

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Química

Informe final de proyecto de investigación

Obtención de materiales porosos producidos a partir de biopolímeros extraídos de residuos agroindustriales para aplicaciones biomédicas.

**Dr. Ricardo Starbird Pérez
MSc. Silvia Castro Piedra
MSc. Andrea Ulloa Fernández
MSc. Karla Ramírez Sánchez
Lic. Johan Morales Sánchez
Dr. Randall Chacón Cerdas**

Febrero 2023

Tabla de contenido

1. Código y Título del proyecto	3
2. Autores y afiliaciones	3
3. Resumen.....	3
4. Palabras clave.....	4
5. Introducción	4
6. Marco Teórico	5
7. Metodología	6
8. Resultados	8
9. Discusión y conclusiones	13
10. Recomendaciones	14
11. Agradecimientos	14
12. Referencias.....	14
13. Apéndices	18

1. Código y Título del proyecto

1460095: Obtención de materiales porosos producidos a partir de biopolímeros extraídos de residuos agroindustriales para aplicaciones biomédicas.

2. Autores y afiliaciones

Nombre y apellidos	Afiliación	Grado Académico
Ricardo Starbird Pérez (coordinador)	Esc. Química	Doctorado
Karla Ramírez Sánchez	Esc. Química	Maestría
Silvia Castro Piedra	Esc. Biología	Maestría
Andrea Ulloa Fernández	Esc. Biología	Maestría
Sebastian León	Estudiante de Maestría	Licenciado
Johan Morales Sánchez	Esc. Biología	Licenciado
Randall Chacón Cerdas	Esc. Biología	Doctorado

3. Resumen

Los polisacáridos como el almidón, la celulosa y el carragenato son compuestos orgánicos, biodegradables, de producción sostenible y de bajo costo, obtenidos en muchas ocasiones a partir de residuos agroindustriales. La extracción de biopolímeros se motiva por la creciente demanda del mercado, y la provincia de Cartago tiene 1004 de las 1554 fincas que se dedican al cultivo de papa en Costa Rica, por lo que, alternativas de que generen valor agregado a dicho producto es de interés para la región.

La micro estructuración de estos materiales permite la fabricación de complejos tridimensionales y biocompatibles que han sido evaluadas como sistemas para la colonización celular in vitro. La síntesis de estas estructuras responde a una necesidad en la búsqueda de estrategias de reparación tisular eficientes. Estos sistemas de andamios tridimensionales inteligentes permiten, además, controlar propiedades biofísicas y bioquímicas, mediante su modificación con materiales conductores y moléculas aniónicas de estimulación celular, de manera que se module el entorno extracelular a través de la estimulación mecánica, eléctrica y bioquímica, impulsando la reprogramación molecular de las células cultivadas en el andamio y favoreciendo su diferenciación a un tejido de interés para su posterior reparación.

En este proyecto de investigación, se optimizó la síntesis de andamios porosos tridimensionales basados en almidón extraído a partir de residuos de papa de origen agroindustriales de la zona agrícola de la provincia de Cartago. El material fue exitosamente modificado con un polímero conductor para explorar su aplicación durante la liberación de dosis terapéuticas de biomoléculas que podrían contribuir en la estimulación de células madre mesenquimales humanas, como paso inicial para la síntesis de tejido óseo in vitro y terapias de reparación tisular.

4. Palabras clave

Biopolímeros, extracción, residuo agroindustrial, materiales porosos, aplicaciones biomédicas.

5. Introducción

Costa Rica es un país productor agrícola, que posee condiciones favorables para la producción industrial de piña, banano, caña de azúcar, café y papa [1]. Durante la cosecha, dependiendo el tipo de cultivo, solo del 20% al 30% de la biomasa total es aprovechable como alimento [2], el restante, se convierte en residuos agroindustriales que generan altos índices de contaminación, no obstante, la mayoría de estos residuos pueden ser aprovechables para la extracción de biopolímeros como el almidón, celulosa u otros.

Desde el año 2014, investigadores del Tecnológico de Costa Rica han propuesto el uso de biopolímeros en la fabricación de sistemas porosos. Los aerogeles son materiales sólidos, livianos y de gran área superficial que presentan una red de poros interconectados obtenidos a partir de la remoción de líquido en geles húmedos y el reemplazo de este por gas sin ocasionar el colapso de la estructura [3], [4]. Tal como se mencionó, estos sistemas porosos se han sintetizado a lo largo de muchos años a partir de biopolímeros y materiales inorgánicos, sin embargo, su mercado viene en aumento desde el año 2017 y según proyecciones, seguirá creciendo [5]–[8]. Este crecimiento se atribuye no solo a un interés económico por reducir los costos de energía y la alta demanda de materiales de aislamiento livianos, sino que, los polímeros de origen natural que se utilizan para sintetizar este tipo de estructuras son de gran interés en sistemas que implican interacción con agentes biológicos [9].

Concretamente, dada su biocompatibilidad, su estructura y propiedades físicas y mecánicas, estos materiales porosos se han utilizado como sistemas de matrices extracelulares (MEC) en ingeniería de tejidos [10]–[13]. Los aerogeles pueden ser utilizados como MEC siempre que se aproximen a las condiciones naturales del ambiente celular. La estimulación directa de las células por acción de algunas moléculas que pueden combinarse con el material poroso es bien conocida (ej. factores de crecimiento) [14]–[16]. Por otra parte, es aceptado que las células interactúan bidireccionalmente con la matriz. La contracción celular es soportada por la matriz extracelular provocando una acumulación de moléculas en esos sitios, este proceso lleva a un balance de fuerzas entre las células y la matriz, por lo tanto, las propiedades mecánicas de la matriz, como su elasticidad y rigidez, también han demostrado tener mucha influencia en el comportamiento celular [10]–[12].

La caracterización de las propiedades mecánicas a macro y nano escala de materiales porosos basados en polisacáridos ya se ha llevado a cabo por los investigadores proponentes, por lo que ya se tiene conocimiento y experiencia con ese tipo de estructuras. Esta caracterización permite elegir los tipos de células que pueden ser cultivadas en este tipo de andamios, o definir posibles aplicaciones como sistemas de liberación de biomoléculas, lo cual permitiría optimizar la metodología de síntesis o el tipo de biopolímero apropiado para usarse durante su fabricación, de manera que se realicen las mejoras de la matriz de acuerdo con su aplicación final [17].

Adicionalmente, diversos tejidos requieren estimulación eléctrica durante las etapas de proliferación celular, diferenciación, intercambio de señales o movimiento, por ejemplo, el tipo de tejido nervioso, músculo esquelético y ciertas células madre. La estimulación de células madre indiferenciadas para conducir su diferenciación a un linaje determinado de una manera eficiente y escalable es fundamental para el éxito clínico final de la terapia celular [18], [19].

Los estudios sobre la respuesta a la estimulación eléctrica de células madre se han llevado a cabo de manera constante desde hace varios años [20]. Inclusive, la estimulación de células madre utilizando electrodos de oro diseñados por colaboradores y estudiantes del Tecnológico de Costa

Rica ya se ha evaluado en sistemas de cultivo *in vitro*, obteniendo resultados muy favorables en cuanto a diferenciación y orientación celular, lo que confirma que el sistema podría ser funcional en sistemas tridimensionales como las matrices recubiertas con polímero conductor que se proponen utilizar en esta propuesta [21].

6. Marco Teórico

Las propiedades eléctricas de los polímeros conductores como interface en electrodos y para recubrimiento en matrices tridimensionales han sido ampliamente estudiadas, a su vez, su biocompatibilidad para ser utilizado como biomaterial en aplicaciones biológicas también se ha demostrado, lo que confirma la ventaja de hacer uso de estos materiales para el recubrimiento de los andamios sintetizados a partir de polisacáridos [22], [23]. Con respecto a la aplicación de los polímeros conductores, también se ha reportado la fijación y liberación de factores de crecimiento y otros tipos de moléculas aniónicas, dado el mecanismo farádico que se involucra en los procesos reductivos-oxidativos asociados a la conductividad del material [24]; esta aplicación es de gran interés en los sistemas de andamios para cultivo celular para inducir la inmovilización de biomoléculas de estimulación bioquímica en células madre y conducir su diferenciación a un linaje de interés.

Las células madre son reconocidas por su capacidad de regeneración y su diferenciación en diversos linajes, lo cual favorece su uso en terapia celular ante diversos padecimientos [25], [41]. Específicamente, las células madre mesenquimales (MSCs) son un tipo de células que tienen potencial capacidad de diferenciación celular en tejido óseo, cartílago, músculo, médula, tendón/ligamento, adiposo y otros tejidos conectivos, por consecuencia, su uso ha cobrado gran interés en el campo de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos [26], [27].

La liberación de biomoléculas por diversos mecanismos a partir de este tipo de matrices tridimensionales se ha estudiado a lo largo de muchos años. Este tipo de liberación viene dada ya sea tras la inyección, inhalación o colocación en tejidos específicos de estas estructuras. Dado lo anterior, estudios recientes han propuesto el desarrollo de aerogeles para la liberación controlada de agentes farmacológicos como la dexametasona y que funcionen además como un andamio para el crecimiento de células óseas que también son estimuladas por este fármaco [28], [29].

Adicionalmente, tal como se mencionó, el mecanismo farádico de los polímeros conductores ha permitido la liberación controlada de moléculas cargadas a partir de electrodos modificados. Tales ensayos fueron desarrollados en el año 2020 por los investigadores proponentes [24], pero aún no se ha reportado la liberación a partir de matrices porosas. Sin embargo, de acuerdo con lo que se ha logrado estudiar, este tipo de metodologías para la liberación controlada de biomoléculas en el uso de los electrodos modificados podrían ser aplicados en los sistemas de aerogeles diseñados por investigadores del proyecto; de modo que puedan emplearlos en un sistema *in vitro* para la estimulación de una línea celular humana de células madre mesenquimales, de manera que, en conjunto con un estímulo eléctrico y mecánico, puedan plantearse como una estrategia en medicina regenerativa ante diversos padecimientos o que contribuyan a la síntesis de tejido óseo artificial en matrices tridimensionales.

Finalmente, es importante considerar que Costa Rica, específicamente el ITCR, es un socio internacional de la red europea COST CA18125 (Advanced Engineering and Research of aerogels for Environment and Life Sciences) y coordinador nivel país del proyecto internacional RLA2020014 de la Agencia de Energía Atómica (AEIA), lo que permite tener acceso a un grupo de expertos en el área de estos materiales y técnicas de modificación estructural. Lo anterior coincide con los retos temáticos en ciencia, tecnología e innovación que ha planteado Costa Rica, en la búsqueda de fomentar el desarrollo nacional de materiales avanzados o nanoestructurados promoviendo encadenamientos, nuevos productos, calidad, diferenciación y valor agregado.

7. Metodología

Objetivo específico 1: Obtener de un biopolímero de interés para la generación de un sistema de liberación controlada de un sustrato de origen agroindustrial.

1. Población y muestra del estudio.

La generación de tecnologías y conocimientos a partir de la presente propuesta supondría un avance en el campo del conocimiento científico-tecnológico nacional, por lo que parte de los beneficiarios serían la comunidad científico-tecnológica de Costa Rica. Lo anterior con el fin, de propiciar nuevas alianzas con otros grupos de investigación, plantear estrategias del aprovechamiento racional de residuos agroindustriales de cultivo de papa en la región de Cartago y generar un mejor entendimiento de los problemas a nivel de tejido óseo que aquejan la salud de las personas y proponer soluciones más integrales hacia estos, de una manera más autónoma y local.

2. Extracción de almidón de papa.

Las muestras serán lavadas y cortadas en trozos pequeños, colocados en disolución de bisulfito de sodio 0.1% (m/v) en una proporción de 1 kg de tubérculo por cada 1 L de disolución, por 10 min, para posteriormente licuarse durante 3 a 4 min. La mezcla resultante se filtra por una tela para separar restos celulares. La suspensión se filtrará y se deja reposar toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, el almidón precipitado se secará en un horno a 45 °C durante 24 h. El almidón obtenido se triturará usando un molino y luego empaquetado para ser almacenados en un refrigerador a 4 °C antes de su uso [30].

3. Determinación del contenido de amilosa y amilopectina.

Para la determinación del contenido de amilosa y amilopectina en muestras de almidón extraído a partir de desechos de papa, se procederá a emplear dos metodologías, la primera empleando el método por afinidad a yodo, la segunda, empleando el Kit de detección de Megazyme®.

Objetivo específico 2: Sintetizar sustratos porosos para aplicaciones biomédicas.

1. Síntesis de disoluciones para formulación de criogeles.

Se prepararán dispersiones acuosas a partir del almidón extraído 9 % m/v y se le adicionará κ-carragenato a una concentración de 0,5 % m/v, de acuerdo con estudios previamente realizados. A estas dispersiones se les estará adicionando distintas concentraciones del polímero polivinil alcohol y polivinil alcohol funcionalizado con grupos stírilpiridinium para inducir el fotoentrecruzamiento de la matriz porosa. Esta modificación podría ser funcional para controlar la degradación y el hinchamiento en agua que presenta la estructura de acuerdo con el porcentaje de amilosa en la molécula de almidón extraída, de modo que pueda definirse la aplicación de las estructuras en liberación de biomoléculas o para cultivo celular.

2. Síntesis de criogeles.

El material poroso será diseñado y fabricado empleando la siguiente metodología: una disolución clara y homogénea resultante de la mezcla de polisacáridos se agitará durante 3 horas y luego se somete a un proceso de autoclavado a 121 °C durante 10 minutos. La dispersión resultante se transferirá de manera inmediata a moldes de polipropileno cilíndricos (longitud: 40 mm y diámetro interno: 12,40 mm). Los moldes se sellarán con papel Parafilm y se almacenarán a 4 °C durante un periodo igual o mayor a 48 h para inducir la retrogradación del almidón, los cilindros de hidrogel se someten a liofilización durante 24 horas y finalmente se mantienen en desecador hasta su

uso. Los criogeles se someten a radiación gamma a 25 kGy, para esterilización y para inducir el entrecruzamiento del SbQ.

3. Caracterización física de los sistemas porosos (densidad, porosidad, hinchamiento y degradación).

La densidad en bulto de la matriz porosa, así como el volumen de encogimiento una vez liofilizado el material, serán determinados con la finalidad de realizar su caracterización física. Para esto, la siguiente ecuación, permite calcular el volumen de encogimiento debido al proceso de liofilización. La densidad del esqueleto de las matrices liofilizadas se determinará utilizando un picnómetro de nitrógeno a temperatura ambiente y a 19 psi. Este equipo está disponible en el laboratorio de investigación de la escuela de química del TEC. El hinchamiento y la degradación de las estructuras será determinado de acuerdo con los cambios en la masa de los sistemas porosos antes y después de su inmersión en soluciones salinas, por un periodo de 8 horas y 15 días, respectivamente. Finalmente, datos de porosidad y volumen total de poro, serán extraídos a partir de los datos de densidad ya obtenidos.

4. Recubrimiento con el polímero conductor.

Para la preparación de los criogeles con PEDOT, se agregarán 150 mg de la plantilla de la muestra de almidón/k-carragenato/PVASbQ en una solución 0.3 M de p-toluenosulfonato de hierro. Después de 24 h, los criogeles serán lavados con IPA 0.5 M. Subsecuentemente, las muestras se sumergen en una solución de 3,4-ethilenedioxitiofeno (EDOT) 2.0 M durante 48 horas. Finalmente, las muestras se lavan al menos en cinco ocasiones con IPA y se dejan secar a temperatura ambiente.

5. Medición de impedancia eléctrica de las matrices conductoras.

El comportamiento eléctrico de las matrices porosas recubiertas con el polímero conductor se evaluará por impedancia eléctrica y voltametría cíclica. Para el análisis, se colocará el criogel polimerizado entre dos electrodos de cobre, de manera que se tenga una estructura tipo sándwich, y cada uno de los electrodos será utilizado como electrodo de trabajo y contraelectrodo. Los estudios de impedancia eléctrica se llevarán a cabo a 50 mV y con un rango de frecuencia desde 50 a 10^5 Hz. Finalmente, para el análisis de voltametría cíclica, se aplicará 3 ciclos de análisis con un rango de potencial desde -0.5 hasta 1 V, con un rango de escaneo de 100 mV/s.

6. Uso de circuito electrónico para estimulación de matrices conductoras a usarse para cultivo celular.

Se utilizará un prototipo del sistema de estimulación eléctrica que permita la generación y procesamiento de señales eléctricas por modulación de ancho de pulso (PWM), senoidal, triangular y exponencial, basado en las plataformas Arduino y Raspberry Pi en conjunto con convertidores digital-analógico (DAC) con al menos 10 bits de precisión, y otros componentes externos para el acondicionamiento (amplificación, filtrado) de las señales generadas.

Objetivo específico 3: Evaluar la eficacia de los sistemas porosos fabricados a partir de biopolímeros en aplicaciones de cultivo celular y como sistemas de liberación de biomoléculas.

1. Fijación de biomoléculas en la matriz porosa.

La fijación de moléculas aniónicas en la matriz porosa se llevará a cabo adicionando concentraciones definidas de una biomolécula a la mezcla inicial utilizada para la síntesis. Estas concentraciones serán calculadas de acuerdo con estudios de fijación previos que se llevaron a cabo sobre electrodos de oro.

A la dispersión inicial de polisacáridos, según sea determinado en el objetivo específico 2, se le adicionará la biomolécula y posterior a esto, se agitará la disolución durante 3 horas a temperatura ambiente y se somete a un proceso de autoclavado para inducir la gelificación. Una vez se haya vertido en moldes, se mantendrán 4 días en refrigeración y finalmente se congelan a -20°C , posteriormente se secan por liofilización. Se mantendrá un grupo de criogeles cargados con biomoléculas para inducir la polimerización del EDOT y hacer comparaciones posteriores.

2. Estudio de las condiciones de liberación de biomoléculas a partir de la matriz.

La liberación controlada de biomoléculas a partir de sistemas conductores bidimensionales ya ha sido estudiada previamente, esta metodología puede adaptarse al sistema actual, no obstante, en este caso se estaría optimizando la liberación de dosis terapéuticas a partir de la membrana tridimensional.

Por otra parte, para los criogeles recubiertos con PEDOT, estudiantes adjuntos a proyectos de investigación relacionados han diseñado electrodos de tamaño reducido que pueden adaptarse a pocillos de cultivo celular. Este electrodo permitiría el contacto con los criogeles conductores que serán colocados en el fondo del pocillo, de manera que permita la estimulación eléctrica de la matriz.

Inicialmente, los electrodos y el criogel conductor con biomoléculas inmovilizadas se colocarán en el pocillo de cultivo. El electrodo será conectado al circuito de estimulación diseñado para estudios *in vitro*. Al pocillo se le adicionará 100 μL de una solución de acetato de amonio 0.1 M, pH 7.2. Y se aplicará un estímulo con un rango de potencial desde 0.6 V hasta 1 V y con un rango de escaneo de 0.25 mV/s. La cantidad de ciclos de estimulación eléctrica por aplicar serán determinados de acuerdo con la concentración de biomolécula liberada tras cada análisis. Con esto, se puede definir la cantidad de estímulos para alcanzar la liberación a dosis terapéuticas.

3. Formación de tejido óseo tras diferenciación celular en el sustrato poroso producido a partir de polisacáridos.

Se empleará una línea de células madre mesenquimales humanas de la casa comercial Lonza (PT-2501). Las células se cultivarán y se mantendrán en el medio de cultivo Minimum Esencial (MEM) suplementado con 1% Penicilina-Streptomicina, 2% de L-glutamina, 1% Piruvato de Sodio y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y se mantendrán a 37°C en un incubador humidificado al 5% de CO_2 .

Para el control positivo del ensayo de diferenciación inicial, una vez alcanzado el 80% de confluencia, se mantendrá el cultivo celular en placas de 12 pocillos con medio MEM suplementado con 10 mM de β -glicerofosfato, 50 $\mu\text{g/ml}$ de ácido ascórbico fosfato, y 100 nM de dexametasona, y se mantendrá un cultivo sin estos agentes como control negativo.

Posteriormente, las células serán inoculadas en una densidad de 200 000 células/mL sobre los andamios cargados con biomoléculas, y que fueron previamente esterilizados mediante radiación gamma, después de 24 horas de cultivo, se hará una evaluación de la viabilidad celular y de la citotoxicidad ocasionada por las matrices.

8. Resultados

En este proyecto de investigación, se optimizó la extracción de almidón extraído a partir de residuos de papa de origen agroindustriales de la zona agrícola de la provincia de Cartago desechos para la síntesis de andamios porosos tridimensionales. El almidón obtenido a partir del material desechado de papa está en el rango de $7,82 \pm 0,10\%$, y se determinó que el grado de amilosa es de $26,1 \pm 1,8\%$, lo que está de acuerdo con los valores reportados en la literatura [31]. El almidón extraído se utilizó para generar un criogel a base de almidón a partir de una retrogradación de una solución acuosa y un proceso de liofilización.



Figura 1. (Izquierda) Papa de desecho obtenida en el mercado central de Cartago según acuerdo R-CM-ITCR-002-2023-OT-CONAGEBIO. (Derecha) Criogel de almidón empleado en este proyecto.

Los materiales porosos obtenidos presentaron características físicas similares a los fabricados previamente a partir de almidón comercial [32], lo que constituye una estrategia innovadora para procesar residuos de biomasa en productos de valor agregado. Los criogeles se prepararon a partir de dispersiones acuosas al 9 % del almidón extraído para luego retro degradarlos y por medio de liofilización generar el material poroso. Las propiedades de los criogeles resultantes para cada etapa de síntesis se muestran en figura 1. La muestra presentó baja densidad aparente (ρ_{bulk}) y una porosidad similares a los resultados de informes anteriores que utilizaron una concentración similar de almidón de maíz [33]. El área superficial (BET) resultó baja ($6,899 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$), con espectros de infrarrojo y los datos térmicos acordes con el material de partida.

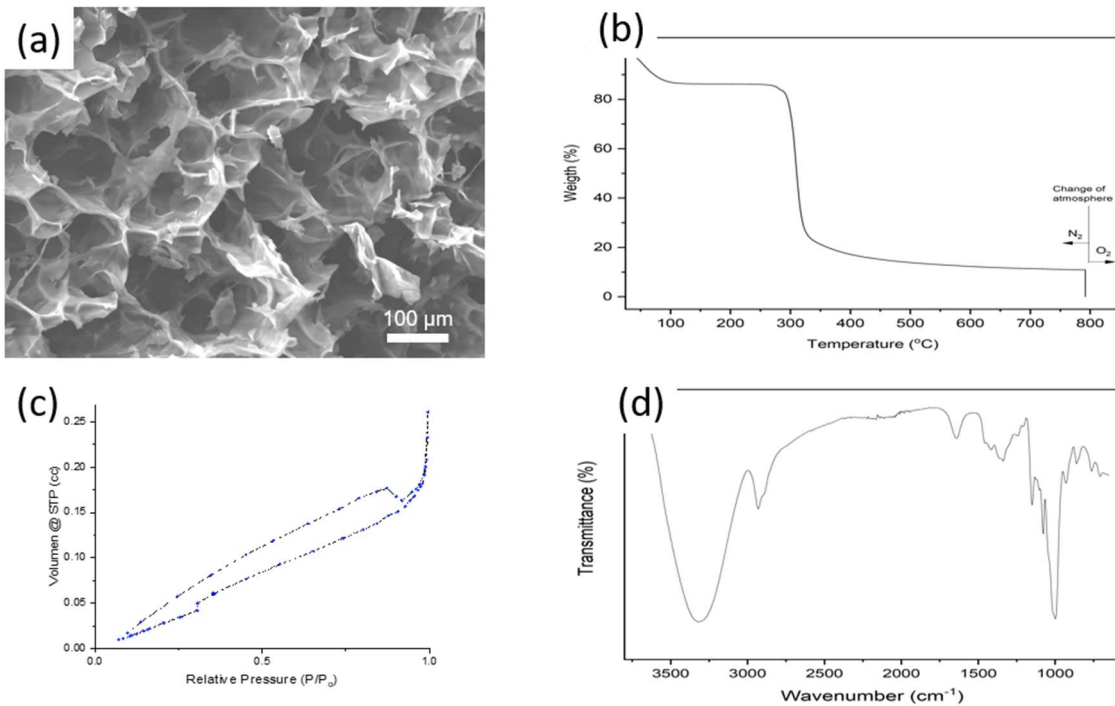


Figura 2: Caracterización del almidón estructurado obtenido de la papa de desecho: (a) microscopía de barrido, (b) análisis termogravimétrico, (c) adsorción/desorción de nitrógeno y (d) espectro de infrarrojo. Adaptado de [34]

Los criogel funcionaron como sustratos para la deposición del polímero conductor y esto se confirmó con análisis elemental confirmando la presencia de azufre además de una caracterización por espectroscopia de impedancia (EIS). La caracterización por espectroscopia de impedancia eléctrica de los compuestos porosos se realizó utilizando un modelo previo [32], que incluía fenómenos de transferencia de masa, efectos de la distribución de estados de energía, la porosidad de los materiales y la conductividad eléctrica. Los ajustes a dicho modelo se pueden ver en la siguiente tabla:

Tabla 1. Ajuste de datos de espectroscopia de impedancia electroquímica a una muestra de criogel polimerizado con PEDOT, utilizando el modelo de circuito R(RQ)(RQ). (modificado de [34])

Circuit element	PEDOT
Rs1 (Ω)	1.5582E ⁵
Rp1 (Ω)	1.993E ⁵
CPE1 (F)	6.516E ⁻¹⁰
CPE1.N	0.82964
Rs2 (Ω)	2627.4
Rp2 (Ω)	1.9695E ⁵
CPE2 (F)	1.0885E ⁻¹¹
CPE2.N	0.81716

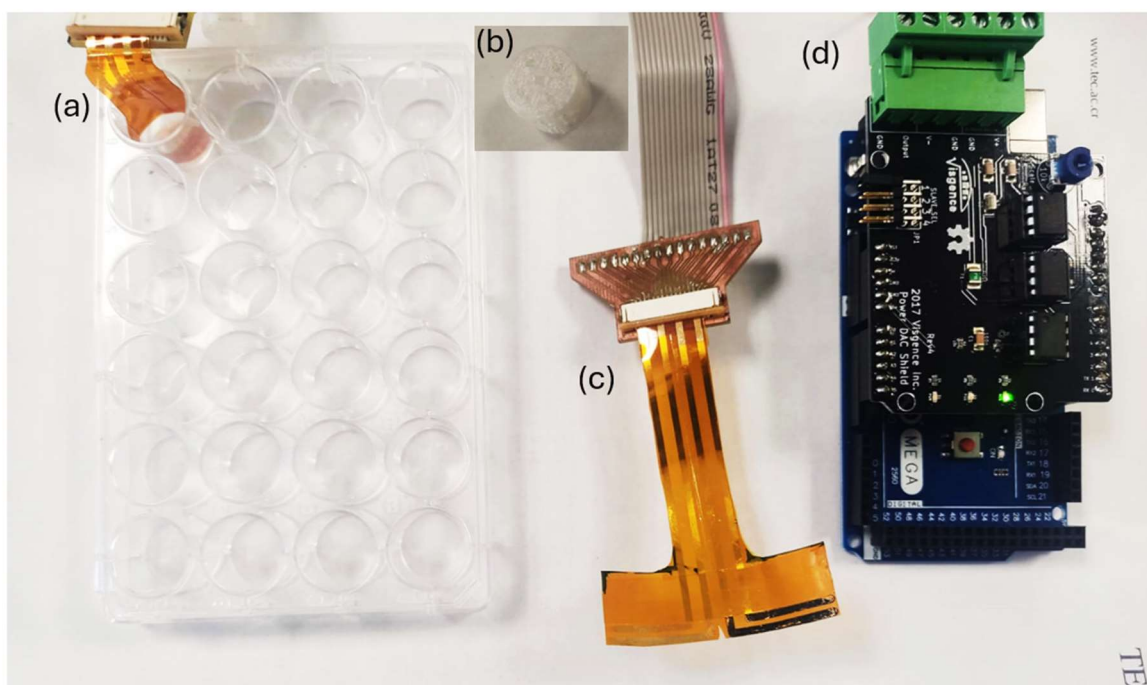


Figura 3: Sistema de electroestimulación: (a) Electrodo colocado en el posillo, (b) soporte de muestra de posillo fabricado por impresión 3D y diseñado por el Ing. Sebastian León, (c) Electrodo modificado utilizado en la estimulación del posillo diseñado: Ing. Sebastian León Fabricado: Dr. Esteban Avendaño UCR y (d) sistema portátil de estimulación, fabricado por el Dr. Juan Jose Montero.

Una caracterización exhaustiva del mecanismo de polimerización y del material obtenido se realizó en el artículo que recopila en detalle el proceso de síntesis [34]. Además, el sistema de electroestimulación empleado se presenta en la figura 3.

En este trabajo, se estudió el efecto de la dexametasona 21-fosfato (Dex) como el agente de diferenciación de osteoblastos, se incorporó durante la preparación del criogel [35]. La cantidad de fármaco liberado se determinó mediante voltamperometría cíclica y espectrometría de masas de alta resolución. Los resultados obtenidos relacionados con la liberación in vitro de Dexametasona a partir de los criogeles a base de polisacáridos producidos se muestran en la Figura 4. Las formulaciones de criogeles lograron alcanzar su tasa máxima de liberación del fármaco durante las primeras seis horas de análisis, seguidas de una liberación sostenida en las siguientes 24 horas, liberando un aproximado del 28% al 35% del fármaco total después de 4 días.

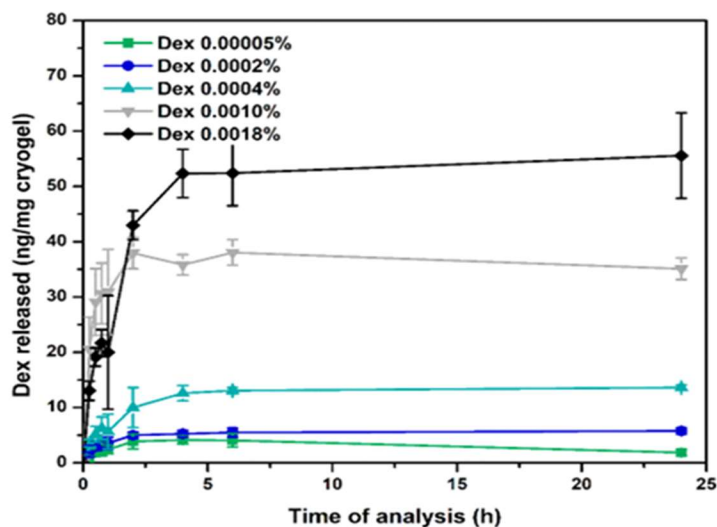


Figura 4. Perfiles de liberación de dexametasona de materiales porosos St/kC/Dex que contienen de 0,00005 % a 0,0018 % en masa de dexametasona-21 fosfato, liberado en acetato de amonio 0,1 M, pH 7,2 a 37 °C y 100 rpm durante 24 horas. (imagen tomada de [35])

En este trabajo, se cuantificó que la cantidad de fármaco liberado del criogel que contiene Dexametasona al 0,00005 % en masa está en el rango de $1,85 \pm 0,55$ ng de fármaco por mg de andamio poroso, de modo que, se necesitan aproximadamente ≥ 25 mg de criogel para liberar las células en concentraciones apropiadas (100 nM) de fármaco en placas de cultivo de 24 pocillos. Las dosis de Dex para promover la diferenciación de células madre mesenquimales en osteoblastos durante el cultivo in vitro son efectivas a niveles de 100 a 1000 nM. En este trabajo, se demostró que al menos 25 mg de criogel de la concentración de fármaco más baja son necesarios para lograr estimular las células madre durante su cultivo, e inducir respuestas para diferenciación a tejido óseo.

Como se ejemplifica en la figura 5, se evaluó la biocompatibilidad de las estructuras recubiertas con el polímero conductor PEDOT.

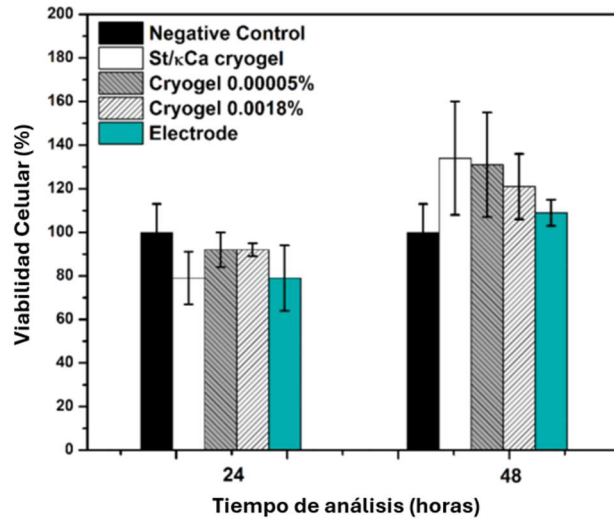
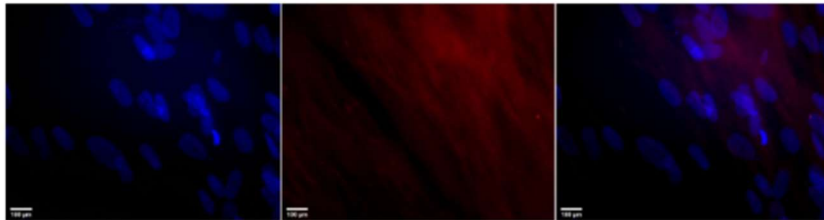


Figura 5. Análisis de biocompatibilidad de criogeles a base de almidón y electrodo modificado con PEDOT/κC/Dex utilizando el ensayo CCK-8 en cultivo de hMSC. (imagen modificada de [35])

(a)



(b)

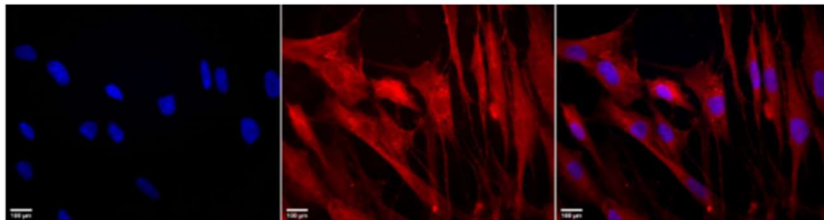


Figura 6. Análisis de inmunofluorescencia de hMSC usando anticuerpo anti-OPN después de estimulación bioquímica inducida por dexametasona 21-fosfato y heparina: a. Control negativo, y b. 25 mg Dex 0,00005% criogel + Hep 0,5 UI·mL⁻¹. (imagen modificada de [35])

Los resultados de la Figura 6 confirman que OPN se expresó en todas las muestras bajo estimulación con Dex el día 14, incluido el control negativo, lo que confirma la diferenciación de osteoblastos. Los resultados de esta etapa se requieren validar con experimentación adicional y lograr generar una publicación que confirme la funcionalidad del sistema generado en esta investigación.

9. Discusión y conclusiones

Respecto al objetivo 1 del proyecto Obtener de un biopolímero de interés para la generación de un sistema de liberación controlada de un sustrato de origen agroindustrial, se puede indicar que como evidencia se obtuvo un almidón a partir del de papa desecho con rendimiento cercano a lo reportado en la literatura [31]. El almidón extraído se utilizó con éxito en la preparación de criogeles a partir de una retrogradación de una solución acuosa y un proceso de liofilización similar a previas investigaciones [32], [36]. Los materiales porosos obtenidos presentaron propiedades físicas similares a los fabricados previamente a partir de almidón comercial [32] (ver Figura 1), exhibiendo una estrategia novedosa para procesar residuos de biomasa en productos de valor agregado. La conversión de desechos de papa en un compuesto poroso conductor es un ejemplo de la potencial preparación de materiales innovadores que equilibren el progreso y sostenibilidad en un marco de economía circular. Nuestro trabajo brinda información sobre la metodología para funcionalizar el almidón obtenido de residuos de biomasa mediante polimerización química de poli (3,4-etilendioxitiofeno) directamente sobre el sustrato.

Los resultados del objetivo 2 del proyecto Sintetizar sustratos porosos para aplicaciones biomédicas, se puede evidenciar mediante la caracterización térmica y espectrométrica de los compuestos generados. Los resultados reportados en la referencia [34] nos permite evaluar el efecto del proceso de deposición del polímero conductor y constatar las mejores condiciones experimentales en la respuesta eléctrica del material. Además, hemos confirmado mediante microscopía electrónica y nitrógeno que la estructura mantiene su estructura porosa lo cual es crítico en la aplicación estudiada. El estudio de Fisisorción de la plantilla confirma que la estructura resistió el proceso de polimerización y estos resultados coincidieron con informes anteriores que utilizaron una concentración similar de almidón de maíz [33] y para estructuras tridimensionales PEDOT [37]. Estos materiales porosos electro-conductores polimerizados con PEDOT se proponen como estructuras potenciales durante la estimulación eléctrica de las células para la regeneración de tejidos y como sistemas de administración de fármacos [38]–[40], lo que convierte en un sistema interesante para incorporar en cultivos de MSC y con ello inducir su diferenciación. Dexametasona se incluyó con éxito en una formulación y protocolo de preparación de criogeles. Estos mostraron propiedades físicas adecuadas en términos de porosidad, tamaño de poro, degradación y cinética de hinchamiento para ser utilizados como sistemas de liberación controlada de fármacos para ser aplicados *in vitro* e *in vivo* y como matrices extracelulares tridimensionales.

Para evidenciar el desarrollo del objetivo 3 Evaluar la eficacia de los sistemas porosos fabricados a partir de biopolímeros en aplicaciones de cultivo celular y como sistemas de liberación de biomoléculas. Es importante indicar que el uso de andamios diseñados con materiales bioactivos permitiría facilitar la formación de tejidos funcionales. La diferenciación de las hMSC en diferentes linajes se puede inducir incorporando agentes bioquímicos al medio de cultivo. Dado esto, el estudio del papel *in vitro* de la liberación controlada de un agente bioactivo en la proliferación y diferenciación de células del linaje osteogénico, puede ser un enfoque prometedor para el futuro diseño y desarrollo de andamios que permitan el establecimiento y diferenciación celular. La fijación y liberación de algunas biomoléculas fueron realizadas en trabajo. Este ensayo permite concluir que, al igual que los electrodos [41], los criogeles influyen en la diferenciación de las hMSC [42], aumentando la expresión de marcadores maestros de regulación osteoblástica como la proteína OPN. Las pruebas de biocompatibilidad confirman que las matrices formuladas son aptas para los estudios planteados.

Nuestro trabajo nos permite optimizar la técnica de oxidación *in situ* como estrategia para funcionalizar biopolímeros obtenidos a partir de residuos de biomasa, donde posteriormente se realiza la polimerización química del poli(3,4-etilendioxitiofeno) directamente sobre el sustrato. Finalmente, se concluye que la extracción de biopolímeros para aplicaciones de alto valor agregado puede por sus propiedades ser de gran interés para una amplia audiencia, incluidas aplicaciones electrónicas, ambientales y biológicas. Es requerida experimentación adicional para optimizar el material poroso conductor como un sistema que genere una diferenciación selectiva en cultivo de células madre.

10. Recomendaciones

Una evaluación de la respuesta mecánica de los materiales producidos a macro y microescala permitiría cuantificar el posible efecto en la diferenciación de células madre. Esta línea de trabajo requiere de personal altamente entrenado, líneas celulares y equipo que la institución debe promover a su adquisición y mantenimiento. Hemos experimentado una migración de personal de este perfil biomédico a otros sectores productivos, lo que resta las capacidades de nuestra institución para realizar bioensayos en aplicaciones relacionadas con la salud humana. Los resultados de este proyecto requieren validación con experimentación adicional. El uso de biomasa es de gran interés a nivel mundial, pero la ausencia de investigación de punta que permita estudiar su uso y aplicación afecta el desarrollo de estas líneas de investigación.

11. Agradecimientos

Karla Ramirez Sanchez quiere agradecer a la Dra. Monica Prado de la Facultad de Microbiología por el apoyo como tutora de la tesis “*Efecto de la liberación controlada de moléculas cargadas sobre la diferenciación de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) a osteoblastos*” y la Dra. Ines Ardao de la Universidad de Santiago de Compostela como lectora. Le agradecemos a la Ing. Laria Rodriguez por todo el apoyo en el proceso de investigación. Le agradecemos al Dr. Juan José Montero por su apoyo en el diseño del sistema de estimulación celular. Se le agradece al estudiante Anthony Ramirez Ugalde y al Dr. Giovanni Saenz Arce por el apoyo técnico durante los análisis SEM del Departamento de Física, (Universidad Nacional). Además, se debe agradecer al Centro de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Materiales (CICIMA, Universidad de Costa Rica) y al Centro de Investigación en Innovación Forestal (CIF, Instituto Tecnológico de Costa Rica) por su apoyo en la caracterización de algunas muestras. Sebastián L-Carvajal agradecen a la Maestría en Dispositivos Médicos y a la Oficina de Posgrado del TEC por la beca otorgada durante este proyecto. Se le agradece el apoyo de la Ing. Maria Paula Palma por el apoyo en la preparación de muestras. Este trabajo se llevó a cabo en el marco de la Acción COST “Ingeniería e investigación avanzadas de aeroGels para el medio ambiente y las ciencias de la vida” (AERoGELS. CA18125).

12. Referencias

- [1] Instituto Nacional de Estadística y Censos, “ANUARIO ESTADÍSTICO - AGROPECUARIO,” Agropecuario 05 Costa Rica: Área sembrada y producción de la papa según provincia y cantón, por año. 2019-2020.
- [2] F. A. Showkat Bhawani, Anish Khan, *Extraction of Natural Products from Agro-industrial Wastes*. Elsevier Science, 2021.
- [3] R. Akhtar, M. J. Sherratt, J. K. Cruickshank, and B. Derby, “Characterizing the elastic properties of tissues,” *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 96–105, 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70059-1.
- [4] L. Zhang and T. J. Webster, “Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration,” *Nano Today*, vol. 4, no. 1, pp. 66–80, 2009. doi: 10.1016/j.nantod.2008.10.014.
- [5] F. Pires, Q. Ferreira, C. A. V Rodrigues, J. Morgado, and F. C. Ferreira, “Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the

use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering," *BBA - Gen. Subj.*, vol. 1850, no. 6, pp. 1158–1168, 2015, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.01.020.

- [6] W. Guo *et al.*, "Self-Powered Electrical Stimulation for Enhancing Neural Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Graphene– Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Hybrid Microfibers," *ASC Nano*, 2016, doi: 10.1021/acsnano.6b00200.
- [7] K. Ramírez-Sánchez *et al.*, "Biosensor based on the directly enzyme immobilization into a gold nanotriangles/conductive polymer biocompatible coat for electrochemical detection of Chlorpyrifos in water," *Med. DEVICES SENSORS*, vol. 2, no. 5–6, Oct. 2019, doi: 10.1002/mds3.10047.
- [8] R. Starbird, W. H. Krautschneider, G. Blume, and W. Bauhofer, "In Vitro Biocompatibility Study and Electrical Properties of the PEDOT, PEDOT Collagen-Coat, PEDOT Nanotubes and PEDOT Aerogels for Neural Electrodes," in *Biomedical Engineering*, Calgary, AB, Canada, AB, Canada: ACTAPRESS, Feb. 2013, pp. 320–326. doi: 10.2316/P.2013.791-072.
- [9] D. Hardy *et al.*, "Comparative study of injury models for studying muscle regeneration in mice," *PLoS One*, vol. 11, no. 1, pp. 1–24, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0147198.
- [10] J. M. Gutiérrez, T. Escalante, R. Hernández, S. Gastaldello, P. Saravia-Otten, and A. Rucavado, "Why is skeletal muscle regeneration impaired after myonecrosis induced by viperid snake venoms?," *Toxins (Basel)*, vol. 10, no. 5, pp. 1–21, 2018, doi: 10.3390/toxins10050182.
- [11] H. Park *et al.*, "Effects of electrical stimulation in C2C12 muscle constructs," *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 2, no. 5, pp. 279–287, Jul. 2008, doi: 10.1002/term.93.
- [12] V. Hosseini *et al.*, "Engineered contractile skeletal muscle tissue on a microgrooved methacrylated gelatin substrate," *Tissue Eng. - Part A*, vol. 18, no. 23–24, pp. 2453–2465, 2012, doi: 10.1089/ten.tea.2012.0181.
- [13] Barbara M. Doucet, A. Lam, and L. Griffin, "Neuromuscular Electrical Stimulation for Skeletal Muscle Function," *YJBM*, vol. 85, no. 2, pp. 201–215, 2012.
- [14] C. Zhang and W. Wang, "Regulation of C2C12 Differentiation and Control of the Beating Dynamics of Contractile Cells for a Muscle-Driven Biosyncretic Crawler," vol. 00, no. 00, pp. 1–13, 2018, doi: 10.1089/soro.2018.0017.
- [15] K. Ramírez-Sánchez *et al.*, "Control of C2C12 myoblast cells growth and their differentiation into myotubes by electrical impedance spectroscopy and electric field stimulation on a patterned gold electrode," in *Society for Muscle biology. Frontiers in Myogeneses meeting.*, San José, Costa Rica, 2019.
- [16] P. C. Sherrell *et al.*, "Maintaining cytocompatibility of biopolymers through a graphene layer for electrical stimulation of nerve cells," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 24, no. 6, pp. 769–776, 2014, doi: 10.1002/adfm.201301760.
- [17] S. Stratton, N. B. Shelke, K. Hoshino, S. Rudraiah, and S. G. Kumbar, "Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering," *Bioact. Mater.*, vol. 1, no. 2, pp. 93–108, 2016, doi: 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001.
- [18] A. K. Gaharwar *et al.*, "Bioactive Silicate Nanoplatelets for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells," *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 24, pp. 3329–3336, 2013, doi: 10.1002/adma.201300584.
- [19] D. Barati *et al.*, "Spatiotemporal release of BMP-2 and VEGF enhances osteogenic and

vasculogenic differentiation of human mesenchymal stem cells and endothelial colony-forming cells co-encapsulated in a patterned hydrogel,” *J. Control. Release*, 2015, doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.031.

- [20] I. A. Paun *et al.*, “Electrically responsive microreservoirs for controllable delivery of dexamethasone in bone tissue engineering,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 392, pp. 321–331, 2017, doi: 10.1016/j.apsusc.2016.09.027.
- [21] Q. Liu *et al.*, “The role of the extracellular signal-related kinase signaling pathway in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells and in adipogenic transition initiated by dexamethasone,” *Tissue Eng. - Part A*, vol. 15, no. 11, pp. 3487–3497, 2009, doi: 10.1089/ten.tea.2009.0175.
- [22] P. F. Costa, A. M. Puga, L. Díaz-Gomez, A. Concheiro, D. H. Busch, and C. Alvarez-Lorenzo, “Additive manufacturing of scaffolds with dexamethasone controlled release for enhanced bone regeneration,” *Int. J. Pharm.*, vol. 496, no. 2, pp. 541–550, 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.055.
- [23] R. M. Samsonraj, M. Raghunath, V. Nurcombe, J. H. Hui, A. J. van Wijnen, and S. M. Cool, “Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine,” *Stem Cells Transl. Med.*, vol. 6, no. 12, pp. 2173–2185, 2017, doi: 10.1002/sctm.17-0129.
- [24] T. Squillaro, G. Peluso, and U. Galderisi, “Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update,” *Cell Transplant.*, vol. 25, no. 5, pp. 829–848, 2016, doi: 10.3727/096368915x689622.
- [25] J. M. Barnes, L. Przybyla, and V. M. Weaver, “Tissue mechanics regulate brain development, homeostasis and disease,” *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 1, pp. 71–82, 2017, doi: 10.1242/jcs.191742.
- [26] D. E. Discher, P. Janmey, and Y. L. Wang, “Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate,” *Science*, vol. 310, no. 5751, pp. 1139–1143, 2005. doi: 10.1126/science.1116995.
- [27] M. Tsai, W. Li, R. S. Tuan, and W. H. Chang, “Modulation of Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells by Specific Pulsed Electromagnetic Field Stimulation,” *J. Orthop. Res.*, vol. 27, no. 9, pp. 1169–1174, 2009, doi: <https://doi.org/10.1002/jor.20862>.
- [28] N. A. Twine, L. Harkness, J. Adjaye, A. Aldahmash, M. R. Wilkins, and M. Kassem, “Molecular Phenotyping of Telomerized Human Bone Marrow Skeletal Stem Cells Reveals a Genetic Program of Enhanced Proliferation and Maintenance of Differentiation Responses,” *JBMR Plus*, vol. 2, no. 5, pp. 257–267, 2018, doi: 10.1002/jbm4.10050.
- [29] L. Goimil *et al.*, “Preparation and stability of dexamethasone-loaded polymeric scaffolds for bone regeneration processed by compressed CO₂ foaming,” *J. CO₂ Util.*, vol. 24, no. December 2017, pp. 89–98, 2018, doi: 10.1016/j.jcou.2017.12.012.
- [30] O. K. Abegunde, T. Mu, J. Chen, and F. Deng, “Food Hydrocolloids Physicochemical characterization of sweet potato starches popularly used in Chinese starch industry,” *Food Hydrocoll.*, vol. 33, no. 2, pp. 169–177, 2013, doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.03.005.
- [31] A. B. Altemimi, “Extraction and optimization of potato starch and its application as a stabilizer in yogurt manufacturing,” *Foods*, vol. 7, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.3390/foods7020014.
- [32] R. Zamora-Sequeira, I. Ardao, R. Starbird, and C. A. C. A. García-González, “Conductive nanostructured materials based on poly-(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) and starch/k-carrageenan for biomedical applications,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 189, pp. 304–312, 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.02.040.

- [33] C. A. García-González and I. Smirnova, "Use of supercritical fluid technology for the production of tailor-made aerogel particles for delivery systems," *J. Supercrit. Fluids*, vol. 79, pp. 152–158, Jul. 2013, doi: 10.1016/j.supflu.2013.03.001.
- [34] L. Rodríguez-Quesada *et al.*, "Evaluating the Effect of Iron(III) in the Preparation of a Conductive Porous Composite Using a Biomass Waste-Based Starch Template," *Polymers (Basel)*, 2023, doi: 10.3390/polym15112560.
- [35] K. S. Ramírez Sánchez, "Efecto de la liberación controlada de moléculas cargadas sobre la diferenciación de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) a osteoblastos," Universidad de Costa Rica, 2022. Accessed: Jan. 30, 2024. [Online]. Available: <https://kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/88104>
- [36] F. Alvarado-Hidalgo, K. Ramírez-Sánchez, and R. Starbird-Perez, "Smart porous multi-stimulus polysaccharide-based biomaterials for tissue engineering," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 25, no. 22. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 5286, Nov. 13, 2020. doi: 10.3390/molecules25225286.
- [37] X. Zhang, C. Li, and Y. Luo, "Aligned/unaligned conducting polymer cryogels with three-dimensional macroporous architectures from ice-segregation-induced self-assembly of PEDOT-PSS," *Langmuir*, vol. 27, no. 5, pp. 1915–1923, Mar. 2011, doi: 10.1021/la1044333.
- [38] M. Solazzo, K. Krukiewicz, A. Zhussupbekova, K. Fleischer, M. J. Biggs, and M. G. Monaghan, "PEDOT:PSS interfaces stabilised using a PEGylated crosslinker yield improved conductivity and biocompatibility," *J. Mater. Chem. B*, 2019, doi: 10.1039/c9tb01028a.
- [39] A. G. Guex *et al.*, "Highly porous scaffolds of PEDOT:PSS for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 62, pp. 91–101, 2017, doi: 10.1016/j.actbio.2017.08.045.
- [40] A. Babaie *et al.*, "Synergistic effects of conductive PVA/PEDOT electrospun scaffolds and electrical stimulation for more effective neural tissue engineering," *Eur. Polym. J.*, 2020, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110051.
- [41] K. R. Sánchez, A. Ledezma-Espinoza, A. Sánchez-Kopper, E. Avendaño-Soto, M. Prado, and R. S. Perez, "Polysaccharide κ -carrageenan as doping agent in conductive coatings for electrochemical controlled release of dexamethasone at therapeutic doses," *Molecules*, vol. 25, no. 9, p. 2139, May 2020, doi: 10.3390/molecules25092139.
- [42] C. Kleber, K. Lienkamp, J. Rühle, and M. Asplund, "Electrochemically Controlled Drug Release from a Conducting Polymer Hydrogel (PDMAAp/PEDOT) for Local Therapy and Bioelectronics," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 8, no. 10, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1002/adhm.201801488.

13. Apéndices

Apéndice 1

Rodríguez-Quesada, L., Ramírez-Sánchez, K., León-Carvajal, S., Sáenz-Arce, G., Vásquez-Sancho, F., Avendaño-Soto, E., ... & Starbird-Perez, R. (2023). Evaluating the Effect of Iron (III) in the Preparation of a Conductive Porous Composite Using a Biomass Waste-Based Starch Template. *Polymers*, 15(11), 2560.

DOI: 10.3390/polym15112560

<https://www.mdpi.com/2073-4360/15/11/2560#>

Apéndice 2

Ramírez Sánchez, K. S. Efecto de la liberación controlada de moléculas cargadas sobre la diferenciación de células madre mesenquimales humanas (hMSCs) a osteoblastos. (2022) Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica.

<https://kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/88104>