resultados obtenidos en la caracterización.

Agradezco a la Universidad Nacional de Trujillo y al Laboratorio De Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Escuela de Ingeniería Ambiental y a todo su equipo, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo en sus instalaciones.

También expresar un agradecimiento especial Ing. Anthony Fuentes Olivera y a la Mblga. Keyla Sofia Llontop Bernabé por los conocimientos compartidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

Agradezco a la M. Sc. Gabriela Del Carmen, Barraza Jáuregui por el apoyo brindado para la realización del análisis FT IR, muy importante para este trabajo.

Agradezco al Dr. Luis Manuel Angelats Silva por el apoyo brindado para la realización de los ensayos SEM y XRD, muy importantes para el presente trabajo.

Expresar, además, que la presente tesis se ha desarrollado en el marco del proyecto financiado con fondos del Canon Minero **PROYECTO PIC N° 08-2014 Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales Regionales en la producción de Plásticos Biodegradables"**. Investigador Responsable: Dr. José Alfredo Cruz Monzón.

Tabla de contenido

Título	xiv
Resumen:.....	xv
Abstract:	xvi
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II:	4
MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la Investigación	4
2.2. Bases Teóricas:.....	6
2.2.1. Polihidroxicanoatos (PHA):	6
2.2.2. Polihidroxitirato (PHB):	7
2.2.3. Propiedades de los PHA's:	8
2.2.4. Producción de PHA's:	10
2.2.5. Biomaterial:	11
2.2.6. Cristal bioactivo (BG):	11
2.2.7. Nanoandamio:	12
2.2.8. Factores que influyen en la adhesión celular en nanoandamios:	13
2.3. Definición de Términos:	14
CAPÍTULO III.....	15
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	15
3.1. Nivel de Investigación:.....	15
3.2. Tipo y diseño de investigación:	15
3.2.1. Tipo de investigación:	15

3.2.2.	Diseño de Investigación:	15
3.3.	Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	15
3.3.1.	Producción de PHB:	15
3.3.1.1.	Reactivación de la cepa halófila CHI:	15
3.3.1.2.	Tinción Sudan Black B:	15
3.3.1.3.	Tinción Nile Blue A:.....	16
3.3.1.4.	Caracterización morfológica de la cepa CH1:.....	16
3.3.1.5.	Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriana y producción de PHB: 16	
3.3.1.6.	Producción de PHB en biorreactor:	18
3.3.1.7.	Recuperación de la biomasa:.....	19
3.3.1.8.	Extracción de PHB:.....	19
3.3.2.	Caracterización del PHB obtenido:.....	19
3.3.2.1.	Caracterización de PHB obtenido por HPLC:	19
3.3.2.2.	Caracterización de PHB obtenido por ATR - FTIR:.....	20
3.3.3.	Síntesis de nanoandamios:	20
3.3.4.	Caracterización de Nanoandamios:	22
3.3.4.1.	Caracterización estructural por microscopia electrónica de barrido (SEM) y energía de dispersión de rayos X (EDS):	22
3.3.4.2.	Caracterización estructural por difracción de rayos X (XRD):	22
3.3.4.3.	Caracterización estructural por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT -IR):.....	22
CAPÍTULO IV		24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		24
4.1.	Resultados:	24
4.1.1.	Producción de PHB:	24
4.1.1.1.	Tinción Sudan Black B y Nile Blue A:	24
4.1.1.2.	Caracterización morfológica de la cepa CH1:.....	25

4.1.1.3.	Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriano y producción de PHB:	26
4.1.1.4.	Producción de PHB en Biorreactor:.....	27
4.1.2.	Caracterización del PHB obtenido:.....	29
4.1.2.1.	Caracterización de PHB obtenido por HPLC:	29
4.1.2.2.	Caracterización de PHB obtenido por ATR-FTIR:.....	30
4.1.3.	Caracterización de nanoandamios:	31
4.1.3.1.	Caracterización estructural SEM y EDS:	31
4.1.3.2.	Caracterización estructural XRD:.....	34
4.1.3.3.	Caracterización estructural ATR-FTIR:	35
4.2.	Discusión:.....	37
CAPÍTULO V.....		42
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		42
5.1.	Conclusiones:.....	42
5.2.	Recomendaciones:.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....		44
APÉNDICES.....		52
Apéndice N° 1: Composición del medio MMG para fermentación y cultivo en placa		52
Apéndice N° 2: Reactivación de la cepa halófila CHI.		53
Apéndice N° 3: Tinción Sudan Black B.		53
Apéndice N° 4: Tinción Nile Blue A.		54
Apéndice N° 5: Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriana y producción de PHB.		54
Apéndice N° 6: Producción de PHB en Biorreactor.		56
Apéndice N° 7: Caracterización de PHB obtenido por HPLC.		60
Apéndice N° 8: Caracterización de PHB obtenido por FT -IR.		61
Apéndice N° 9: Síntesis de Nanoandamios.		62

Apéndice N° 10: Caracterización estructural SEM y EDS:	63
Apéndice N° 11: Caracterización estructural XRD.	64
ANEXOS:	65
Anexo N° 1: Certificado de calidad Bioglass 45S5 MO-SCI ONLINE	65
Anexo N° 2: Reporte de curva de calibración PHB para análisis HPLC	66
Anexo N° 3: Reporte de análisis HPLC de muestras de PHB producido en Biorreactor	67
Anexo N° 4: Software OMNIC FTIR (Thermo Scientific) utilizado para la recogida y análisis de los espectros FT- IR	67
Anexo N° 5: Micrografías SEM de los nanoandamios producidos con la proporción N° 1.	68
Anexo N° 6: Micrografías SEM de los nanoandamios producidos con la proporción N° 2.	69
Anexo N° 7: Micrografías SEM de los nanoandamios producidos con la proporción N° 3.	70
Anexo N° 8: Análisis EDS de los nanoandamios producidos con la proporción N° 1	71
Anexo N° 9: Análisis EDS de los nanoandamios producidos con la proporción N° 2	72
Anexo N° 10: Análisis EDS de los nanoandamios producidos con la proporción N°3	73

Lista de Abreviaciones:

3-HHx: 3- Hidroxihexanoato.

BG: Biocristal (Bioglass).

BCP: Fosfato de calcio bifásico (Biphasic Calcium Phosphate)

EDS: Espectroscopía de rayos X de dispersión de energía

FT-IR: Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada De Fourier (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy).

HA: Hidroxiapatita

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución (High Performance Liquid Chromatography).

OHA: Oligohidroxiálcanoatos

PHA: Polihidroxiálcanoato.

PHAmcl: Polihidroxiálcanoatos de Cadena Media (Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates).

PHAscl: Polihidroxiálcanoatos de Cadena corta (Small-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates).

PHB: Polihidroxiábutirato.

RPM: Revoluciones Por Minuto.

SEM: Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron Microscope).

XRD: Difracción de Rayos X (X-ray diffraction).

MM - G: Medio Mineral Glucosado.

Glosario:

Bioglass: Es un vidrio bioactivo compuesto por dióxido de silicio, óxido de sodio, óxido de calcio y pentóxido de fósforo. Este material se caracteriza por producir estructuras de poros superficiales, 5–20 nm, con excelente área de superficie, volumen de poro, citocompatibilidad y capacidad para inducir la formación de apatito. Al igual que con HA y BCP, las aplicaciones clínicas de los biovidrios se han centrado en la osteogénesis (1).

Biomaterial: Sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico (2)

Nanoandamio: Un Nanoandamio es una estructura de marco tridimensional artificial que sirve como un imitador de la matriz extracelular para la adhesión celular, la migración, la proliferación y la regeneración de tejidos en tres dimensiones (3).

Polihidroxi butirato: El poli (3-hidroxi butirato) (PHB), un polímero biodegradable, puede ser producido por diferentes microorganismos. El PHB pertenece a la familia de los polihidroxi alcanoatos (PHA) que se acumula principalmente como un gránulo en el citoplasma de los microorganismos para almacenar carbono y energía (4)

**Caracterización de nanoandamios sintetizados a partir de polihidroxiбутирато
(PHB) modificados con cristal bioactivo a tres diferentes proporciones.**

Resumen:

En esta investigación se desarrollaron nanoandamios poliméricos basados en PHB y modificados con BG a 3 diferentes proporciones con el objetivo de evaluar sus características. Para lo cual se realizó la caracterización de la cepa halófila CH1, seguido de la producción de PHB en biorreactor, posteriormente se hizo la síntesis de nanoandamios y finalmente se los caracterizó. Durante la caracterización de la cepa CH1 se observó la acumulación de PHB por medio de las tinciones microbiológicas Sudan Black B y Nile Blue A, también se demostró que el mayor porcentaje de acumulación se produjo durante la fase estacionaria de crecimiento (68 % p/p), por otro lado, durante la producción en biorreactor se obtuvo rendimientos entre 3,15 y 3,68 g/L de biomasa y 1,60 y 1,85 g/L de PHB. Durante la caracterización HPLC del polímero obtenido los resultados demostraron un tiempo de retención característico para el ácido crotonico (17.86 min), derivado de la digestión ácida de PHB, en el análisis FT- IR se observaron las bandas representativas del PHB, así como, un alto porcentaje de coincidencia con el estándar de PHB de la librería (96 %). Mediante el análisis SEM se observó que los andamios producidos poseían una estructura porosa, además por medio del análisis XRD se observó el comportamiento cristalino de los andamios producidos, así como la incorporación del BG en la estructura del PHB, en el análisis FT-IR no se apreciaron diferencias significativas con respecto a los espectros de los precursores. Se concluye que los nanoandamios obtenidos a 3 diferentes proporciones poseen una elevada porosidad, un comportamiento cristalino de su estructura molecular y una incorporación del BG en la estructura química del PHB y que la proporción N°2 (PHB/BG=0.6/0.12) otorgó las mejores características estructurales y químicas durante su síntesis.

Palabras clave: Nanoandamio, polihidroxi-butarato, bioglass, polímero, bioproceso.

Abstract:

In this research, polymeric nanoscaffolds based on PHB and modified with BG at 3 different proportions were developed in order to evaluate their characteristics. For which the characterization of the halophilic strain CH1 was carried out, followed by the production of PHB in a biorreactor, later the synthesis of nanoscaffolds was made and finally they were characterized. During the characterization of the CH1 strain, the accumulation of PHB was observed by means of the microbiological stains Sudan Black B and Nile Blue A, it was also shown that the highest percentage of accumulation occurred during the stationary phase of growth (68 % w/w), on the other hand, during biorreactor production, yields between 3,15 and 3,68 g/L of biomass and 1,60 and 1,85 g/L of PHB were obtained. During the HPLC characterization of the polymer obtained, the results showed a characteristic retention time for crotonic acid (17.86 min), derived from the acid digestion of PHB, in the FT-IR analysis the representative bands of PHB were observed, as well as a high percentage match with library PHB standard (96 %). Through SEM analysis it was observed that the scaffolds produced had a porous structure, in addition through XRD analysis the crystalline behavior of the scaffolds produced was observed, as well as the incorporation of BG in the PHB structure, in the FT-IR analysis no significant differences were observed with respect to the spectra of the precursors. It is concluded that the nanoscaffolds obtained at 3 different proportions have a high porosity, a crystalline behavior of their molecular structure and an incorporation of the BG in the chemical structure of the PHB and that the proportion N°2 (PHB/BG=0.6/0.12) gave the best structural and chemical characteristics during its synthesis

Keywords: Nanoscaffold, polyhydroxybutyrate, bioglass, polymer, bioprocess.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los principales objetivos de la ingeniería de tejidos es la búsqueda de nuevos materiales que permitan el desarrollo de dispositivos médicos con mejores características que los existentes en el mercado, como la biocompatibilidad, bioactividad y biodegradabilidad, así como tener propiedades mecánicas muy similares al tejido a regenerar, además desde el punto de vista quirúrgico estos materiales deben ser fácilmente manipulables en diferentes formas y tamaños lo que permitiría el tratamiento *in situ* (3).

Dentro de este contexto los biopolímeros son uno de los grupos de compuestos más utilizados para estos fines ya que por su naturaleza química no presentan mayores problemas de biocompatibilidad o biodegradación, siendo los polihidroxialcanoatos (PHA) una alternativa con mucho potencial en este campo; sin embargo, algunas de sus propiedades como fragilidad, baja temperatura de distorsión térmica y pobres propiedades de gas barrera, pueden ser mejoradas a partir del desarrollo de nano compuestos basados en estos biopolímeros adicionando a su estructura algunos compuestos como silicatos, nanotubos de carbono, cristal bioactivo, caolinita, nano arcillas, nano cristales de celulosa, hidróxidos dobles de aluminio y cobalto lo que permitiría una mayor maleabilidad y la ductilidad en sus aplicaciones (5).

En este sentido uno de los nanocompuestos con un gran interés para la regeneración de tejidos óseos son los nanoandamios basados en polihidroxialcanoatos (PHA) modificados con bioglass, los cuales son importantes porque aparte de que presentan una elevada biocompatibilidad al no generar rechazo en el huésped, también presentan

características como una elevada porosidad lo que permitiría la migración de células y nutrientes además de que su estructura facilitaría la diferenciación y proliferación celular, y en términos de degradación estos deben ser fácilmente degradables ya que los andamios no pretenden ser implantes permanentes puesto que su verdadero objetivo es que las células del huésped se depositen en su estructura y con el paso del tiempo reemplacen al implante de modo que él mismo y los productos formados durante su descomposición presenten una baja toxicidad y no generen una respuesta inmune muy significativa. Otra característica de su degradación es que debe ser controlada, ya que se espera que éste no se degrade antes que el tejido haya sido regenerado de manera adecuada, evitando así fallas mecánicas puesto que estos implantes estarán sometidos a carga y pueden fracturarse si no proporcionan el soporte mecánico mientras se regenera el tejido. De manera similar si el andamio no tiene la capacidad de degradarse lo suficientemente rápido esto podría desencadenar una respuesta inflamatoria dirigida al mismo, lo que perjudicaría la regeneración del tejido (6).

Para la síntesis de los nanoandamios se pueden utilizarse a los PHA, los cuales son un grupo de compuestos orgánicos poliméricos que pueden ser producidos a partir de síntesis química o biológica, esta última está basada en el metabolismo de algunos microorganismos como las bacterias, las cuales producen dicho polímero bajo condiciones de estrés metabólico en elevadas concentraciones de carbono y bajas concentraciones de nitrógeno, dichas condiciones inducirían a la bioacumulación intracelular de dichos metabolitos, los cuales pueden ser utilizados en estas aplicaciones. Para su producción se requiere de bioprocesos los cuales deben poseer condiciones fisicoquímicas controladas para mantener un buen rendimiento del bioproceso, y de este modo tener una producción sostenible, siendo el polihidroxibutirato (PHB) producido en mayor proporción. Además de los PHA, para la síntesis de andamios se utiliza cristales bioactivos (BG) porosos cuya

composición está basada en algunos compuestos inorgánicos como óxidos (CaO , P_2O_5) y compuestos de silicio, los cuales pueden ser sintetizados usando métodos como sol – gel (6).

Debido a su alta biocompatibilidad y degradación de los biomateriales son candidatos idóneos en este tipo de procesos, ya que estas propiedades permiten al dispositivo cumplir su función sin provocar efectos adversos a nivel local o sistémico, además de respaldar la función celular, otorgando un sustrato para la adhesión, migración, proliferación y diferenciación celular, sin generar una respuesta inmunitaria significativa, evitando el desarrollo de respuesta inflamatoria que podría complicar el proceso de curación (7). Dependiendo del tipo de tejido y de las características de las células que lo componen, se debe establecer la composición y propiedades que debe poseer dicho dispositivo para cumplir adecuadamente sus funciones. Por este motivo durante su desarrollo la mayor parte de los esfuerzos se centran en obtener buenas características químicas y estructurales (8).

Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar las características de los nanoandamios sintetizados a tres proporciones, así como encontrar la proporción PHB:BG que presente las mejores características mencionadas anteriormente en los nanoandamios, modificando las concentraciones de sus componentes durante su síntesis.

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

En la revisión de Dos Santos J. *et al* (9) menciona que los polihidroxicanoatos constituyen un grupo de polímeros de origen microbiano en cuya estructura encontramos a grupos funcionales como éster e hidroxilo, que presentan características termoplásticas similares a los plásticos derivados del petróleo, son producidos a partir de sustratos que contienen elevada fuente de carbono, en el metabolismo de algunos microorganismos, dentro de este grupo de polímeros, el más estudiado es el poli (3-hidroxi-butirato) ya que en la acumulación de polihidroxicanoatos este compuesto es el más común además de poseer notables propiedades de biodegradabilidad, su descubrimiento y estudios fueron desarrollados a partir de la década de 1920, y su aislamiento y caracterización son atribuidos a Maurice Lemoigne, sin embargo su producción comienza a partir de 1925 según Vroman y Tighzert.

En la década del 50, mediante ensayos realizados en bacterias del género *Bacillus*, se logró determinar que dichos compuestos cumplían una función de reserva energética ya que la acumulación de estos compuestos en *B. megaterium*, se daba lugar cuando las condiciones del medio de cultivo como la relación entre la concentración del carbono y del nitrógeno era alta, formándose así gránulos de PHA, caso contrario cuando la fuente de carbono se reducía, los gránulos eran degradados para suplir la demanda energética de estas bacterias. En los próximos quince años tuvo lugar un proceso de investigación extensa sobre su producción en microorganismos de diversos géneros como *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Cyanobacterium* y muchas

otras. Además de la producción se iniciaron estudios relacionados con las propiedades químicas y físicas del PHB, como peso molecular, temperatura de fusión, cristalinidad, morfología del gránulo, así como métodos de extracción, métodos de identificación y cuantificación, metabolismo, enzimología, degradación y función fisiológica. En esta etapa fue de particular interés encontrar la relación entre la biosíntesis de PHB y el ambiente extracelular. De estos estudios se determinó que las condiciones que favorecen la síntesis de PHB están relacionadas con aquellas que daban lugar a altas concentraciones de NAD(P)H y acetil-CoA, y baja concentración de coenzima-A libre.

Y se determinó que estas condiciones eran variables según el microorganismo, pero la biosíntesis del polímero siempre estaba ligada a un factor de limitación de crecimiento como nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno o magnesio (10).

Debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad, este polímero tiene potencial en diversas áreas de aplicación como farmacología, ambiental, envasado, veterinaria, industrial, agrícola y biomédica, esta última posee varios campos de aplicación, donde se puede mencionar a la ingeniería de tejidos (9), que ha mostrado una gran promesa en la generación de alternativas vivas para tejidos y cirugía reconstructiva. Los materiales y las tecnologías de fabricación son de importancia crítica para la ingeniería de tejidos en el diseño de matrices extracelulares artificiales temporales (andamios), que soportan la formación de tejido tridimensional. En la revisión de Peter X. Ma (11) se describen importantes principios de diseño de andamios. Se revisan los materiales y tecnologías de fabricación más utilizados para los andamios. También se discuten algunos desarrollos nuevos en materiales de andamios y tecnologías de fabricación.

Teniendo estas aplicaciones en cuenta, se opta por buscar materiales que puedan ajustarse a estos requerimientos, si bien la importancia del PHB radica en las propiedades

ya mencionadas, puede ser modificado para mejorar otras propiedades, como las mecánicas, las cuales pueden ser mejoradas mediante el uso de materiales como cristales bioactivos o arcillas las cuales darían un soporte adicional a este compuesto tal y como es descrito en trabajos como los de Livingston, T. *et al* (12), en donde manifiesta que se necesitan nuevos materiales y/o enfoques para proporcionar estabilidad al sitio, estimular la formación ósea y, en última instancia, conducir a tejido óseo completamente funcional. Los cristales bioactivos porosos (preparados a partir de gránulos de 45S5, 45 % SiO₂, 24,5 % de Na₂O, 24,5 % de CaO, y 6 % de P₂O₅) se han desarrollado como armazones para ingeniería de tejido óseo y se han estudiado *in vitro*. En este estudio, se investigó la incorporación de construcciones de ingeniería tisular que utilizan estos andamios en defectos óseos corticales grandes en la rata que simula las condiciones de revisión. La cantidad de hueso aumentó significativamente con el tiempo para todos los grupos, mientras que la cerámica bioactiva se reabsorbió gradualmente en un 40% a las 12 semanas. Las propiedades estructurales de los huesos largos tratados mejoraron con el tiempo. Los huesos largos tratados con el híbrido tuvieron un retorno temprano en la rigidez torsional a las 2 semanas. Ambas construcciones de ingeniería tisular lograron resistencia y rigidez torsionales normales en 4 semanas en comparación con el andamio solo, lo que logró esto en 12 semanas. La cerámica bioactiva porosa, modificada en superficie, es un material de andamio prometedor para la reparación ósea diseñada por tejido (12).

2.2. Bases Teóricas:

2.2.1. Polihidroxialcanoatos (PHA):

Los Polihidroxialcanoatos (PHA) constituyen un grupo de poliésteres termoplásticos, que poseen propiedades similares a algunos plásticos convencionales de la industria petroquímica, ya que presentan características termoplásticas y resistencia al agua en

relación con los polímeros sintéticos. Los PHA son biodegradables y sintetizados por medios bacterianos, a partir de materias primas renovables, como azúcares, ácidos grasos o licor fermentado a partir de desechos. Entre los PHA se destaca el poli(3-hidroxi-butirato) (PHB) (9).

2.2.2. Polihidroxi-butirato (PHB):

El poli (3-hidroxi-butirato) PHB es uno de los polímeros más estudiados ya que se presenta con mayor frecuencia cuando los PHA se acumulan por los microorganismos. El PHB es un poliéster alifático con cadena polimérica lineal, que presenta propiedades termoplásticas. Este material es no tóxico, ópticamente activo y cuando es puro, tiene una coloración amarillenta, presenta una barrera a la permeabilidad del agua y el gas y estabilidad a la radiación ultravioleta. Una de las características más mencionadas en la literatura sobre el PHB es su biodegradabilidad. Sin embargo, esto solo ocurre cuando el material está expuesto a ambientes biológicamente activos (suelos, agua de mar o agua dulce y compostaje aeróbico y anaeróbico), que son ambientes en los cuales el material está en contacto con microorganismos degradantes. También se puede mencionar el lodo activado como otro entorno propio de la degradación de PHB y el relleno sanitario, donde el material puede desecharse sin afectar el medio ambiente (9).

Otra característica importante del PHB es la biocompatibilidad, que puede entenderse como una interacción satisfactoria entre cierta sustancia y el entorno fisiológico en el que se inserta. En otras palabras, es el término usado cuando el material no es rechazado por el cuerpo y cuando la asimilación genera desechos no tóxicos. El PHB es biocompatible por dos razones: está presente en el torrente sanguíneo humano, en forma de PHB de masa molar baja y, producto a su degradación, se transforma en el ácido 3-hidroxi-butírico, un metabolito común en los seres vivos (13)(3).

2.2.3. Propiedades de los PHA's:

- **Propiedades generales de los PHA's:**

Los polímeros de PHA son termoplásticos y difieren en sus propiedades dependiendo de su composición química (homo o copoliéster, que contienen ácidos grasos hidroxilados). Algunos grados de aditivación de PHB son similares en sus propiedades materiales al polipropileno (PP) y ofrecen una buena resistencia a las propiedades de barrera contra la humedad y el aroma. El ácido polihidroxibutírico sintetizado a partir de PHB puro es relativamente frágil (es decir, tiene un alargamiento de rotura típicamente por debajo del 15 %) y rígido (es decir, módulo E por encima de 1 GPa).

Por estas razones, los esfuerzos en la preparación de PHB se centran principalmente en la búsqueda de plastificantes y agentes de nucleación capaces de reducir el proceso de cristalización y mejorar la flexibilidad y el alargamiento en el producto final.

Estas son algunas de las propiedades generales de los PHA's:

- Insoluble en agua y relativamente resistente a la degradación hidrolítica.
 - Buena resistencia ultravioleta pero pobre resistencia a ácidos y bases.
 - Soluble en cloroformo y otros hidrocarburos clorados.
 - Biocompatible y por lo tanto adecuado para aplicaciones médicas.
 - Se hunde en el agua, facilitando su biodegradación anaeróbica en los sedimentos.
 - No tóxico.
 - Menos "pegajosos" que los polímeros tradicionales cuando se funden
- (14).

- **Propiedades termo-mecánicas:**

Las propiedades físicas y materiales de los PHA están muy influenciadas por su composición de monómeros y estructura química; es decir, la longitud de los grupos colgantes que se extienden desde el esqueleto del polímero, la naturaleza química de estos grupos colgantes y la distancia entre los enlaces éster en el polímero.

El PHA se puede clasificar principalmente de acuerdo con el tamaño del grupo colgante (el número de átomos de carbono en las unidades monoméricas) en una longitud de cadena corta, longitud de cadena media y longitud de cadena larga.

Además de su clasificación general (con respecto a la longitud de la cadena lateral), hay varios tipos diferentes de cadenas laterales en la misma familia de PHA; También pueden tener grupos funcionales adjuntos. De especial interés son el grupo 3-hidroxilo y el grupo carboxílico de los grupos funcionalizados en la cadena lateral que permiten una modificación química adicional, por ejemplo, halógenos, grupos carboxilo, hidroxilo, epoxi, fenoxi, cianofenoxi, nitrofenoxi, tiofenoxi y metiléster.

Existen algunas estrategias para orientar las estructuras de PHA finales para lograr composiciones a medida. Puede controlarse relativamente bien de tres maneras:

- Eligiendo el hospedador de microorganismo correcto;
- Eligiendo condiciones de cultivo y fuentes de carbono apropiadas.
- Realizando modificaciones químicas después de su producción y purificación.

La combinación de estas tres estrategias puede traer el éxito para lograr la composición deseada (15).

- **Propiedades de biocompatibilidad:**

Los PHAs tienen un gran potencial en el campo de los materiales biocompatibles ya que sus aplicaciones potenciales se encuentran en el manejo de heridas, el sistema vascular, ortopedia, administración de medicamentos, urología, etc. Los PHAmcl suelen ser más biocompatibles que los PHAscl. De hecho, estudios recientes sobre productos de degradación de PHA han demostrado que la citotoxicidad de los oligohidroxicanoatos disminuyó con el aumento de la longitud de la cadena lateral de PHA. Sin embargo, los estudios más abundantes se han referido a P4HA y PHAscl-co-PHAMcl debido a su mayor accesibilidad y propiedades específicas. Los estudios del copolímero PHB-co-PHHx han demostrado que un contenido moderado de co-monómeros 3-HHx (12 %) induce una mejor adhesión de las células del músculo liso de la aorta de conejo (RaSMCs), mientras que un contenido más alto de 3-HHx (20 %) es más adecuado para la proliferación de estas células (15).

2.2.4. Producción de PHA's:

En la producción industrial de PHA, el poliéster se extrae y se purifica de las bacterias optimizando las condiciones del bioproceso, o el uso de algunos sustratos como azúcar o glucosa. Como materia prima para la producción, se pueden usar carbohidratos como la glucosa y la sacarosa, pero también aceite vegetal o glicerina residual de la producción de biodiesel. Además de estos sustratos convencionales también se está buscando optimizar una producción industrial con desechos como sustrato dando una mayor sostenibilidad al proceso. Otra tecnología a tomar en cuenta implica el desarrollo de cultivos transgénicos que expresen las rutas de síntesis de PHA de las bacterias para producir este polímero como forma de almacenamiento de energía en sus tejidos vegetales (9)

2.2.5. Biomaterial:

Un biomaterial se define como una sustancia que ha sido diseñada para tomar una forma que, sola o como parte de un sistema complejo, se utiliza para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, el curso de cualquier procedimiento terapéutico o de diagnóstico (2).

2.2.6. Cristal bioactivo (BG):

Los cristales bioactivos o vidrios bioactivos aparecen como consecuencia de la búsqueda de superar las limitaciones y problemas de los materiales disponibles hasta el momento, que no son capaces de cumplir con los características necesarias para cumplir sus funciones y evitar problemas derivados de su utilización (3). Dichos materiales se elegían principalmente por ser inertes (es decir, se buscaba que no tenga reacciones perjudiciales con el organismo en el que era incorporado). Pero dado que realmente no existe ningún material que no reaccione con el organismo, estos materiales originaban reacciones de encapsulación y en el caso de los metales, corrosión. Además, materiales de naturaleza metálica, que son más fuertes y rígidos que el hueso, promueven la resorción ósea mediante la protección del esqueleto de alrededor de sus niveles de estrés normales. Como consecuencia, el implante se acaba aflojando haciendo necesaria otra intervención quirúrgica (16).

En 1971, L. Hench, con el objetivo de superar estos problemas, diseña un cristal biodegradable en el sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$. El gran descubrimiento fue el hecho de que un vidrio compuesto por un 46,1 mol. % SiO_2 , 24,4 mol.% Na_2 , 26,9 mol.% CaO_2 y un 2,6 mol.% P_2O_5 (conocido como Bioglass), tenía una unión tan fuerte con el hueso que no podía ser eliminado sin romper el tejido óseo (17). Este vidrio muestra el índice de bioactividad (la capacidad que tiene un material de interactuar con los tejidos, blandos

y duros, del organismo, más alto hasta ahora conocido y es aún considerado el patrón de referencia para otros materiales bioactivos (18).

2.2.7. Nanoandamio:

Un Nanoandamio es una estructura de marco tridimensional artificial que sirve como un imitador de la matriz extracelular para la adhesión celular, la migración, la proliferación y la regeneración de tejidos en tres dimensiones. Un andamio ideal para la ingeniería de tejidos debe poseer las siguientes características (3):

- Es altamente biocompatible y no provoca una reacción inmunológica o clínicamente detectable de un cuerpo extraño.
- Es tridimensional y capaz de regenerar tejidos y órganos en su forma fisiológica normal.
- Es altamente poroso con una red de poros interconectada disponible para el crecimiento celular y el transporte de nutrientes y desechos metabólicos.
- Tiene una química de superficie adecuada que permite la unión celular, la migración, la proliferación y la diferenciación.
- Tiene tasas controlables de degradación y reabsorción que coinciden con la tasa de crecimiento de tejido *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para materiales biodegradables o reabsorbibles.
- Posee las propiedades mecánicas apropiadas que coinciden con las de los tejidos y órganos normales.
- Tiene una superficie bioactiva para estimular una regeneración más rápida del tejido

(3)

2.2.8. Factores que influyen en la adhesión celular en nanoandamios:

- **Tamaño de poro:**

Una característica fundamental de los andamios utilizados en la regeneración ósea son los poros, encontrando estructuras macroporosas (poros de 100 μm) hasta microporosas (poros de 5 μm). La macroporosidad juega un papel importante en la osteoconductividad teniendo un rango óptimo que va desde 150 a 500 μm para la osteoconducción y la transferencia de nutrientes. En contraposición con las superficies microestructuradas, las superficies nanoestructuradas ofrecen una gran porosidad, más límites de partículas y una mayor porcentaje de adsorción inicial de proteínas. Las propiedades mencionadas anteriormente fueron responsables de la excelente adhesión y crecimiento celular en la superficie de los nanoandamios (19).

- **Topografía de superficie**

La topografía de la superficie influye en la unión inicial de las células osteoblásticas. La superficie del andamiaje tiene repercusiones a nivel del transporte de nutrientes/desechos, la integridad mecánica, la diferenciación celular y la capacidad de inducir la transducción de señales. Por esto las superficies ranuradas soportan mejor las células osteoblásticas. Adhesión y proliferación que las superficies rugosas. Además, las ranuras de menor profundidad (14 y 29 nm) inducen una expansión y unión de células osteoblásticas fetales humana. Por este motivo el aumento del área superficial mejora una mayor adsorción de proteínas con más puntos focales de adhesión, donde las células podrían anclarse al polímero (19).

- **Rugosidad de la superficie**

La rugosidad de la superficie de los nanoandamios altera la proliferación, diferenciación y producción de matriz de osteoblastos *in vitro*. La rugosidad a nanoescala

en la superficie de los nanoandamios tridimensionales es importante para la adhesión de osteoblastos. Esta nanorrugosidad aumenta efectivamente la absorción inicial de proteínas (como la fibronectina y la vitronectina) las cuales median la adhesión celular posterior. Las dimensiones del patrón óptimo también son preferibles para la adhesión de los osteoblastos porque el ancho de las regiones nanorrugosas altera la morfología de los osteoblastos. Además, se ha encontrado que el aumento de la rugosidad de la superficie mejora la producción de proteína digestible de colagenasa (19).

2.3. Definición de Términos:

- **Bioactividad:**

Es una propiedad de los materiales los cuales tienen el efecto o inducen una respuesta de los tejidos, organismos o células vivos, como la formación de hidroxiapatita (21).

- **Biocompatibilidad:**

Es la interacción favorable de un sistema vivo o tejido con un dispositivo médico terminado o materiales componentes. En el sentido más simple, un material o dispositivo biocompatible no daña al paciente, ya que este no es tóxico o perjudicial y además no causa rechazo inmunológico (22).

- **Biodegradación:**

Proceso biológico de materia orgánica, que se convierte total o parcialmente en agua, CO₂ / metano, energía y nueva biomasa por microorganismos (bacterias y hongos) (23).

- **Hidroxiapatita:**

Es una cerámica biocompatible utilizada en muchas áreas de la medicina, pero principalmente para el contacto con el tejido óseo, debido a su parecido con la composición mineral de los huesos (24).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación:

Descriptivo

3.2. Tipo y diseño de investigación:

3.2.1. Tipo de investigación:

Básica.

3.2.2. Diseño de Investigación:

Cuasi – experimental.

3.3. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.3.1. Producción de PHB:

3.3.1.1. Reactivación de la cepa halófila CHI:

La cepa halófila provista por el Laboratorio de Tecnologías Limpias y/o Emergentes de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo, se reactivó en caldo nutritivo modificado al 2 % de dextrosa y 10 % de NaCl y se incubó por 24 horas a 30 °C, y luego fueron sembradas en medio MMG (Apéndice N° 1) bajo las mismas condiciones (Apéndice N° 2), para estimular la producción de PHB (25), se buscó obtener colonias aisladas. (26).

3.3.1.2. Tinción Sudan Black B:

Para evaluar la acumulación de PHB se realizó la tinción de Sudan Black B la cual permitió la diferenciación de inclusiones que poseen el grupo funcional ester en las células bacterianas bajo microscopía óptica (27)(28), lo cual es un primer indicador de la posible acumulación de gránulos de PHB (Apéndice 03).

3.3.1.3. Tinción Nile Blue A:

Para confirmar que los gránulos observados son PHB se realizó la tinción de Nile Blue A, la cual es más específica para los compuestos de PHA's y se observó mediante microscopia de fluorescencia (Apéndice 04) (29).

3.3.1.4. Caracterización morfológica de la cepa CH1:

- **Caracterización macroscópica:**

Se evaluaron las principales características macroscópicas de las colonias de la cepa halófila (forma, color, elevación, borde, superficie, consistencia, densidad) en medio mineral modificado al 2 % de dextrosa y 10 % de NaCl.

- **Caracterización microscópica:**

Para la caracterización microscópica se realizó coloración Gram a partir de un cultivo joven de la cepa CH1 en medio mineral modificado al 2 % de dextrosa y 10 % de NaCl, se evaluó la forma y el tamaño (μm), para lo cual se realizó mediciones utilizando el software AmScope Software for Windows, previamente calibrado.

3.3.1.5. Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriana y producción de PHB:

Previa a la producción de polihidroxibutirato en biorreactor se realizó la cinética de crecimiento con el objetivo de identificar las principales fases del crecimiento, ya que el mayor nivel de acumulación de PHB se da durante la fase estacionaria del crecimiento (30) (Apéndice N° 5).

- **Preparación del inóculo**

Para la preparación de inóculos se tomó una asada a partir de colonias aisladas en medio MM-G (30), y se suspendió en matraces de 125 mL con 30 mL del medio MM-G

(pH final 8.4) y se llevó a incubación en shaker orbital a 180 RPM y 30 °C por 24 horas, trascurrido este tiempo se verificó la presencia de crecimiento y se procedió a estandarizar el inóculo mediante diluciones con solución salina estéril 10 % hasta llegar a una densidad óptica de 0.5 a 540 nm.

- **Bioproceso para la cinética de crecimiento:**

Una vez realizada la estandarización, se inocularon por duplicado 8 matraces con 3 mL de inóculo haciendo un volumen final de 30 mL, y se llevó a incubar bajo las mismas condiciones del inóculo. A partir de las 12 horas, se evaluó el crecimiento en intervalos de 6 horas por medio de la cuantificación de biomasa y la producción de PHB y el pH final del medio de cultivo.

- **Cuantificación de biomasa obtenida:**

Para la cuantificación de la biomasa se procedió a centrifugar el contenido del matraz a 4500 RPM durante 10 minutos y se realizaron dos lavados con solución salina al 10 %, se eliminaron los sobrenadantes se recuperó la biomasa haciendo uso de alcohol de 96°, finalmente se llevó a secar a 40 °C en crisoles previamente pesados hasta alcanzar el peso constante y se anotaron las masas obtenidas. La biomasa obtenida se calculó mediante la diferencia entre el masa final obtenida y la masa inicial del crisol.

- **Cuantificación de PHB obtenido:**

Para determinar la producción de PHB se realizó la extracción a partir de la biomasa obtenida, para lo cual se molió la biomasa con ayuda de un mortero y se realizó la extracción del PHB utilizando hipoclorito de sodio comercial 4%, en matraces considerado la proporción 30 mL de hipoclorito por cada gramo de biomasa obtenido, los matraces se llevaron a agitación lineal durante 8 horas a 250 RPM, pasado el tiempo se centrifugó el contenido a 4500 RPM durante 10 minutos, se realizaron 3 lavados,

finalmente se recuperó el PHB precipitado utilizando alcohol de 96° en crisoles previamente pesados, se llevó a secar a 40 °C hasta alcanzar el peso constante y se anotaron las masas obtenidas. La masa de PHB obtenida se calculó mediante la diferencia entre la masa final obtenida y la masa inicial del crisol. Con los datos obtenidos se construyó la curva de crecimiento y se evaluaron las fases.

3.3.1.6. Producción de PHB en biorreactor:

Para el proceso de producción se utilizó un biorreactor de la marca Applikon Biotechnology, el cual permitió el monitoreo de los parámetros básicos del bioproceso (pH, temperatura, biomasa, agitación y oxígeno disuelto). Previo al bioproceso se lavó y esterilizó el tanque y otros componentes. Para el desarrollo del bioproceso el medio fue MM-G (30), el medio fue preparado en matraces de 1000 mL y esterilizado por separado, los componentes esterilizados se dejaron enfriar en la cabina de bioseguridad, una vez a temperatura ambiente, se incorporaron todos los componentes y se ajustó el pH a 8,5 utilizando una solución estéril de NaOH 5N. El medio esterilizado fue vertido en el tanque del biorreactor en la cabina de bioseguridad en donde se colocaron los sensores de pH y oxígeno disuelto, posteriormente se conectaron todos los sensores a la estación de control y se procedió a polarizar el sensor de oxígeno disuelto durante 6 horas en agitación. Para realizar el inóculo se utilizaron cultivos de 18 a 24 horas, el cual correspondió al 10 % (200 mL) del volumen final y tuvo una densidad óptica de 0.5 a 600 nm, posteriormente se procedió a realizar el bioproceso en biorreactor cuyo volumen final fue de 2 L, las condiciones de producción fueron de 30 °C y 400 RPM, el tiempo total de producción fue de 48 horas. El bioproceso se repitió hasta obtener un total de 10 g de PHB (Apéndice N° 6).

3.3.1.7. Recuperación de la biomasa:

Pasado el tiempo de producción se realizó la recuperación de la biomasa mediante la centrifugación del medio de cultivo con biomasa a 4000 RPM durante 15 minutos para cada ensayo, se eliminó el sobrenadante y se procedió a realizar 3 lavados con solución salina al 10% para eliminar restos del medio de cultivo, finalmente se recuperó la biomasa obtenida con alcohol de 96° y se llevó a secar a 40 °C (31).

3.3.1.8. Extracción de PHB:

El biopolímero se extrajo a partir de la biomasa previamente molida, haciendo uso de hipoclorito de sodio comercial 4%, en matraces de 500 mL considerado la proporción 30 mL de hipoclorito por cada gramo de biomasa obtenido, los matraces se llevaron a agitación lineal durante 8 horas a 250 RPM, pasado el tiempo se centrifugo el contenido a 4500 RPM durante 10 minutos, procedió a realizar 3 lavados con agua destilada, finalmente se recuperó el biopolímero utilizando alcohol 96° y se llevó a secar a 40 °C (32). El PHB obtenido se almacenó en frascos herméticos.

3.3.2. Caracterización del PHB obtenido:

3.3.2.1. Caracterización de PHB obtenido por HPLC:

El polímero obtenido fue caracterizado como ácido crotónico por medio de análisis HPLC usando la metodología de Díaz-Barrera *et al* (33). Se pesaron 5.11 mg del PHB producido en biorreactor y se colocaron en tubos ependorff de 1,5 mL. A cada tubo se le agregó 500 µL de H₂SO₄ concentrado, luego fueron digeridos a 90 °C por 1 hora. Además, se utilizó ácido polihidroxibutírico reactivo grado analítico como estándar. La fase móvil consistió en una solución de H₂SO₄ 0.01N (previamente filtrada con un filtro

de Nylon de 0.45 μm y sonicada por 15 minutos). Se tomaron 20 μL de la muestra, para ser diluidos con 1480 μL de la fase móvil, en un nuevo tubo ependorff. Posteriormente la muestra diluida fue filtrada con filtros de membrana de 0,45 μm de poro y fue trasvasada a los microviales para la lectura. La muestra se analizó usando un sistema de cromatografía líquida HPLC-UV con un equipo UHPLC Thermo Scientific UltiMate 3000 Rapid Separation y una columna Shodex SUGAR SH1011. La elución se realizó con 0.01N H_2SO_4 (fase móvil) a 1 mL/min y 50°C. La absorbancia del ácido crotónico se midió a 210 nm (Apéndice N° 7).

3.3.2.2. Caracterización de PHB obtenido por ATR - FTIR:

Las muestras obtenidas fueron sometidas a una identificación rápida por espectroscopía de infrarrojos usando un espectrómetro FT-IR con el modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR) (34), este equipo usa una ventana con cristal de diamante de tres rebotes. El equipo FTIR se conecta a una computadora con el software OMNIC FTIR (Thermo Scientific). El rango espectral que se utilizó para analizar los polímeros estaba entre 4000 a 550 cm^{-1} . Se realizaron 16 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros resultantes se configuraron para mostrarse en % de Transmisión. Todos estos parámetros fueron introducidos en el software antes de empezar la recogida del espectro de fondo y muestra (Apéndice N° 8).

Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Ingeniería de Operaciones de Facultad De Ciencias Agropecuarias Escuela Profesional De Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Nacional de Trujillo.

3.3.3. Síntesis de nanoandamios:

Los nanoandamios fueron sintetizados a partir del PHB producido en biorreactor y BG grado analítico (Mo-sci Corporation) (Anexo N° 1) el método escogido para la síntesis fue una combinación de técnicas de fundición de solvente y lixiviación salina.

Para lo cual se utilizaron diferentes cantidades de PHB y BG para obtener diferentes relaciones proporcionales según la siguiente tabla:

Tabla 1: Proporciones de PHB: BG para la síntesis de nanoandamios

BG	0,06 g	0,12 g	0,18 g
PHB			
0,6 g	0,6:0,06	0,6:0,12	0,6:0,18

Obteniéndose 3 proporciones para la síntesis, las cuales generaron 3 nanoandamios que fueron caracterizados para determinar las diferencias entre sus propiedades.

Para la síntesis se pesaron las cantidades indicadas anteriormente de PHB y BG en una balanza ultra analítica y se disolvieron en cloroformo con 6 % p/v sometiendo la mezcla a reflujo y agitación a 60°C durante 6 horas. Luego, se sonicaron durante 30 minutos usando un baño de sonicación, y posteriormente, la solución se vertió en un molde antiadherente de silicona con un lecho de partículas de cloruro de sodio tamizadas (250-300 µm) y la relación en peso de cloruro de sodio: polímero fue de 90:10. Posteriormente se evaporó el solvente con la ayuda de un horno a 40 °C durante 24 horas para que el disolvente se evapore por completo. Luego se enjuagó con agua ultrapura (conductividad menor a 0.05 µS/cm) para lixiviar la sal. Después del proceso lixiviación salina se obtuvo el armazón de polímero microporoso y luego se secó a 40 °C por 24 horas, finalmente los andamios obtenidos fueron conservados y almacenados en bolsas herméticas para la caracterización (35) (Apéndice N° 9).

3.3.4. Caracterización de Nanoandamios:

3.3.4.1. Caracterización estructural por microscopia electrónica de barrido

(SEM) y energía de dispersión de rayos X (EDS):

Previo a la caracterización estructural por SEM, se realizó un proceso de criofractura con nitrógeno líquido para sondear un área de sección transversal. Luego, las muestras se montaron en tocones de aluminio, y fueron recubiertos de carbono en un dispositivo de pulverización catódica, y luego se examinaron usando un microscopio electrónico TESCAN VEGA3 de barrido para el estudio de la estructura y distribución de los poros. Se tomaron imágenes SEM con varios aumentos y voltajes de aceleración (máx. De 5 kV) (36) (Apéndice N° 10).

Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Investigación Multidisciplinario de la Universidad Privada Antenor Orrego.

3.3.4.2. Caracterización estructural por difracción de rayos X (XRD):

Se utilizó la técnica de difracción de rayos X (XRD), los patrones de difracción fueron obtenidos con un difractómetro BRUKER modelo D8 Eco - ADVANCE, en configuración Bragg-Brentano 2θ con fuente de Cu- $k\alpha$ ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) y a un barrido $2(\theta) = 0.02^\circ$ (6) (Apéndice N° 11).

Este análisis fue realizado en el Laboratorio de Investigación Multidisciplinario de la Universidad Privada Antenor Orrego.

3.3.4.3. Caracterización estructural por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT -IR):

Las muestras obtenidas fueron sometidas a una identificación rápida por espectroscopia de infrarrojos usando un espectrómetro FT-IR con el modo de

Reflectancia Total Atenuada (ATR) (34). El rango espectral que se utilizó para analizar los nanoandamios estaba entre 4000 a 550 cm^{-1} . Se realizaron 16 escaneos con una resolución de 4 cm^{-1} . Los espectros resultantes se configuraron para mostrarse en % de Transmisión (35).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados:

4.1.1. Producción de PHB:

4.1.1.1. Tinción Sudan Black B y Nile Blue A:

Una vez realizada la coloración de Sudan Black B, se observaron gránulos color negro en el interior de las células bacterianas, los cuales indicaban la presencia de inclusiones con grupos funcionales éster en su estructura molecular (Apéndice N° 3). mediante la coloración de Nile Blue A, se confirmó que dichas inclusiones eran PHAs, al observarse bajo microscopia de fluorescencia, gránulos con aspecto anaranjado brillante (Apéndice N° 4).

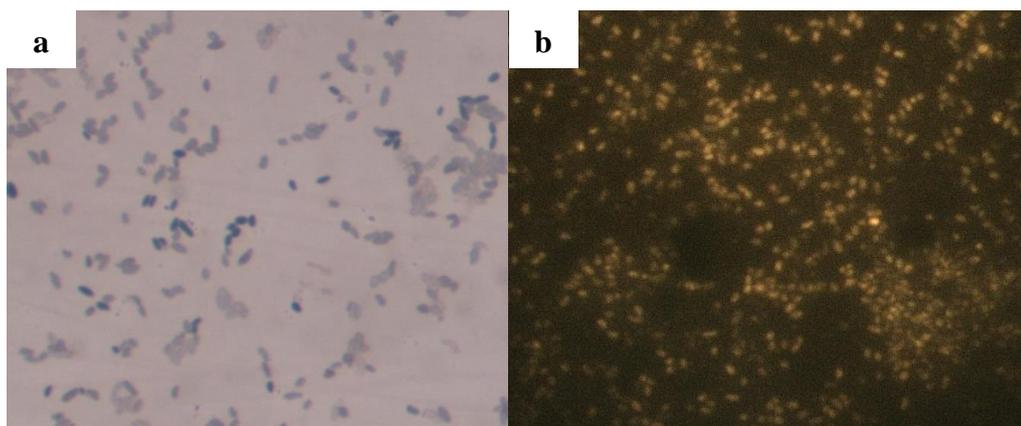


Figura 1: Observación microscópica de gránulos de PHB en bacterias halófilas con tinción Sudan Black B y Nile Blue A respectivamente a 1000X.

4.1.1.2. Caracterización morfológica de la cepa CH1:

- **Caracterización macroscópica:**

La cepa CH1 presentó un color crema, forma circular, elevación convexa y borde ondulado, superficie lisa y brillante.



Figura 2: Observación macroscópica de colonias de la cepa halófila CH1

- **Caracterización microscópica:**

La cepa CH1 presentó forma de bacilo corto Gram negativo, borde redondeado con un tamaño promedio de $3\ \mu\text{m} - 3.5\ \mu\text{m}$.

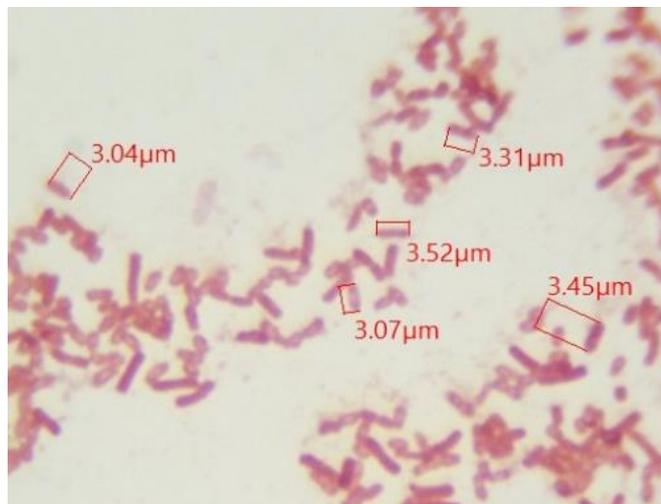


Figura 3: Observación microscópica de coloración Gram, en donde se observa la medida longitudinal cepa halófila CH1 a 1000X

4.1.1.3. Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriano y producción de PHB:

Se realizó la evaluación del peso seco (biomasa y PHB) y pH cada 6 horas en matraz, los resultados se presentan en la Tabla 2.

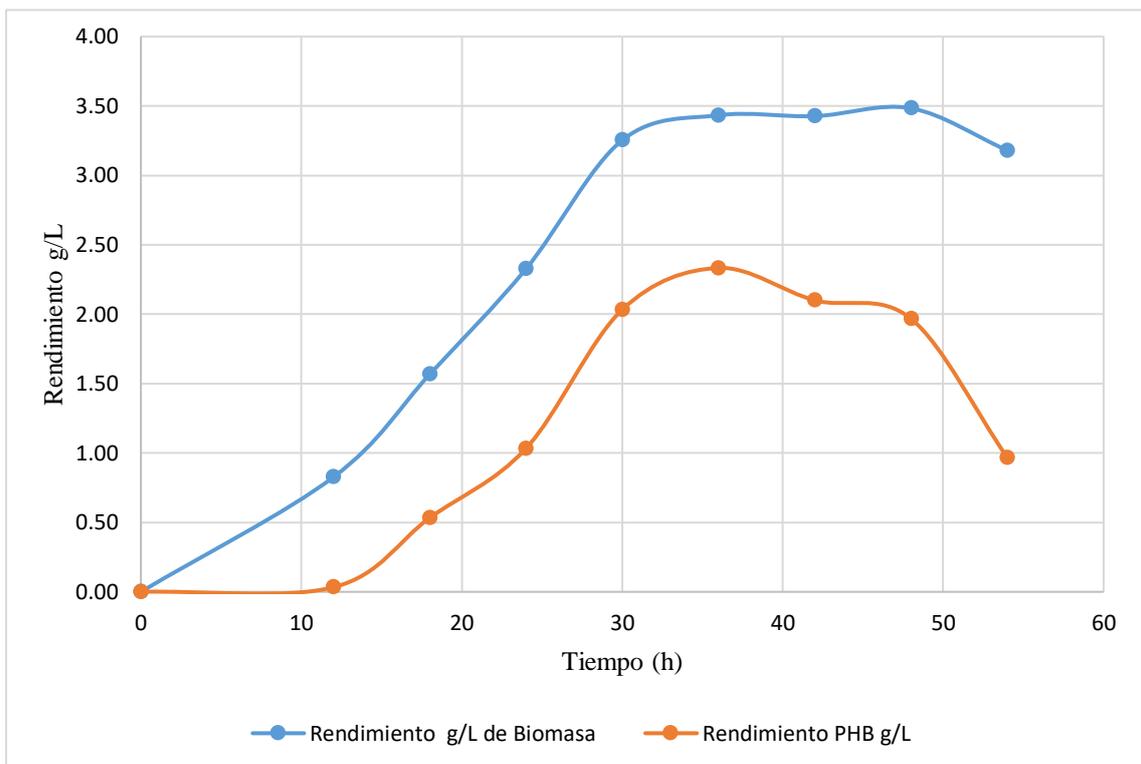
Tabla 2: Valores obtenidos durante cinética de crecimiento y producción de PHB de la cepa CH1

Punto	Tiempo (H)	Biomasa (30 mL)	Rendimiento Biomasa (g/L)	Rendimiento PHB (g/L)	pH
A0	0	0	0,00	0,00	8,5
A1	12	0,0248	0,83	0,033	6,7
A2	18	0,047	1,57	0,533	6,38
A3	24	0,0698	2,33	1,033	6,18
A4	30	0,0976	3,25	2,033	6,04
A5	36	0,103	3,43	2,333	5,42
A6	42	0,1028	3,43	2,100	5,29
A7	48	0,1045	3,48	1,967	5,02
A8	54	0,0954	3,18	0,967	4,52

En la figura 4 se observan las fases del crecimiento bacteriano por medio de la cuantificación del peso seco de la biomasa, en donde se aprecia la fase adaptativa durante las primeras horas de crecimiento, para posteriormente dar lugar a la fase exponencial comprendida entre las 12 y 30 horas. A partir de este punto se observó la fase estacionaria de crecimiento, hasta las 54 horas de incubación. El rendimiento promedio de biomasa

durante la fase estacionaria fue de 3.45 g/L. Del mismo modo en la figura 4 se observa la producción de PHB la cual se cuantificó por peso seco posterior a la extracción realizada a partir de la biomasa obtenida, se puede observar que la mayor acumulación se desarrolla durante las 36 y 54 horas, periodo que se corresponde con la fase estacionaria del crecimiento, alcanzando un promedio de acumulación de 2,1 g de PHB (Apéndice N° 5).

Figura 4: Curva de crecimiento y producción de PHB de la cepa halófila CH1



4.1.1.4. Producción de PHB en Biorreactor:

Se realizaron en total 6 bioprocesos batch, los resultados se describen en la Tabla 3.

Tabla 3: Fuentes de carbono en biorreactor y rendimientos obtenidos durante la producción de PHB.

N°	Fuente de C	Rendimiento Biomasa (g/L)	Rendimiento PHB (g/L)
1	Glucosa	3,20	1,80
2	Glucosa	3,15	1,72
3	Glucosa	3,20	1,78
4	Glucosa	3,15	1,60
5	Glucosa	3,25	1,82
6	Melaza	3,35	1,85

Al finalizar cada bioproceso, se observó un aumento en la turbidez del medio de cultivo y se observó la curva de crecimiento trazado por el equipo buglab en donde se diferenciaron las fases de exponencial y estacionaria del crecimiento (Anexo N° 4), luego de realizar el autoclavado y la centrifugación del medio de cultivo, la biomasa obtenida presentó un color rosado claro en los bioprocesos realizados con glucosa, por otro lado en el bioproceso en el que se utilizó melaza como fuente de carbono, ésta se tornó de un color marrón. Una vez realizada la extracción y lavado se obtuvo un sólido blanco el cual fue pulverizado y conservado en tubos herméticos. Se obtuvieron en total 10,57 gramos de PHB los cuales fueron utilizados para la caracterización del Biopolímero y la síntesis de nanoandamios (Apéndice N° 6).

4.1.2. Caracterización del PHB obtenido:

4.1.2.1. Caracterización de PHB obtenido por HPLC:

Para asegurar la linealidad del método se trazó la curva de calibración utilizando como estándar ácido polihidroxi-butírico grado analítico (Sigma-Aldrich). Para lo cual se utilizaron 13 puntos de calibración, se obtuvo un valor de $R^2=0,999$ (Anexo N° 2).

En el cromatograma Figura 5 se observa el pico 1 - PHB a los 17,857 minutos, el cual corresponde al tiempo de retención del ácido crotonico contenido en la fase móvil de H_2SO_4 0,1 N; a 210 nm (Anexo N° 3).

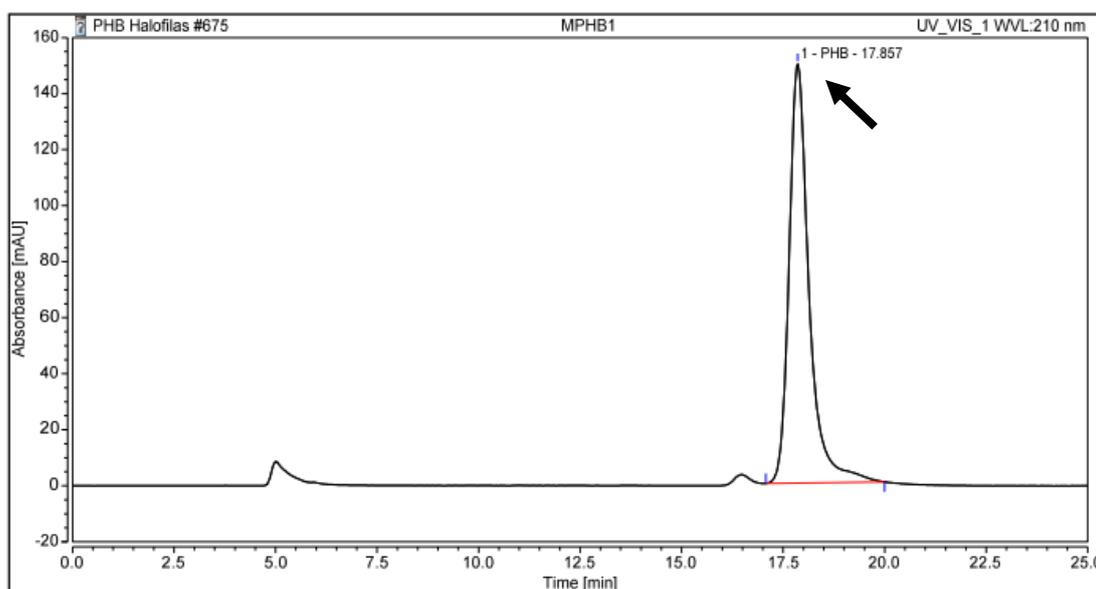


Figura 5: Cromatograma obtenido a partir del análisis de la muestra de PHB producido por la bacteria halófila CH1.

Se obtuvo un total de 1086,22 ng de ácido crotonico, el cual por medio del factor de conversión corresponde al 80% de la muestra utilizada correspondía a ácido crotonico (Apéndice N° 7).

4.1.2.2. Caracterización de PHB obtenido por ATR-FTIR:

Por medio de la técnica ATR-FTIR se analizó la estructura química del polímero obtenido (PHB - 1) a través de las vibraciones de los enlaces de los grupos funcionales. Para su identificación se estudiaron las bandas características del espectro obtenido (Figura 6).

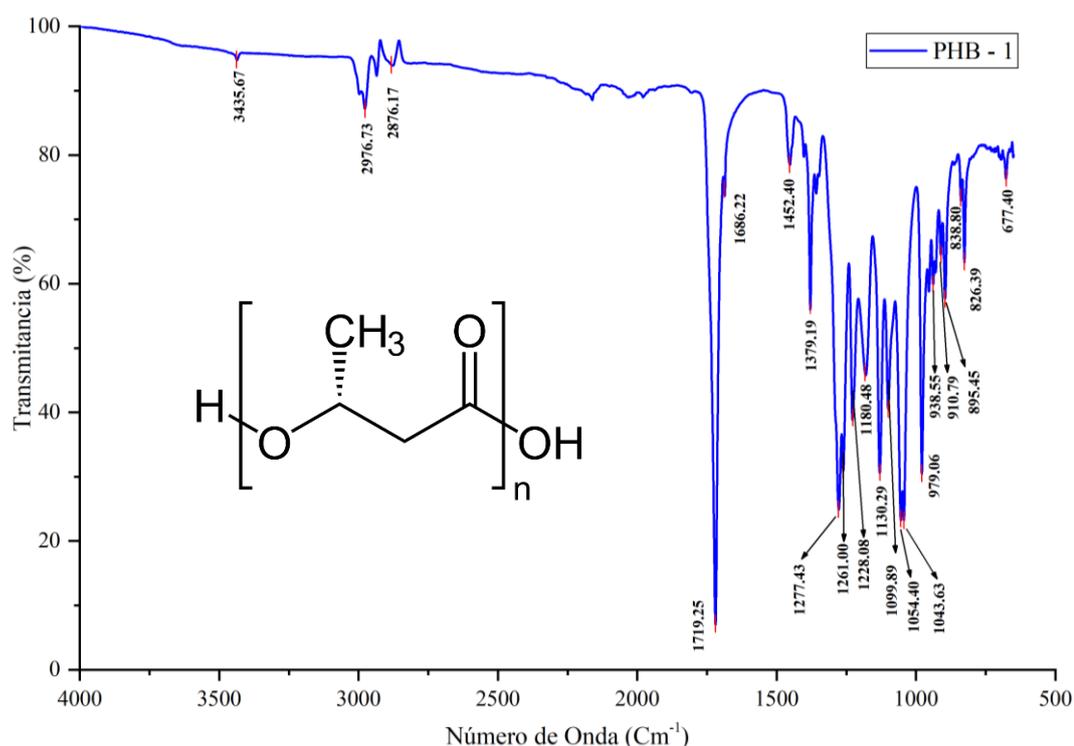


Figura 6: Espectro FT-IR (normalizado) obtenido a partir del análisis de la muestra de PHB producido por la bacteria halófila CH1.

Para constatar la naturaleza química del polímero obtenido se realizó una búsqueda espectral para su identificación mediante una comparación realizada con la librería de polímeros HR Hummel Polymer and Additives (Thermo Scientific), obteniéndose un alto porcentaje de similitud (96,06 %) con el Ácido 3 polihidroxibutírico. Los resultados de la búsqueda se muestran en la Figura 7.

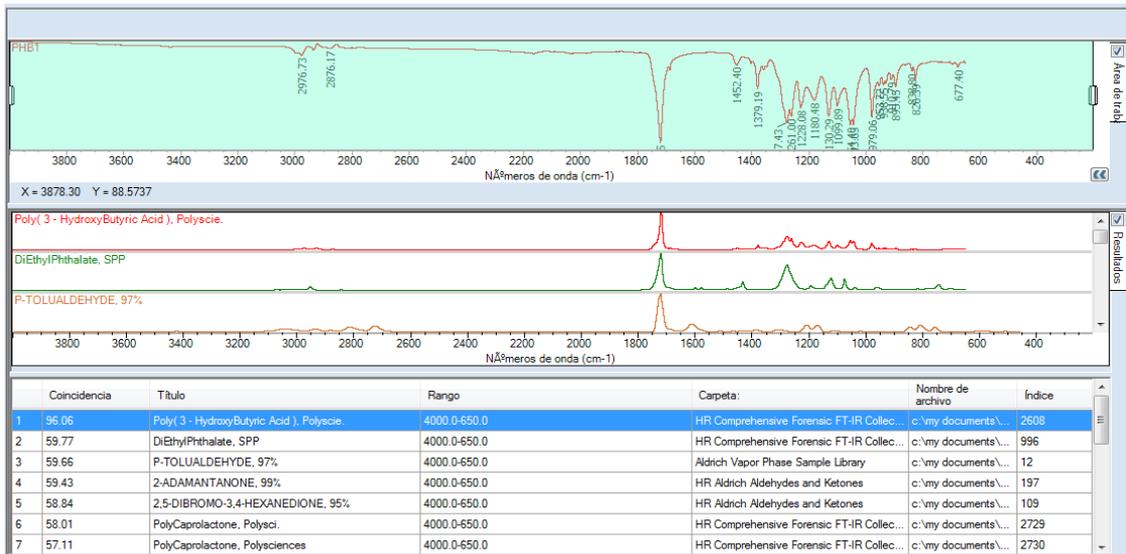


Figura 7: Reporte de búsqueda del espectro FT-IR a partir del análisis de la muestra de PHB producido por la bacteria halófila CH1.

4.1.3. Caracterización de nanoandamios:

4.1.3.1. Caracterización estructural SEM y EDS:

Por medio de la técnica de microscopia electrónica de barrido se obtuvieron micrografías (Anexos N° 5, N° 6 y N° 7), en las cuales se observó la estructura porosa de los andamios poliméricos, así como su composición elemental (Anexos N° 8, N° 9 y N° 10).

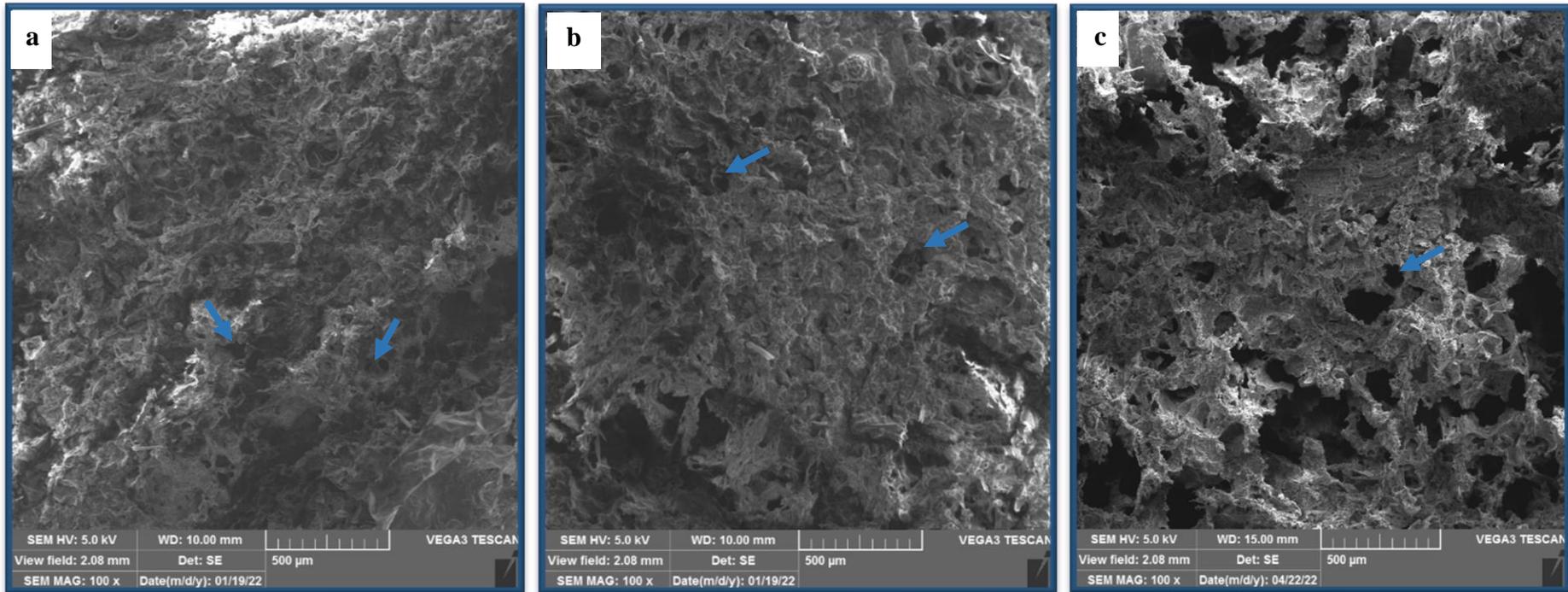
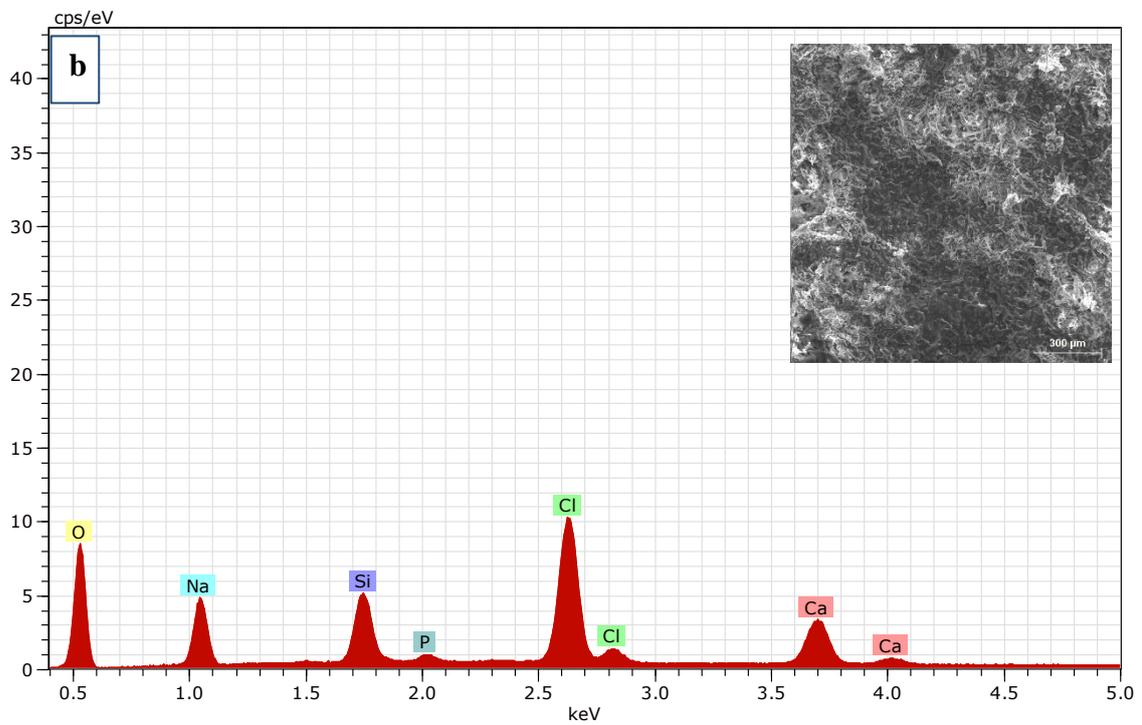
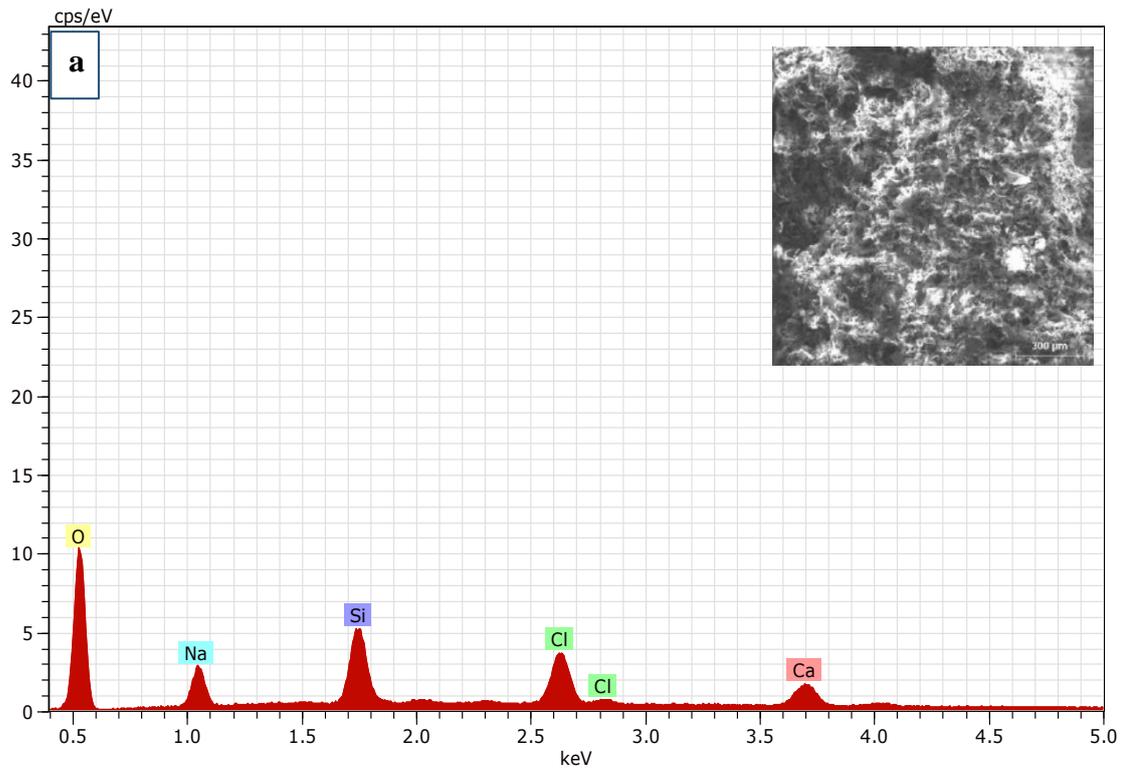


Figura 8: Micrografías SEM obtenidas de la de andamios poliméricos a 100X, en donde se aprecia la presencia de poros formados durante el proceso de lixiviación salina. a. proporción N°1 (PHB/BG=0.6/0.06); b. proporción N°2 (PHB/BG=0.6/0.12); c. proporción N°3 (PHB/BG=0.6/0.18)



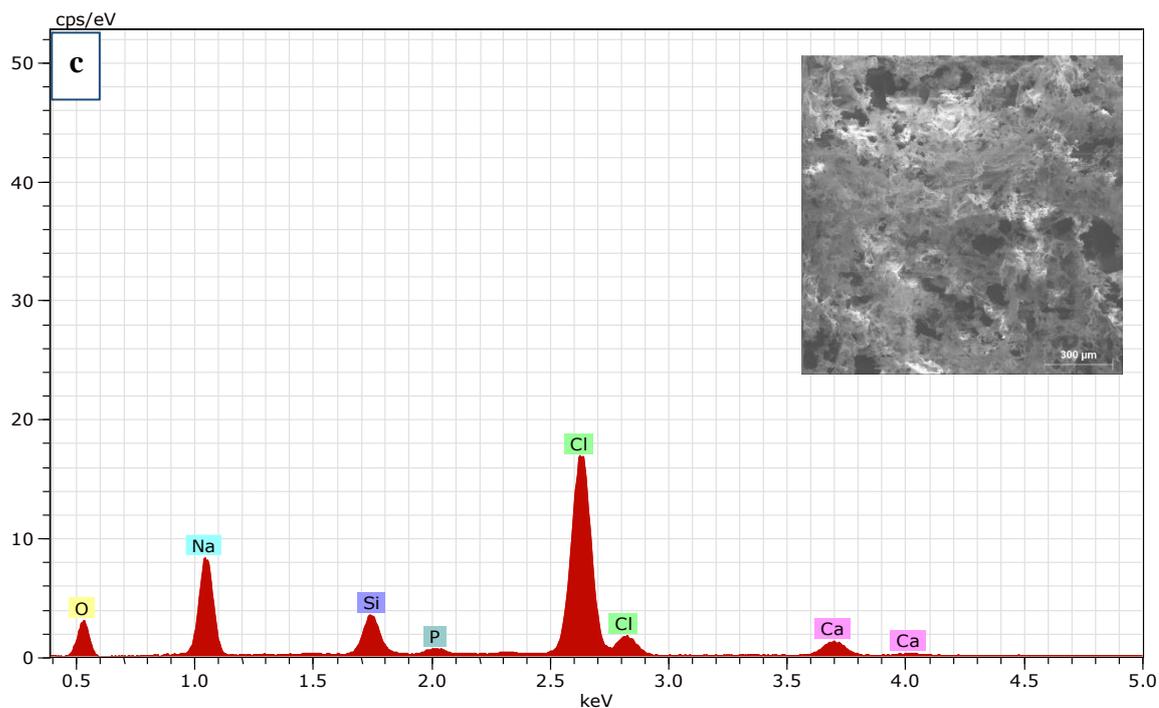


Figura 9: Análisis EDS del área superficial de los andamios poliméricos en donde se observa la presencia de los principales elementos de su composición. a. proporción N°1 (PHB/BG=0.6/0.06); b. proporción N°2 (PHB/BG=0.6/0.12); c. proporción N°3 (PHB/BG=0.6/0.18)

El análisis EDS muestra los principales elementos químicos que conforman a los nanoandamios, en el cual puede se observaron los picos característicos de calcio (Ca), silicio (Si), fósforo (P), oxígeno (O).

4.1.3.2. Caracterización estructural XRD:

Para evaluar el carácter amorfo o cristalino de los andamios poliméricos se realizó el análisis XRD, obteniéndose los difractogramas para el análisis e identificación de los picos más representativos de cristalinidad (Apéndice N° 11).

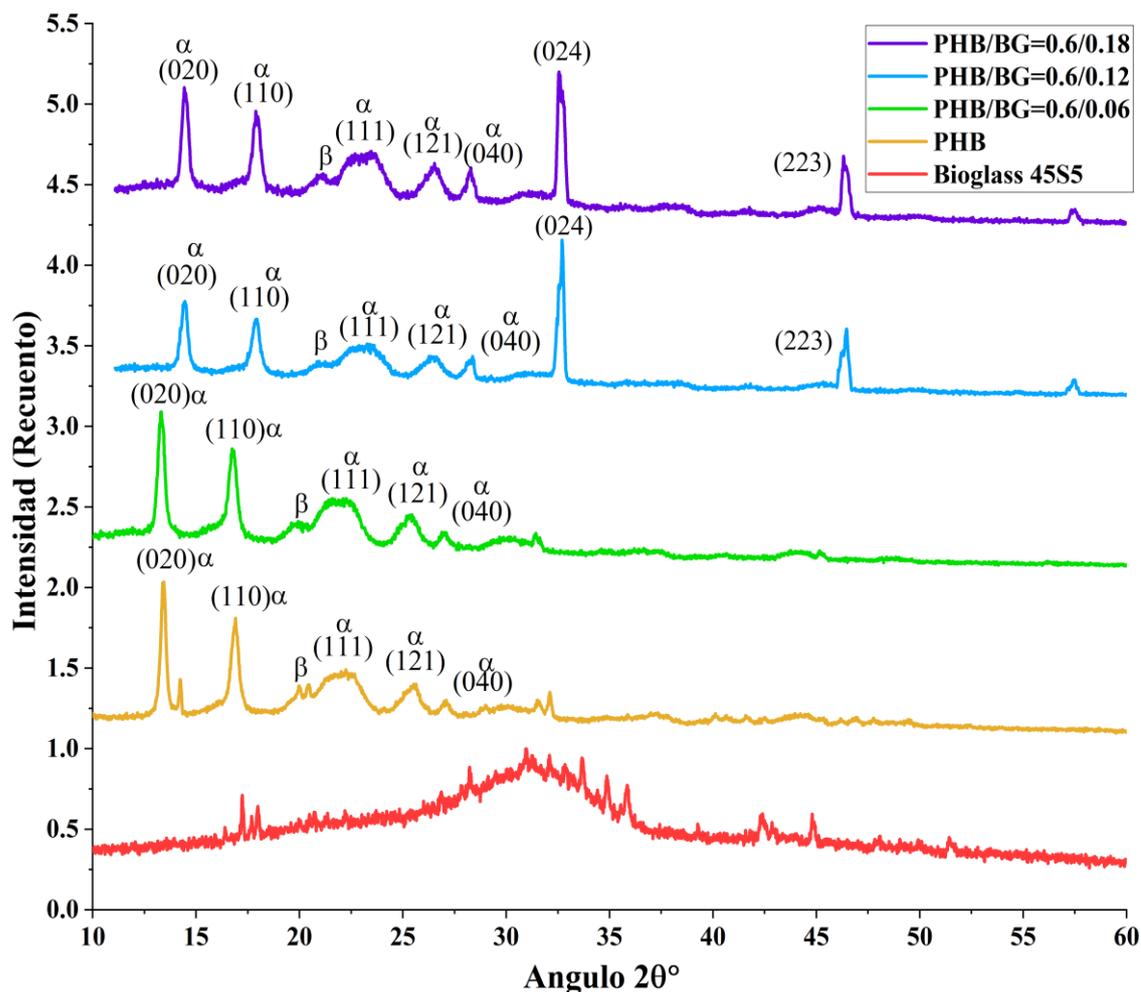


Figura 10: Espectros XRD obtenidos a partir del análisis de las muestras de andamios poliméricos, PHB y BG.

4.1.3.3. Caracterización estructural ATR-FTIR:

Por medio de la técnica ATR-FTIR se analizó la estructura química de los andamios obtenidos a través de las vibraciones de los enlaces de los grupos funcionales. Para su identificación se estudiaron las bandas características de los espectros obtenidos.

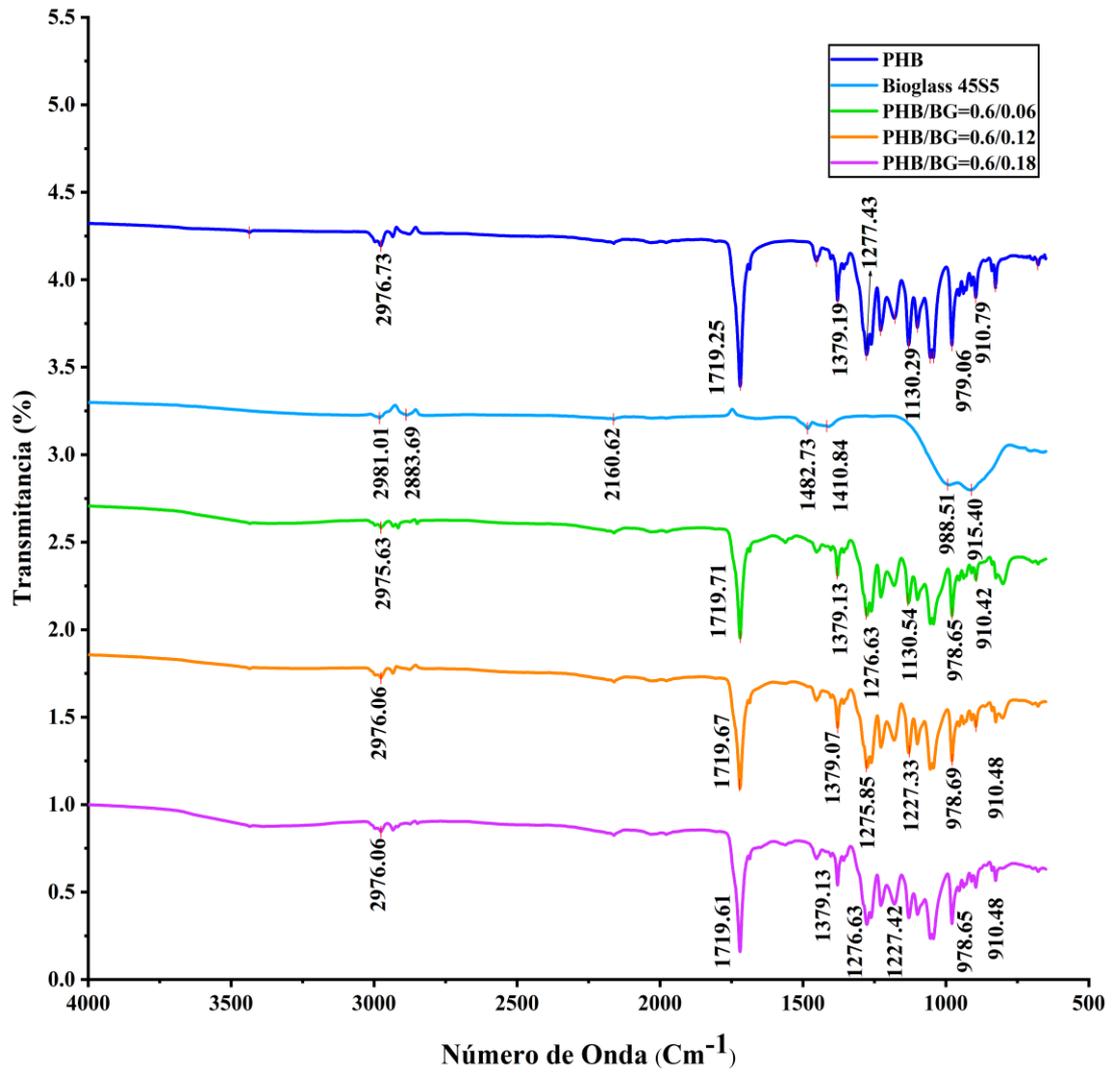


Figura 11: Espectros FT-IR obtenidos a partir del análisis de las muestras de andamios poliméricos.

4.2.Discusión:

En el proceso de producción de PHB por parte de la cepa codificada CH1 se utilizó un medio cuya relación C/N era de 20:1 la cual estimula su acumulación (37). Esto se confirmó por medio de las tinciones de Sudan Black B en donde se observó la presencia de inclusiones granulares de color negro (Figura 1) las cuales son el resultado de la adhesión del colorante a las inclusiones celulares que poseen el grupo éster (R-COOR') los cuales están presentes en la cadena de PHB (38); del mismo modo, en la tinción con Nile Blue A, se observaron inclusiones anaranjado brillante, resultado de la interacción del polímero con el colorante bajo el espectro de luz azul (460 nm) (29). Habiendo reactivado y comprobado la acumulación de PHB por parte de la cepa CH1, se procedió a realizar su caracterización morfológica de la cepa lo que permitió descartar posibles contaminaciones durante el proceso de reactivación por lo que continuó con el análisis de la cinética de crecimiento bacteriana y producción de PHB.

El análisis de la cinética de crecimiento bacteriana y producción de PHB, se realizó con el objetivo de determinar si la mayor acumulación de PHB se da durante la fase estacionaria como lo señalan algunos autores como Nygaard *et al* (39), durante el ensayo se observó que el inicio de la acumulación de PHB se desarrolló durante el inicio de la fase exponencial alcanzando sus puntos máximos durante la fase estacionaria (Figura 4), además es importante destacar que iniciada la fase de muerte se observó una caída considerable de la acumulación del PHB, por lo que para la producción en biorreactor se tuvo en cuenta este aspecto a fin de recuperar la máxima cantidad del polímero durante la producción. La mayor acumulación de PHB se observó a las 36 horas de iniciada la cinética de crecimiento (2,33 g/L), en donde además el rendimiento de biomasa fue el mayor (3.43 g/L), por lo que el porcentaje de acumulación de PHB representó

aproximadamente el 68 % del peso de la biomasa. Si bien el rendimiento de biomasa se mantuvo hasta las 42 horas se observó una ligera disminución en la acumulación de PHB (2,10 g/L). Teniendo esto en cuenta se estableció la fase estacionaria como la mejor fase de crecimiento para la recuperación de PHB.

Para la producción de PHB en biorreactor se utilizó como fuentes de carbono a la glucosa y melaza las cuales por medio del metabolismo microbiano se transformaron en el polímero. Los rendimientos obtenidos para cada bioproceso oscilaron entre 3,15 y 3,25 g/L de biomasa, con un porcentaje de acumulación entre el 55-60 % de PHB. Durante la producción se diferenciaron la fase exponencial y estacionaria, y además se observó una acidificación del medio de cultivo producto del metabolismo microbiano, siendo compensado por medio de la incorporación de NaOH 5N. Una vez finalizada la producción se procedió a recuperar la biomasa para el proceso de extracción de PHB. Para una adecuada extracción se molió la biomasa hasta obtener un polvo de aspecto homogéneo el cual se trató con hipoclorito de sodio comercial para la obtención del biopolímero, este sólido poseía un color blanco para los bioprocesos realizados con glucosa y un aspecto marrón claro para la fermentación realizada con melaza.

Para su identificación el polímero obtenido se usó de la técnica de HPLC para determinar su naturaleza química al compararlo con un estándar de ácido polihidroxibutírico, en el cromatograma presentado en la Figura 5, se observa una señal con un tiempo de retención de 17,85 minutos (Figura 5) lo que confirmaría la presencia de ácido crotónico en la fase móvil, el cual procedería de la digestión ácida del PHB con H₂SO₄ concentrado. Estos resultados son similares a los obtenidos por Duvigneau *et al* en donde se estandarizó un método rápido y económico para la determinación de

fracciones monoméricas en poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), el cual posee una naturaleza química similar al PHB, por medio de la técnica de HPLC (40).

En el análisis FT-IR se observó una banda a 1719 cm^{-1} , correspondiente a la extensión del grupo carbonilo (C=O) de la unión éster (R-COOR'), dicha banda tiene un valor muy cercano al obtenido en el análisis reportado por Sindhu *et al* (1722 cm^{-1}), en donde se analizó un estándar de PHB de Sigma (41). Las bandas a 2976 y 2876 cm^{-1} indican corresponden a los modos de estiramiento asimétrico y simétrico de CH_3 y CH_2 (42), con su banda de confirmación obtenida a 1379 cm^{-1} la cual asigna al movimiento simétrico de los grupos CH_3 y la banda de confirmación obtenida a 1452 cm^{-1} corresponde al grupo $-\text{CH}_2$, ya que esta posee una deformación asimétrica presente de los enlaces C-H presentes en la molécula, por otro lado, la banda encontrada a 1277 cm^{-1} corresponde al grupo $-\text{CH}$, la banda obtenida a 1228 cm^{-1} es asignada a la conformación helicoidal, además los valores 1180 y 1130 cm^{-1} son bandas características de la vibración simétrica del grupo C-O-C, las bandas restantes comprendidas entre 1054 y 1300 cm^{-1} son bandas de confirmación del grupo éster presente en los PHA, ya que corresponden a la vibración del enlace C-O, por último se encontró una banda a 3435 cm^{-1} correspondiente al enlace O-H libre el cual se asigna al contenido de agua libre en la muestra (hidratación). Es importante resaltar que las bandas por encima de 3400 cm^{-1} no son pronunciadas por lo que se puede concluir que el polímero obtenido posee un bajo nivel de hidratación (43), además al realizar la búsqueda espectral se observó un alto porcentaje de coincidencia con el polímero de la biblioteca del equipo (Figura 7), este elevado porcentaje de coincidencia y las bandas obtenidas a diferentes números de onda, son fundamentales para determinar que el biopolímero obtenido tiene las mismas propiedades químicas a nivel de sus grupos funcionales, lo que indica la presencia PHB.

Durante el proceso de síntesis se observó la disolución completa del polímero en el solvente, formando una suspensión de aspecto homogéneo. Para el caso de las 2 primeras proporciones se observó una dilución completa de los precursores (PHB y BG) ya que no hubo ningún tipo de precipitado en el fondo del balón al finalizar el tiempo de síntesis (6 h). Por otro lado, en la proporción N° 3 se observó la presencia de un pequeño precipitado, el cual corresponde al BG que no se disolvió, esto debido a la saturación de la solución. Es importante destacar este hecho debido a que la incorporación del BG en la estructura del PHB es necesaria para que el nanoandamio cumpla su función en la regeneración de tejidos (44).

En la caracterización SEM se observó la formación de los poros producto del proceso de lixiviación salina, sin embargo, su distribución no es homogénea debido a que durante la incorporación de la disolución en el lecho salino la ubicación de los cristales de cloruro de sodio es aleatoria. Además, es importante resaltar que el tamaño de poro se controló a través del tamizado del cloruro de sodio con lo cual se obtuvo un tamaño esperado (150 - 250 μm) (Apéndice N° 9). En el análisis EDS se observó los elementos que componían los nanoandamios, podemos resaltar la presencia de silicio, calcio, fósforo y sodio los cuales son los componentes principales del BG y que teniendo esto en cuenta comprobó que el BG se incorporó a la estructura del PHB. Durante este análisis también observó un pico de cloro, el cual procede del solvente utilizado durante el proceso de síntesis, por lo que en futuras investigaciones se puede evaluar la utilización de solventes no halogenados para dicho proceso.

En el análisis XRD de los andamios poliméricos se pueden apreciar los picos característicos de cristalinidad del PHB y el carácter amorfo del BG. Los picos cuyos índices de Miller corresponden a (020), (110), (111), (040), son característicos de una

estructura molecular con disposición ortorrómbica tal y como lo describe Chernozem R. *et al* (45), la cual no se ve modificada durante el incremento progresivo del BG durante la síntesis. En la segunda y tercera proporción se observa un desplazamiento del pico 020 de 13° hacia la derecha lo que indica una reducción de la distancia interplanar de la celda unitaria, además se observa la formación de un pico por debajo de los 35° el cual puede ser resultado de la introducción del BG en la estructura del PHB (Figura 10) tal y como lo describe Montazeri M. *et al* (46). Durante el análisis de los difractogramas también se pudo observar que las conformaciones α y β de la estructura ortorrómbica se presentaron al mismo tiempo durante los diferentes procesos de síntesis (47). Los resultados obtenidos en el análisis XRD permiten concluir que a partir de la Proporción N° 2 existe una buena integración del BG en la estructura del PHB.

El análisis de los espectros FT-IR muestra la presencia de los picos característicos del PHB con ligeras variaciones que indican la interacción del PHB con el BG; sin embargo, no se observan diferencias significativas en relación a los espectros obtenidos de los precursores, esto es debido a que la composición de los nanoandamios es mayoritariamente PHB por lo que no se observó variaciones en las vibraciones características de los enlaces del PHB.

Una de las limitaciones más importantes de este trabajo fue la imposibilidad de caracterizar mecánicamente a los nanoandamios, debido a la falta de equipamiento especializado para este tipo de análisis, evaluar este tipo de propiedades hubiera permitido conocer más a fondo el comportamiento de las nanoestructuras en condiciones de estrés físico.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones:

Los nanoandamios producidos con polihidroxitirato y modificados con bioglass a las tres diferentes proporciones, se caracterizan por poseer una elevada porosidad, un comportamiento cristalino de su estructura molecular y la buena incorporación del biocristal en la estructura química del polihidroxitirato.

El polihidroxitirato producido tiene un porcentaje de coincidencia molecular del 96%, respecto al estándar de ácido -3- polihidroxitirico.

Se sintetizaron nanoandamios a las proporciones de polihidroxitirato: bioglass de 0,6:0,06; 0,6:0,12; 0,6:0,18.

La proporción de polihidroxitirato: bioglass, que otorga las mejores propiedades estructurales y químicas durante la síntesis de nanoandamios fue la proporción N°2 (PHB:BG=0,6:0,12).

5.2.Recomendaciones:

Para incrementar el rendimiento durante la producción de PHB, en futuras investigaciones, se debe considerar realizar bioprocesos que involucren sistemas de fermentación por lote alimentado (Fed batch) o continuo.

Durante el proceso de extracción de PHB puede evaluar la incorporación de técnicas que no involucren el uso de compuestos nocivos para el medio ambiente (hipoclorito), como extracción enzimática o procesos fisicoquímicos (shock térmico)

Durante el proceso de síntesis se debe implementar el uso de solventes no halogenados con el objetivo de evitar la presencia de elementos residuales en las nanoestructuras sintetizadas.

Es importante evaluar otros parámetros durante la síntesis como la temperatura, velocidad de enfriamiento, los cuales podrían influir en las propiedades cristalinas de los nanoandamios.

Se pueden tener en cuenta otros métodos de síntesis que permitan un mayor control sobre la síntesis de las estructuras tridimensionales como la impresión 3D.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Kohrs NJ, Liyanage T, Venkatesan N, Najarzadeh A, Puleo DA. Drug delivery systems and controlled release [Internet]. Vols. 1–3, Encyclopedia of Biomedical Engineering. Elsevier Inc.; 2019. 316–329 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11037-2>
2. Elsevier Science (Firm). Biomaterials. [Internet]. Elsevier Science Pub. Co; 2019 [citado el 15 de junio de 2019]. Disponible en: <https://www.journals.elsevier.com/biomaterials>
3. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact Mater* [Internet]. septiembre de 2018;3(3):278–314. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X17300397>
4. Al Rowaihi IS, Paillier A, Rasul S, Karan R, Grötzinger SW, Takanabe K, et al. Poly(3-hydroxybutyrate) production in an integrated electromicrobial setup: Investigation under stress-inducing conditions. Koller M, editor. *PLoS One* [Internet]. el 26 de abril de 2018;13(4):e0196079. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0196079>
5. Mai EY, Yu Z. *Polymer nanocomposites* [Internet]. 1st ed. Woodhead Publishing; 2006. 578 p. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/polymer-nanocomposites/mai/978-1-85573-969-7>
6. Fathi MH, Doostmohammadi A. Bioactive glass nanopowder and bioglass coating for biocompatibility improvement of metallic implant. *J Mater Process Technol* [Internet]. febrero de 2009;209(3):1385–91. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/223784796_Bioactive_Glass_Nanopowder_and_Bioglass_Coating_for_Biocompatibility_Improvement_of_Metalic_Imp

lant

7. Nardo T, Carmagnola I, Ruini F, Caddeo S, Calzone S, Chiono V, et al. Synthetic Biomaterial for Regenerative Medicine Applications [Internet]. *Kidney Transplantation, Bioengineering, and Regeneration: Kidney Transplantation in the Regenerative Medicine Era*. Elsevier Inc.; 2017. 901–921 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801734-0.00065-5>
8. Jafari M, Paknejad Z, Rad MR, Motamedian SR, Eghbal MJ, Nadjmi N, et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater* [Internet]. 2017;105(2):431–59. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26496456/>
9. Dos Santos AJ, Oliveira Dalla Valentina LV, Hidalgo Schulz AA, Tomaz Duarte MA. From Obtaining to Degradation of PHB:Material Properties. Part I. *Ing y Cienc* [Internet]. el 14 de noviembre de 2017;13(26):269–98. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v13n26/1794-9165-ince-13-26-00269.pdf>
10. González García Y, Meza Contreras JC, González Reynoso O, Córdova López JA. Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: Plásticos de origen microbiano [Internet]. Vol. 29, *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 2013. p. 77–115. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007
11. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater Today* [Internet]. 2004;7(5):30–40. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702104002330>
12. Livingston T, Ducheyne P, Garino J. In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* [Internet]. octubre de 2002;62(1):1–

13. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12124781/>
13. Rathbone S, Furrer P, Lübben J, Zinn M, Cartmell S. Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *J Biomed Mater Res - Part A* [Internet]. el 15 de junio de 2010;93(4):1391–403. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19911384/>
14. Bugnicourt E, Cinelli P, Lazzeri A, Alvarez V. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polym Lett* [Internet]. 2014;8(11):791–808. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/265845019_Polyhydroxyalkanoate_PHA_Review_of_synthesis_characteristics_processing_and_potential_applications_in_packaging
15. M Visakh P IR. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Based Blends , Composites and Nanocomposites Series Editors : Titles in the Series : [Internet]. 2015. 248 p. Disponible en: <https://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-1-84973-946-7>
16. Curiá Chíncoa A. Vidrios bioactivos para la fabricación de scaffolds en la regeneración del tejido óseo [Internet]. 2011. Disponible en: http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ANA_CURIA_CHINCOA.pdf
17. Jones JR. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomater* [Internet]. septiembre de 2015;23(S):S53–82. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26235346/>
18. Fernández HC, Ledea Lozano OE. Determinacion de la bioactividad y la resistencia a la compresion de bloques de poliatatita®. *Quim Nova* [Internet]. 2010;33(4):891–4. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/qn/a/3jsTMYPS6sGZ3LpYwgTxQVx/?lang=es>
19. Saranya N, Saravanan S, Moorthi A, Ramyakrishna B, Selvamurugan N. Enhanced

- osteoblast adhesion on polymeric nano-scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. 2011;7(2):238–44. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21702361/>
20. Qiaoping Chen, Judith A. Roether ARB. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. En: *Topics in Tissue Engineering Volumen 4* [Internet]. 2008. p. 27. Disponible en: https://www.oulu.fi/spareparts/ebook_topics_in_t_e_vol4/abstracts/q_chen.pdf
 21. N Hegde DM, Attavar DS, N DS. Bioactive Materials A Review. *Int J Adv Sci Tech Res* [Internet]. 2017;6(7):0–7. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321271169_BIOACTIVE_MATERIAL_S_-_A_REVIEW
 22. Paleos G a . What is Biocompatibility? *Pittsburgh Plast Manuf.* 2012;510.
 23. Kershaw DPJ. Biodegradable Plastics and Marine Litter. Misconceptions, concerns and impacts on marine environments. United Nations Environment Programme [Internet]. 2015. 32 p. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/294873728_Biodegradable_plastics_and_marine_litter_misconceptionsconcerns_and_impacts_on_marine_environments
 24. Ferraz MP, Monteiro FJ, Manuel CM. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. *J Appl Biomater Biomech* [Internet]. 2003;2(2):74–80. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/228080000400200202>
 25. Dawes EA, Senior PJ. The Role and Regulation of Energy Reserve Polymers in Micro-organisms. En: *Advances in Microbial Physiology* [Internet]. 1973. p. 135–266. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065291108600880>

26. Merck. Microbiology Manual. Unitech Commun Faisalabad. 2000;
27. Wei Y-H, Chen W-C, Huang C-K, Wu H-S, Sun Y-M, Lo C-W, et al. Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate-Producing Strains from Indigenous Isolate *Cupriavidus taiwanensis* Strains. *Int J Mol Sci* [Internet]. el 5 de enero de 2011;12(1):252–65. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/12/1/252>
28. Burdon KL. Fatty Material in Bacteria and Fungi Revealed by Staining Dried, Fixed Slide Preparations. *J Bacteriol* [Internet]. diciembre de 1946;52(6):665–78. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC518253/>
29. Ostle AG, Holt JG. Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. julio de 1982;44(1):238–41. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.44.1.238-241.1982>
30. Tan D, Xue Y-S, Aibaidula G, Chen G-Q. Unsterile and continuous production of polyhydroxybutyrate by *Halomonas* TD01. *Bioresour Technol* [Internet]. septiembre de 2011;102(17):8130–6. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096085241100753X>
31. Berger E, Ramsay BA, Ramsay JA, Chavarie C, Braunegg G. PHB recovery by hypochlorite digestion of non-PHB biomass. *Biotechnol Tech* [Internet]. abril de 1989;3(4):227–32. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/BF01876053>
32. Aramvash A, Moazzeni Zavareh F, Gholami Banadkuki N. Comparison of different solvents for extraction of polyhydroxybutyrate from *Cupriavidus necator*. *Eng Life Sci* [Internet]. enero de 2018;18(1):20–8. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elsc.201700102>
33. Díaz-Barrera A, Andler R, Martínez I, Peña C. Poly-3-hydroxybutyrate production by *Azotobacter vinelandii* strains in batch cultures at different oxygen transfer rates. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. abril de 2016;91(4):1063–71.

Disponibile en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.4684>

34. Helm D. Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. el 1 de febrero de 1995;126(1):75–9. Disponible en: [http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097\(94\)00529-Z](http://doi.wiley.com/10.1016/0378-1097(94)00529-Z)
35. Hajiali H, Karbasi S, Hosseinalipour M, Rezaie HR. Preparation of a novel biodegradable nanocomposite scaffold based on poly (3-hydroxybutyrate)/bioglass nanoparticles for bone tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. el 7 de julio de 2010;21(7):2125–32. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-010-4075-8>
36. Cai Z, Cheng G. Novel method to produce poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds with controlled multi-pore size. *J Mater Sci Lett* [Internet]. 2003;22(2):153–5. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1021891626262?noAccess=true>
37. Zhou W, Colpa DI, Geurkink B, Euverink GJW, Krooneman J. The impact of carbon to nitrogen ratios and pH on the microbial prevalence and polyhydroxybutyrate production levels using a mixed microbial starter culture. *Sci Total Environ* [Internet]. 2022;811:152341. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152341>
38. Susianingsih E, Kadriah IAK, Nurhidayah. Screening and isolation of PHB (Poly- β -hydroxybutyrate) producing bacteria as an alternative material for disease prevention on the shrimp culture. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* [Internet]. el 1 de septiembre de 2020;564(1):012053. Disponible en: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/564/1/012053>
39. Nygaard D, Yashchuk O, Nosedá DG, Araoz B, Hermida ÉB. Improved fermentation strategies in a biorreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate)

- (PHB) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose. *Heliyon* [Internet]. enero de 2021;7(1):e05979. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405844021000840>
40. Duvigneau S, Kettner A, Carius L, Griehl C, Findeisen R, Kienle A. Fast, inexpensive, and reliable HPLC method to determine monomer fractions in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. el 20 de junio de 2021;105(11):4743–9. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/s00253-021-11265-3>
41. Sindhu R, Ammu B, Binod P, Deepthi SK, Ramachandran KB, Soccol CR, et al. Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers. *Brazilian Arch Biol Technol* [Internet]. agosto de 2011;54(4):783–94. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132011000400019&lng=en&tlng=en
42. Kamnev AA, Tugarova A V., Dyatlova YA, Tarantilis PA, Grigoryeva OP, Fainleib AM, et al. Methodological effects in Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Implications for structural analyses of biomacromolecular samples. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc* [Internet]. 2018;193:558–64. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.12.051>
43. Sabarinathan D, Chandrika SP, Venkatraman P, Easwaran M, Sureka CS, Preethi K. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) from *Pseudomonas plecoglossicida* and its application towards cancer detection. *Informatics Med Unlocked* [Internet]. 2018;11(March):61–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.imu.2018.04.009>
44. Parvizifard M, Karbasi S. Physical, mechanical and biological performance of

- PHB-Chitosan/MWCNTs nanocomposite coating deposited on bioglass based scaffold: Potential application in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;152:645–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.266>
45. Chernozem RV, Guselnikova O, Surmeneva MA, Postnikov PS, Abalymov AA, Parakhonskiy BV, et al. Diazonium chemistry surface treatment of piezoelectric polyhydroxybutyrate scaffolds for enhanced osteoblastic cell growth. *Appl Mater Today* [Internet]. septiembre de 2020;20(September):100758. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352940720302067>
46. Montazeri M, Karbasi S, Foroughi MR, Monshi A, Ebrahimi-Kahrizsangi R. Evaluation of mechanical property and bioactivity of nano-bioglass 45S5 scaffold coated with poly-3-hydroxybutyrate. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. febrero de 2015;26(2):62. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s10856-014-5369-z>
47. Sanhueza C, Acevedo F, Rocha S, Villegas P, Seeger M, Navia R. Polyhydroxyalkanoates as biomaterial for electrospun scaffolds. *Int J Biol Macromol* [Internet]. marzo de 2019;124:102–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.068>

APÉNDICES

Apéndice N° 1: Composición del medio MMG para fermentación y cultivo en placa

La producción de PHB se realizó con el medio MM-G el cual tiene la siguiente composición:

Medio MM-G (pH 8,5):

Componente	Cantidad (para 1L)
NaCl	100 g
Extracto de Levadura	1 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2.47 g
Na ₂ HPO ₄	0.794 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.394 g
Glucosa	20 g
Agar	30 g
Solución elementos traza 1	10 mL
Solución elementos traza 2	1 mL
NaOH	5 mL

Solución elementos Traza 1(Solvente HCl 1M):

Componente	Cantidad (para 1L)
Fe (III)-NH ₄ -Citrate	5 g
CaCl ₂	2 g

Solución elementos traza 2(Solvente HCl 1M):

Componente	Cantidad (para 1L)
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,1
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,03
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,2
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,01
NiCl ₂ *6H ₂ O	0,02
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,03

Nota:

- El agar solo se utiliza si se realizaran ensayos en medios sólidos.

Apéndice N° 2: Reactivación de la cepa halófila CHI.



Figura 12: Cepas halófilas conservadas en glicerol



Figura 13: Reactivación de las cepa CHI en caldo nutritivo modificado

Apéndice N° 3: Tinción Sudan Black B.

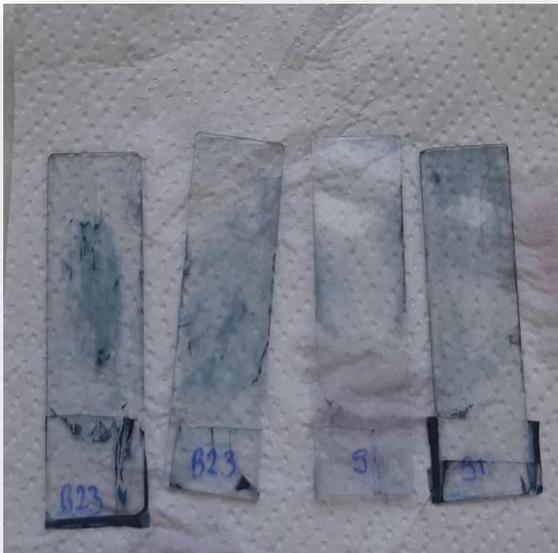


Figura 14: Laminas fijadas y coloreadas con Sudan Black B

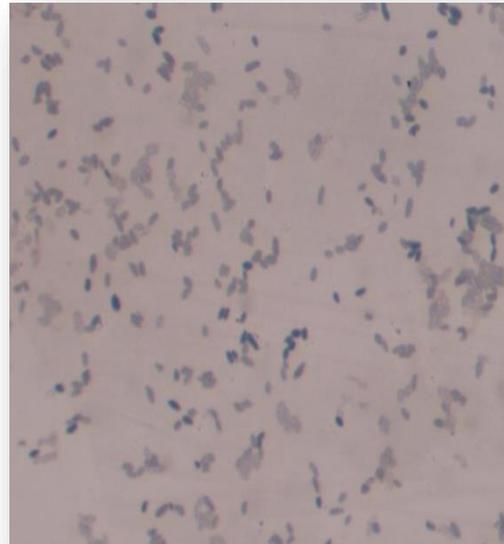


Figura 15: Observación microscópica de la tinción con Sudan Black B a 1000x

Apéndice N° 4: Tinción Nile Blue A.



Figura 16: Microscopio de fluorescencia marca AMSCOPE

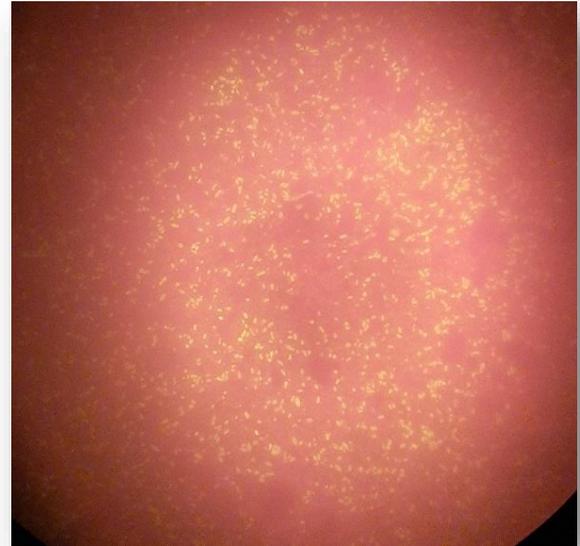


Figura 17: Observación microscópica de la tinción con Nile Blue A. a 1000 x

Apéndice N° 5: Evaluación de la cinética de crecimiento bacteriana y producción de PHB.

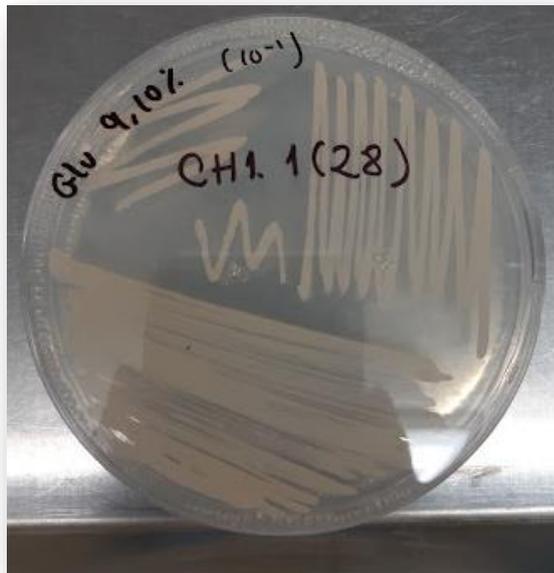


Figura 18: Cultivo joven de la cepa halófila CH1 (24 h) utilizado para el análisis de la cinética de crecimiento y producción de PHB

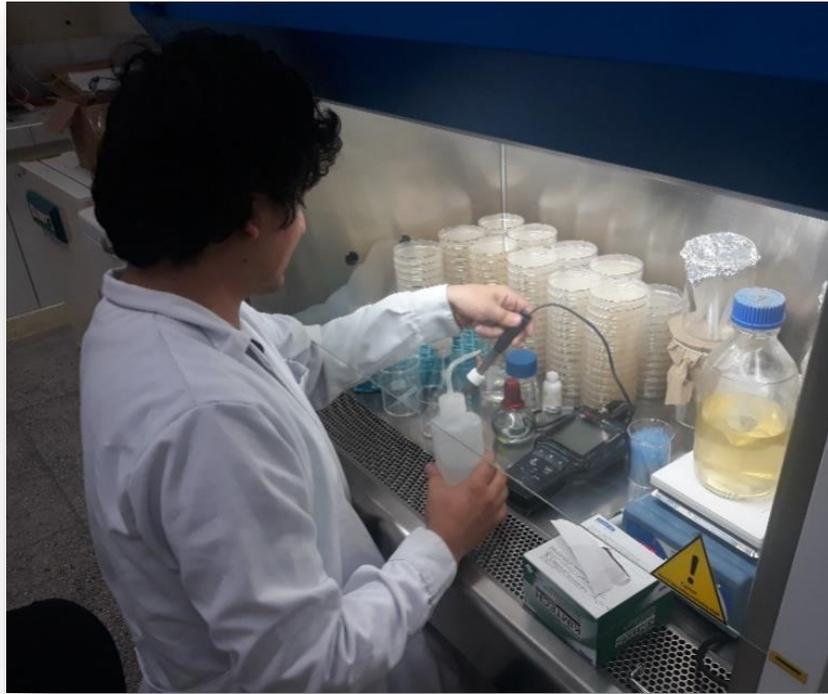


Figura 19: Ajuste de pH del medio de cultivo utilizado en la cinética de crecimiento y producción de PHB

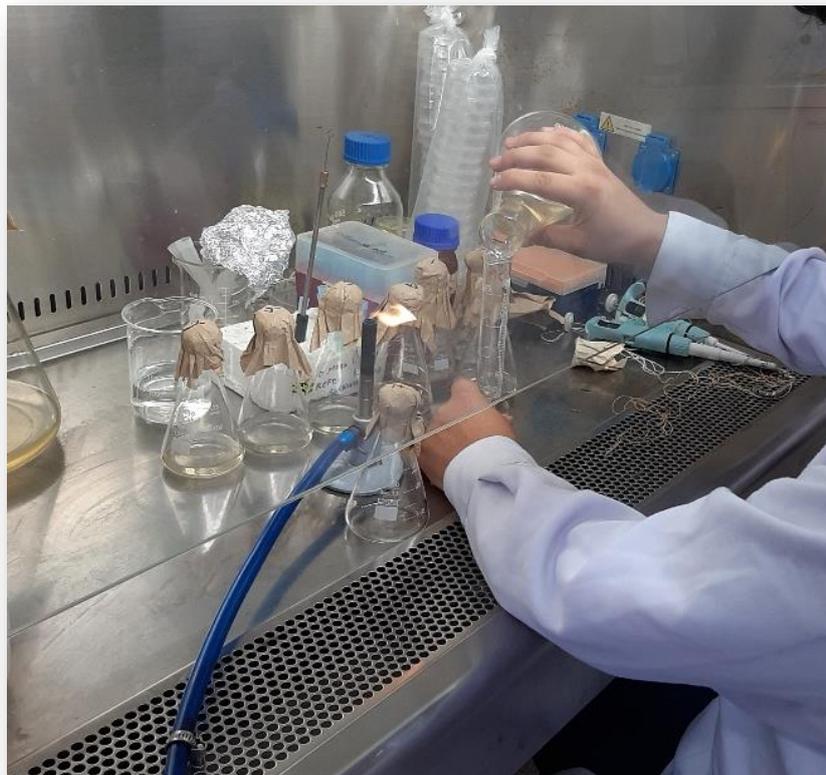


Figura 20: Servido del medio de cultivo utilizado en la cinética de crecimiento y producción de PHB



Figura 21: Incubación en shaker orbital de matraces.

Apéndice N° 6: Producción de PHB en Biorreactor.

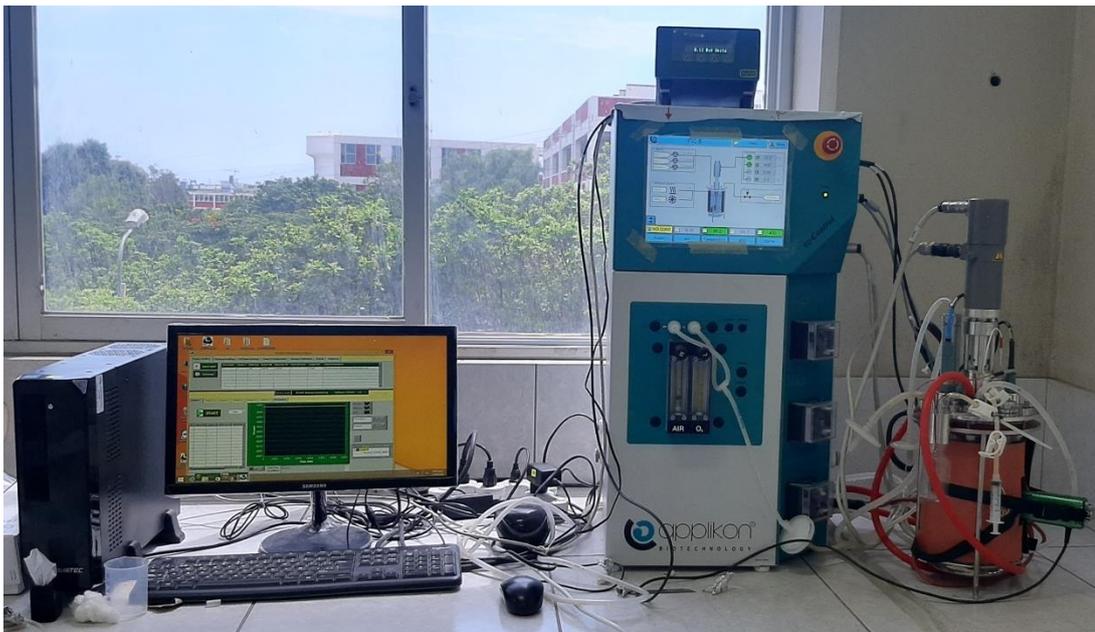


Figura 22: Biorreactor de la marca Applikon Biotechnology utilizado para la producción de PHB

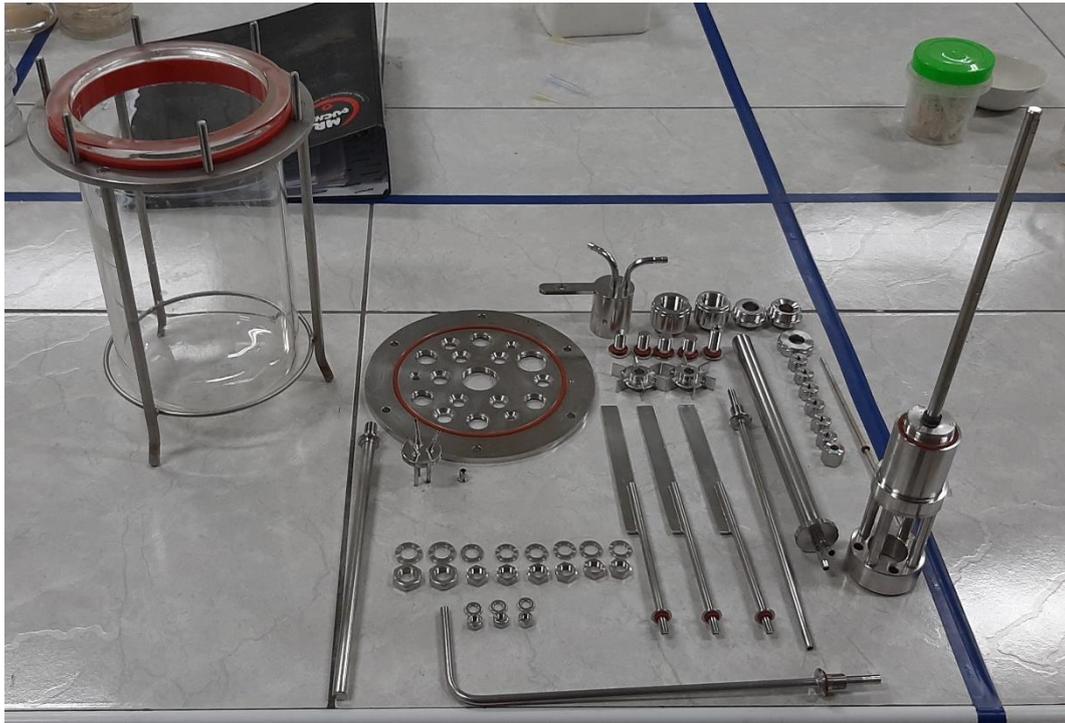


Figura 23: Componentes internos del tanque de fermentación del Biorreactor Applikon Biotechnology



Figura 24: Instalación de las conexiones, componentes y filtros del biorreactor para la producción de PHB



Figura 25: Recuperación del medio de cultivo finalizado el tiempo de producción



Figura 26: Biomasa bacteriana obtenida de la producción en Biorreactor



Figura 27: Extracción de PHB con hipoclorito



Figura 28: PHB centrifugado posterior a la extracción



Figura 29: PHB producido en biorreactor

Apéndice N° 7: Caracterización de PHB obtenido por HPLC.



Figura 30: Sistema de cromatografía líquida HPLC-UV con un equipo UHPLC Thermo Scientific Ultimate 3000 Rapid Separation

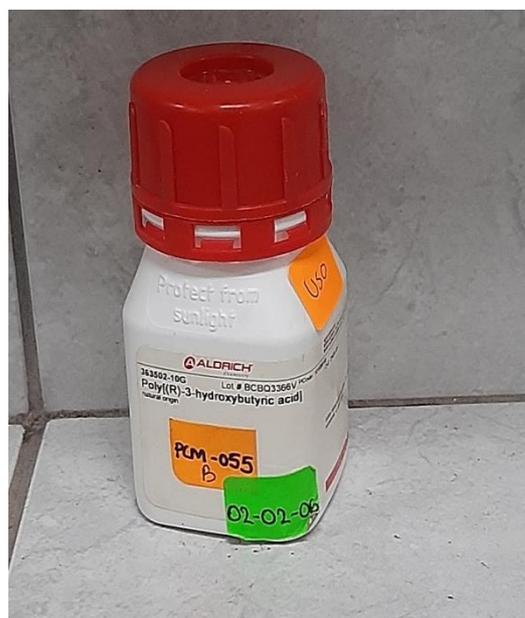


Figura 31: Estándar de Acido-3-Polihidroxibutírico utilizado para la construcción de la curva de calibración para el análisis HPLC



Figura 32: Filtrado de muestras para análisis HPLC



Figura 33: Sistema de filtración al vacío para fase móvil

Apéndice N° 8: Caracterización de PHB obtenido por FT -IR.



Figura 34: Equipo FT-IR Thermo Scientific Nicolet IS50 en modo de Reflectancia Total Atenuada (ATR)

Apéndice N° 9: Síntesis de Nanoandamios.

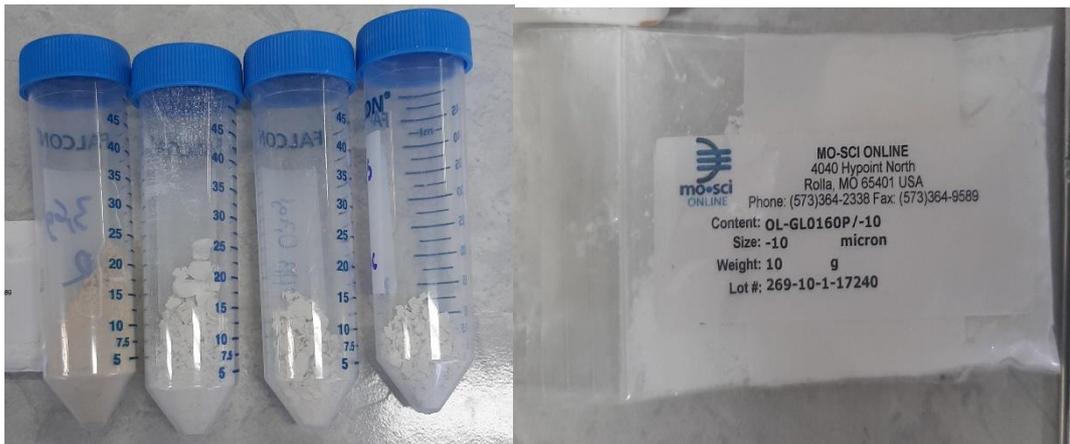


Figura 35: Precursores utilizados en la síntesis de nanoandamios PHB y BG 45S5 respectivamente



Figura 36: Sistema de síntesis de nanoandamios poliméricos acoplado a un intercambiador de calor

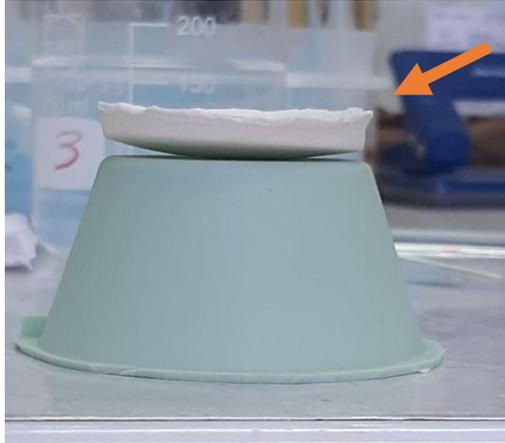


Figura 37: Nanoandamio

Apéndice N° 10: Caracterización estructural SEM y EDS:



Figura 38: Microscopio electrónico de barrido (SEM) TESCAN VEGA3

Apéndice N° 11: Caracterización estructural XRD.



Figura 39: Difractómetro de Rayos X
BRUKER modelo D8 Eco - ADVANCE

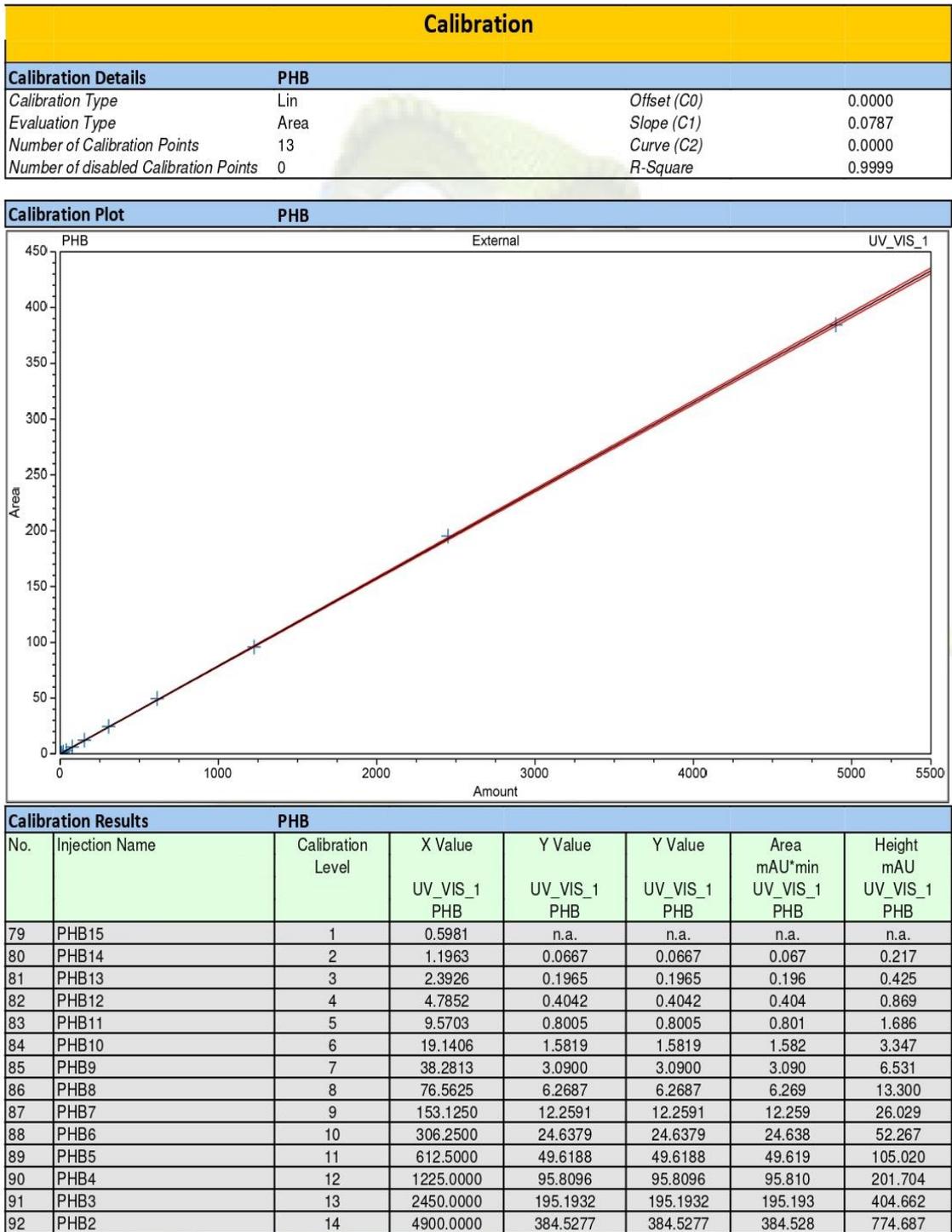
ANEXOS:

Anexo N° 1: Certificado de calidad Bioglass 45S5 MO-SCI ONLINE

Quality Certification		
Part Number OL-GL0160P/-10	Description 45S5 Bioactive Glass Powder, -10 µm	
Date 10/1/2019	Lot Number 269-10-1-17240	
<p>Specifications Met:</p> <p>% In Range: <u> 80 % </u></p> <p>% Spherical: <u> N/A </u></p> <p>Size Range: <u> -10 micron </u></p> <p>Quantity Being Certified <u> 10 g </u></p>		
Approved By <i>[Signature]</i>	Title QA Inspector	Date <i>10/01/2019</i>
Second Approved By <i>[Signature]</i>	Title QA Reviewer	Date <i>10/01/2019</i>
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> <p>MO-SCI ONLINE 4040 Hypoint North Rolla, Mo.65401 USA Phone: (573)364-2338 Fax: (573)364-9589</p> </div> </div>		

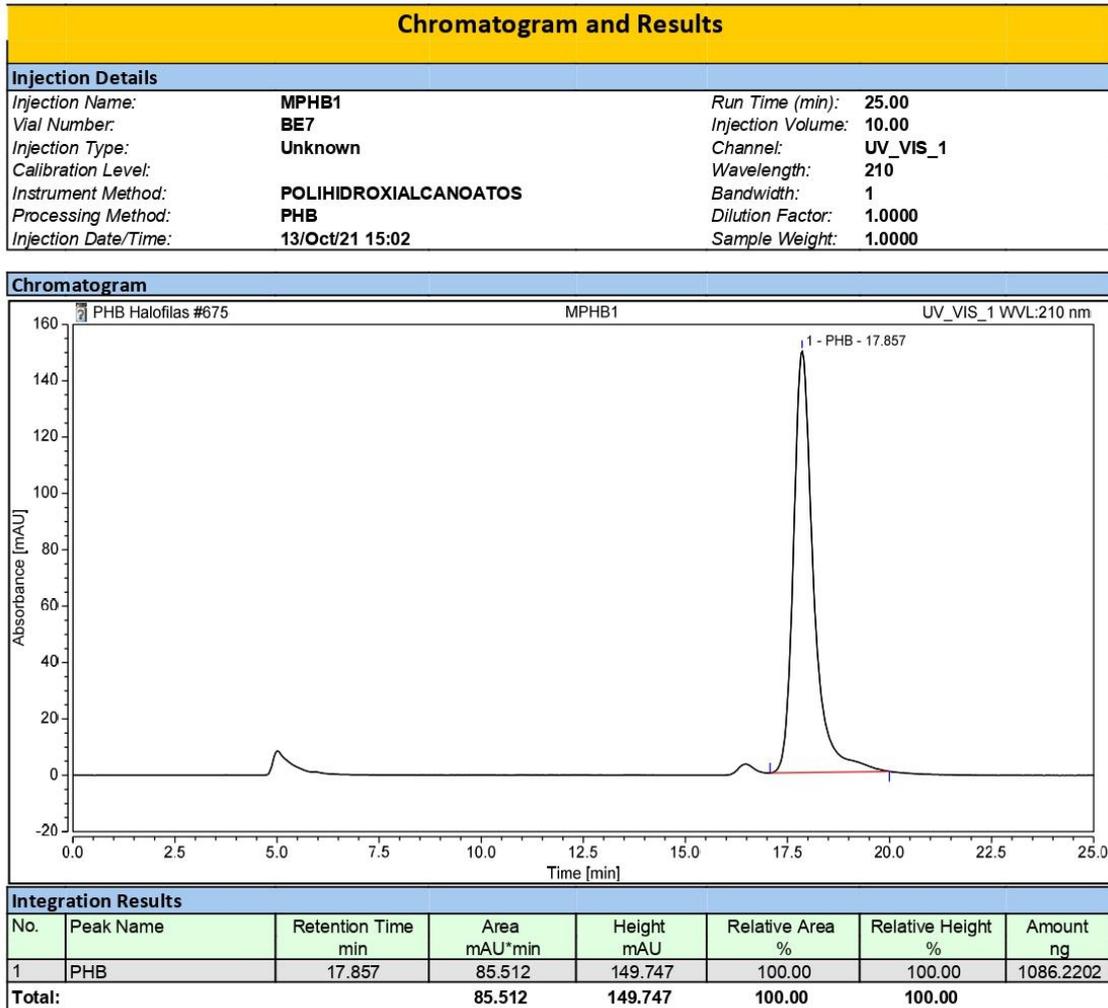
Rev Date 09/03/2014

Anexo N° 2: Reporte de curva de calibración PHB para análisis HPLC

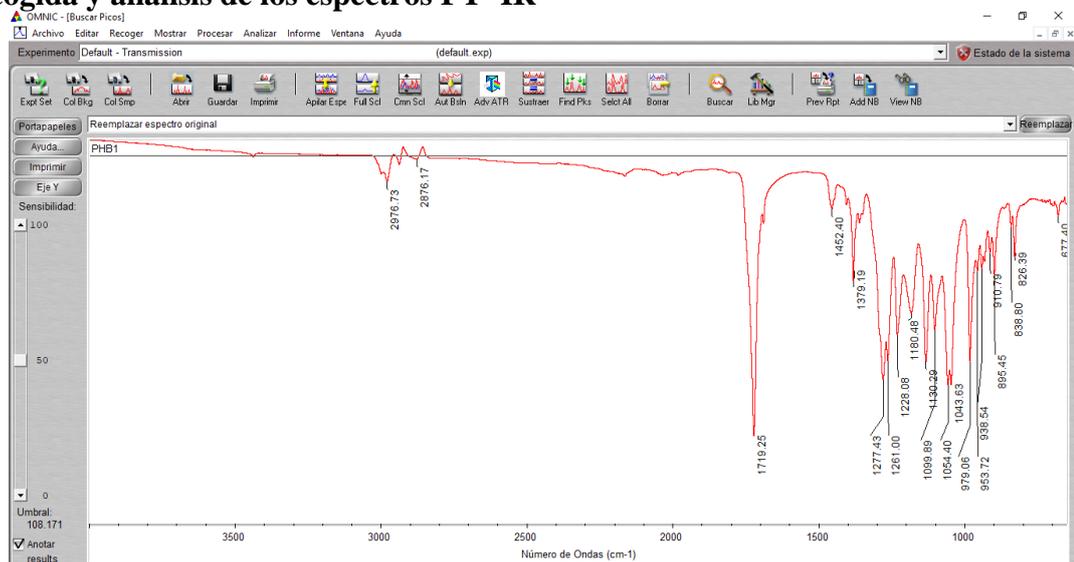


Anexo N° 3: Reporte de análisis HPLC de muestras de PHB producido en

Biorreactor

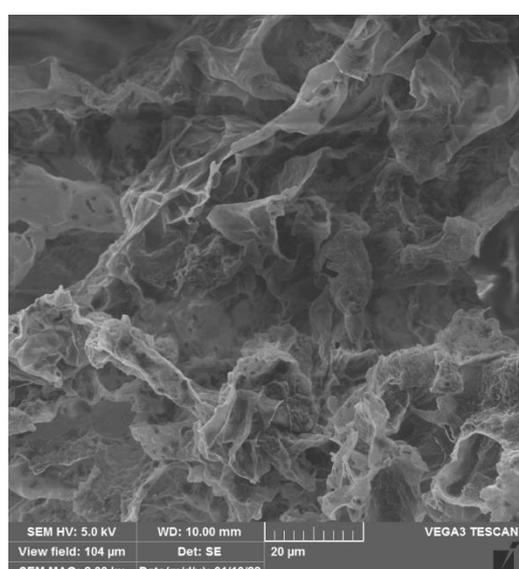
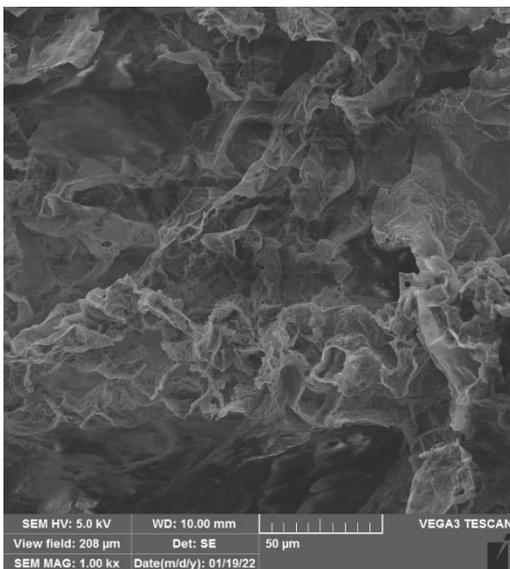
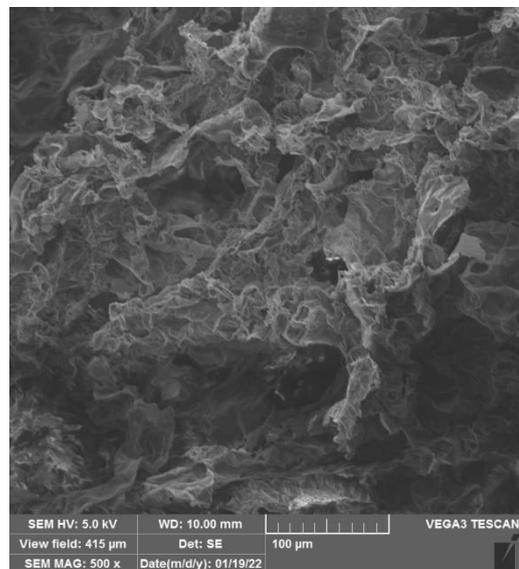
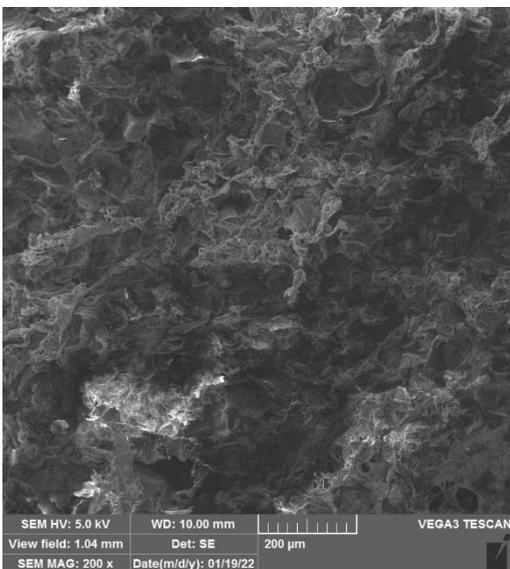
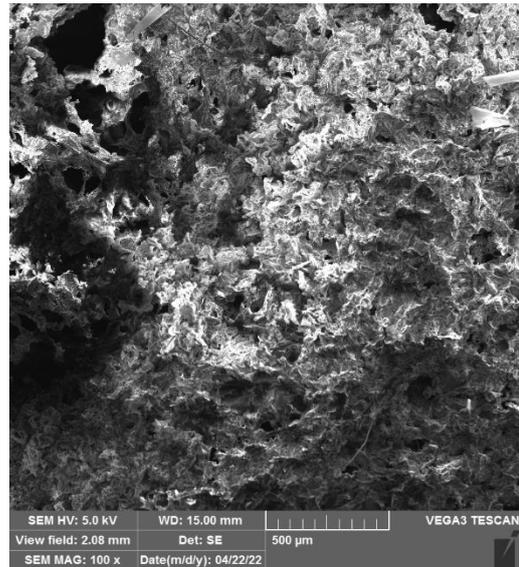
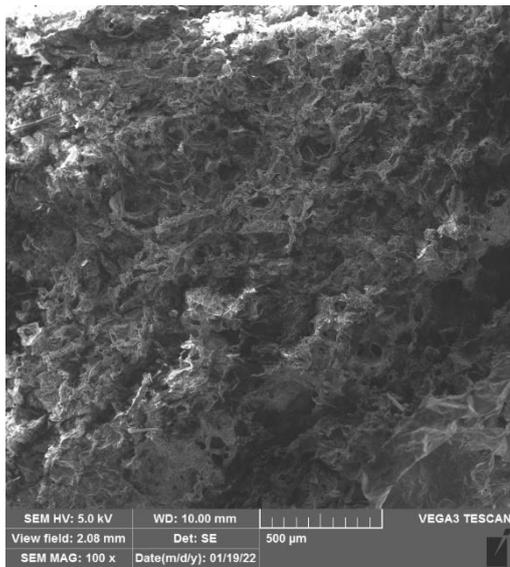


Anexo N° 4: Software OMNIC FTIR (Thermo Scientific) utilizado para la recogida y análisis de los espectros FT- IR



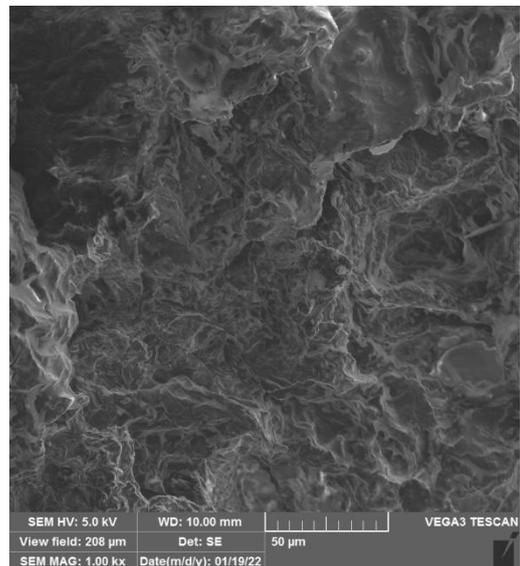
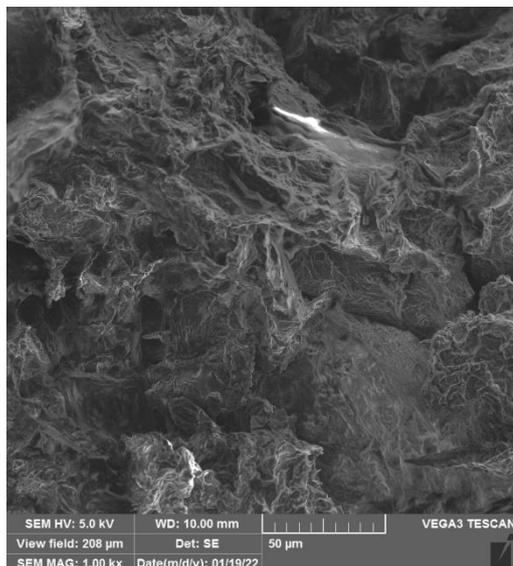
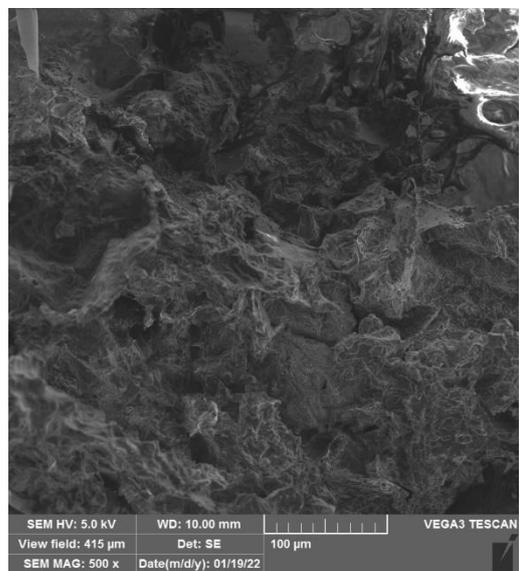
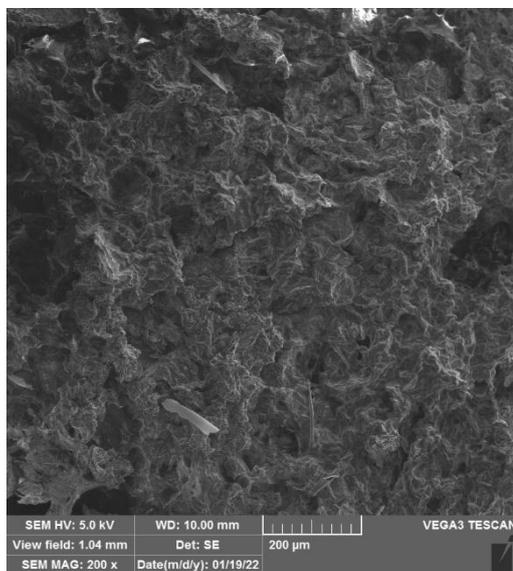
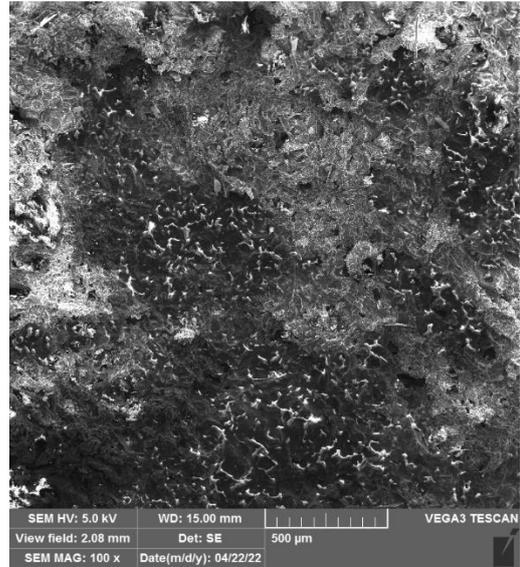
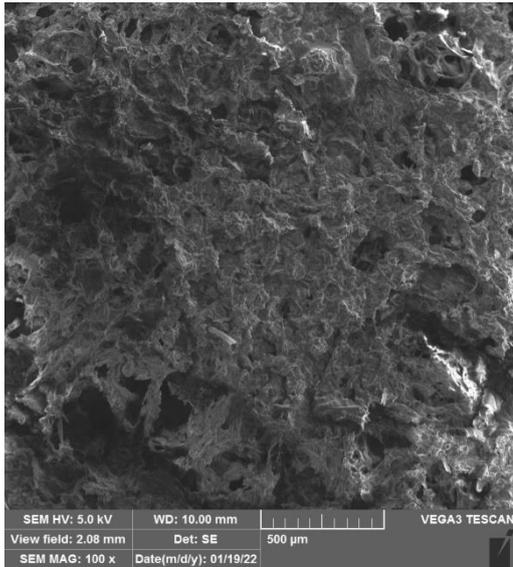
Anexo N° 5: Micrografías SEM de los nanoandamios producidos con la proporción

N° 1.



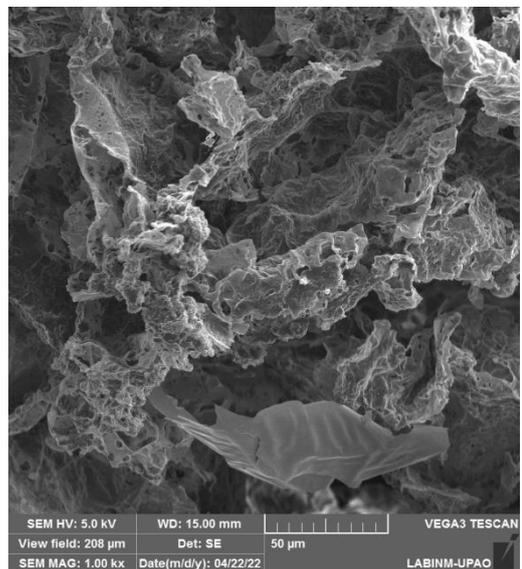
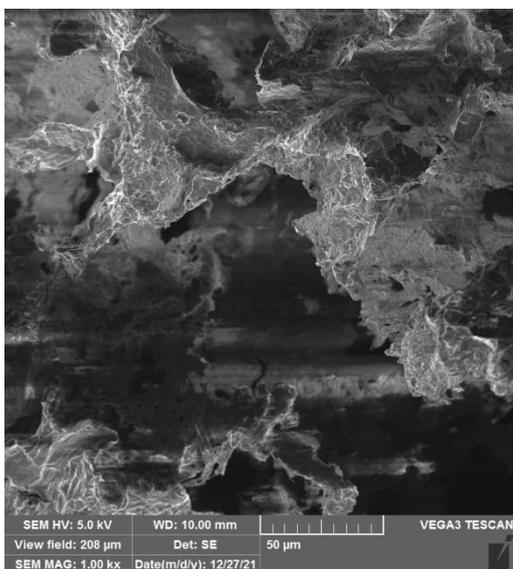
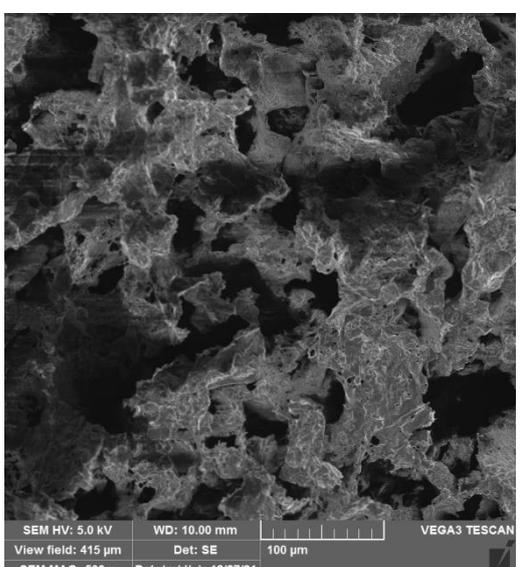
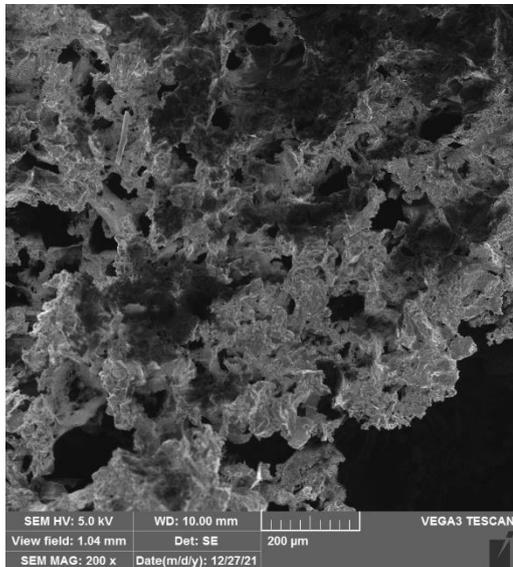
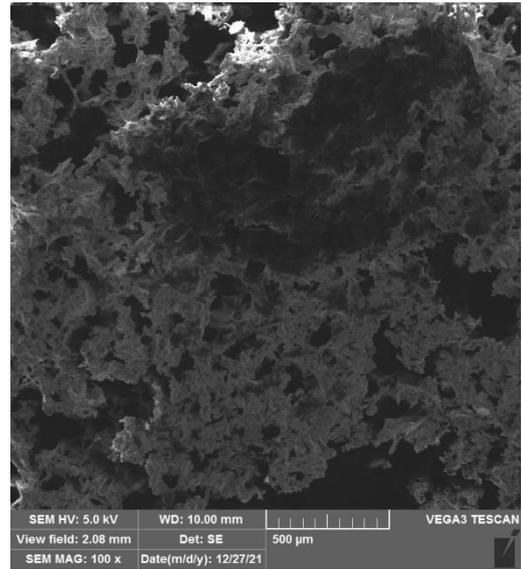
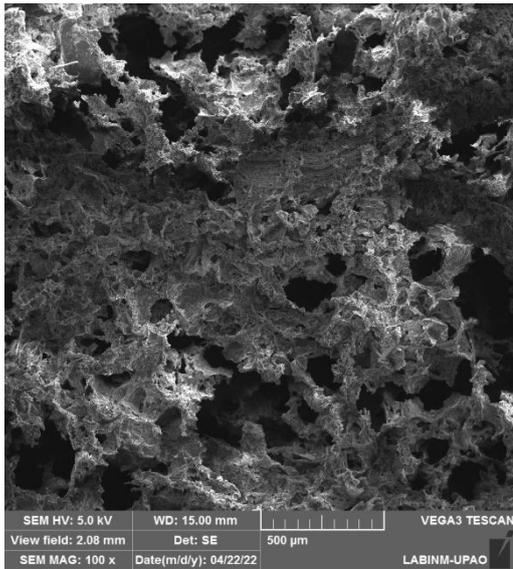
Anexo N° 6: Micrografías SEM de los nanoandamios producidos con la proporción

N° 2

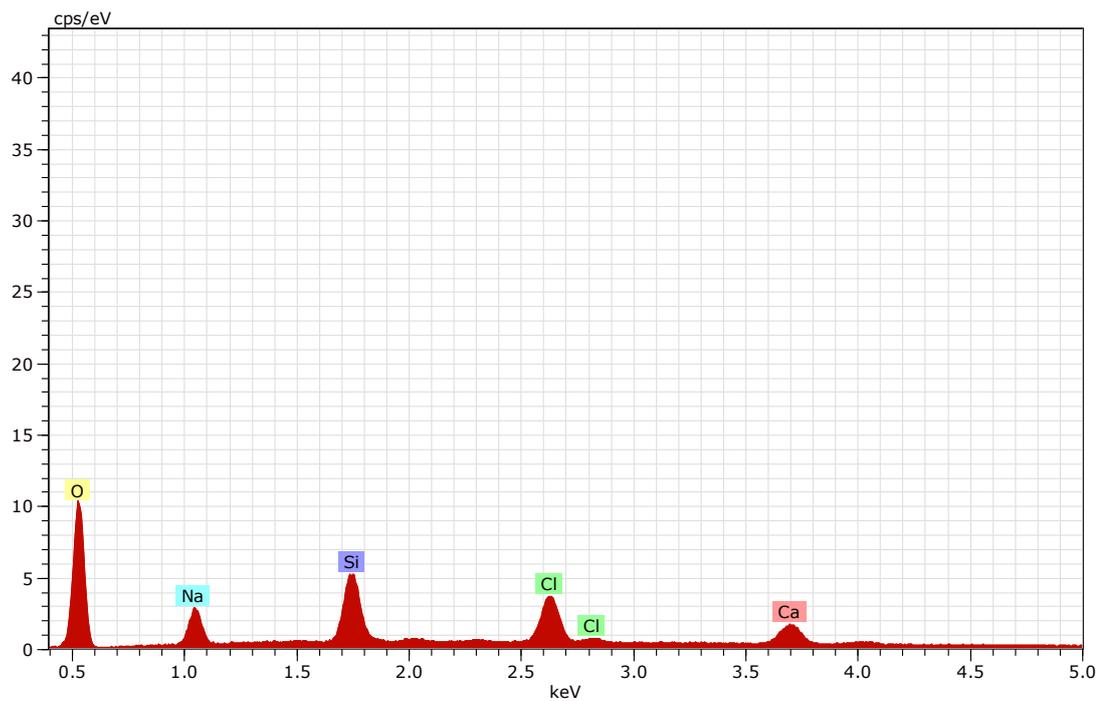
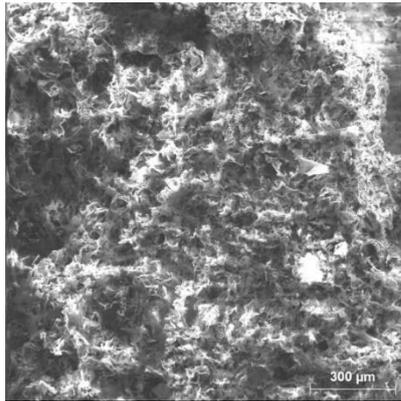


Anexo N° 7: Micrografías SEM de los nanoandamios producidos con la proporción

N° 3

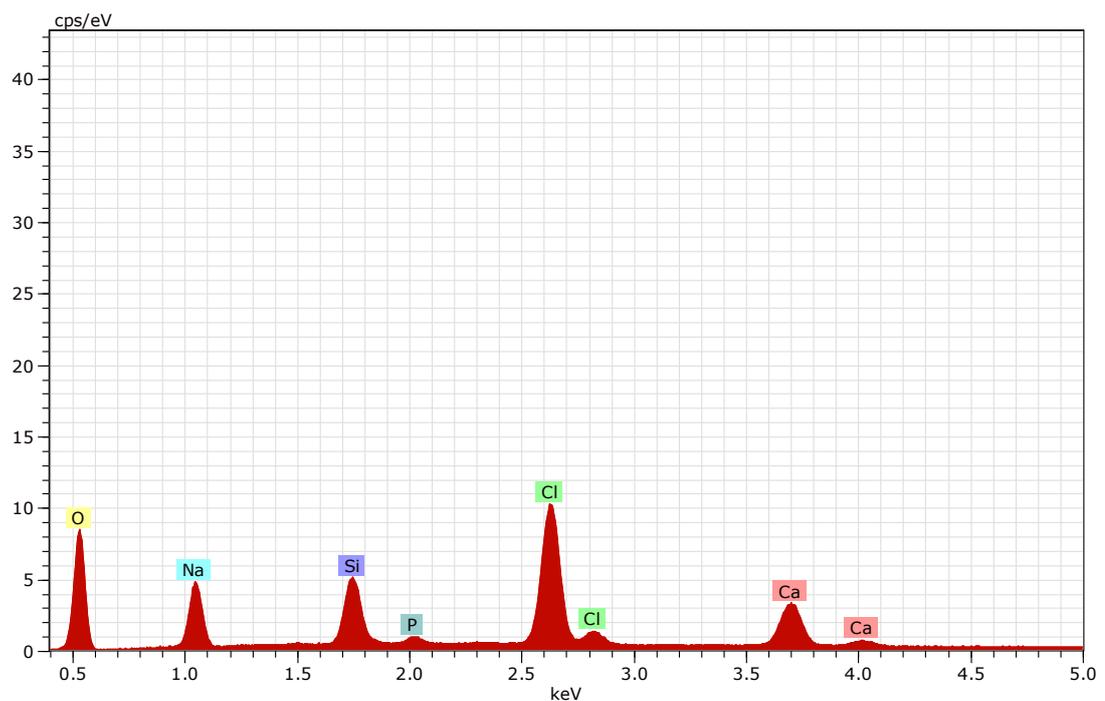
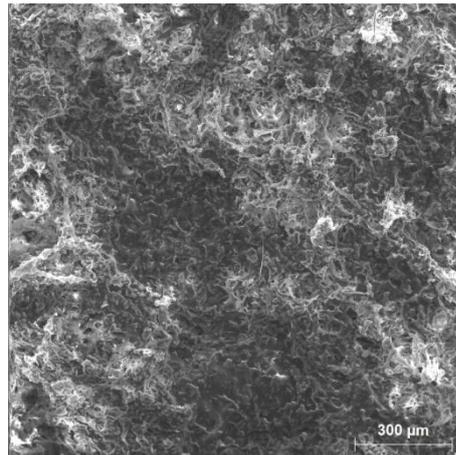


Anexo N° 8: Análisis EDS de los nanoandamios producidos con la proporción N° 1



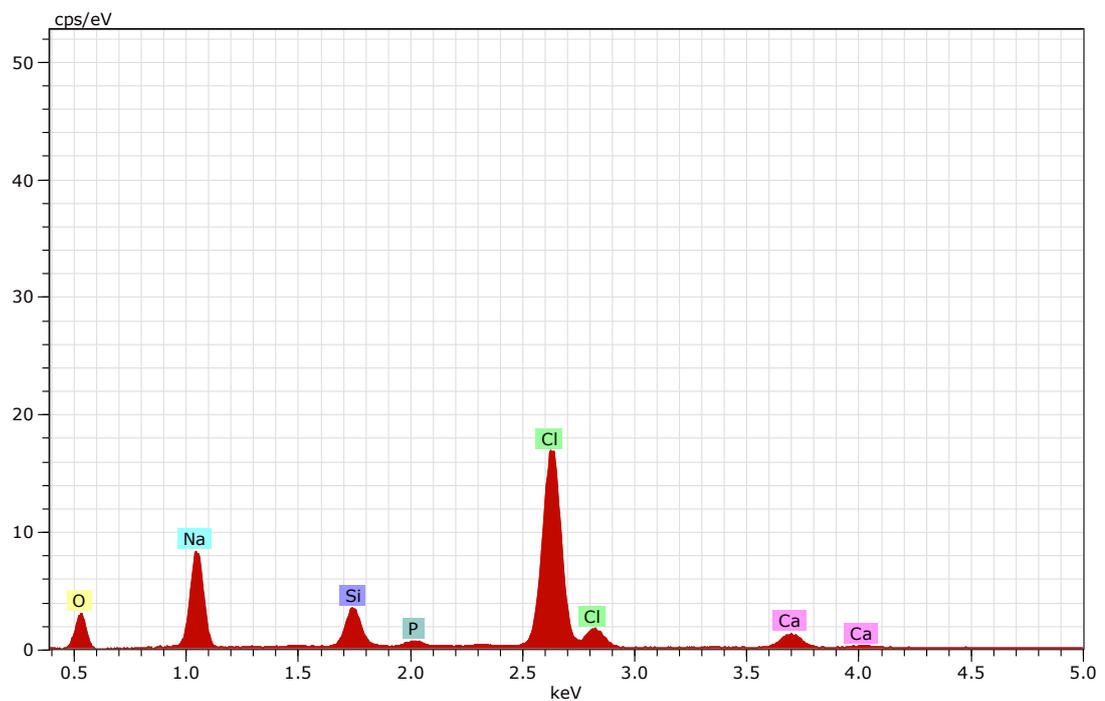
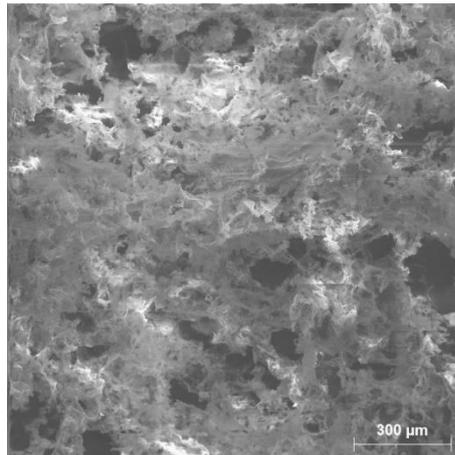
Elemento	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C[wt.%]	Error (3 Sigma)
Oxígeno (O)	K-series	17,36	69,67	80,51	6,33
Sodio (Na)	K-series	2,35	9,44	7,59	0,57
Silicio (Si)	K-series	2,33	9,34	6,15	0,39
Cloro (Cl)	K-series	1,72	6,91	3,61	0,26
Calcio (Ca)	K-series	1,16	4,64	2,14	0,18
Total:		24,91	100,00	100,00	

Anexo N° 9: Análisis EDS de los nanoandamios producidos con la proporción N° 2



Elemento	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C[wt.%]	Error (3 Sigma)
Oxígeno (O)	K-series	24,11	59,48	73,20	8,52
Sodio (Na)	K-series	4,99	12,30	10,53	1,10
Silicio (Si)	K-series	2,70	6,66	4,67	0,44
Fósforo (P)	K-series	0,26	0,63	0,40	0,11
Cloro (Cl)	K-series	5,79	14,29	7,94	0,68
Calcio (Ca)	K-series	2,69	6,64	3,26	0,32
Total:		40,54	100,00	100,00	

Anexo N° 10: Análisis EDS de los nanoandamios producidos con la proporción N°3



Elemento	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C[wt.%]	Error (3 Sigma)
Oxígeno (O)	K-series	21,33	36,03	51,00	8,71
Sodio (Na)	K-series	12,52	21,14	20,83	2,65
Silicio (Si)	K-series	3,47	5,85	4,72	0,55
Fósforo (P)	K-series	0,48	0,82	0,60	0,14
Cloro (Cl)	K-series	19,43	32,82	20,97	2,09
Calcio (Ca)	K-series	1,98	3,34	1,89	0,26
Total:		59,21	100,00	100,00	