



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO



UNIVERSIDAD TÉCNICA
FEDERICO SANTA MARÍA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO
UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA
PROGRAMA CONJUNTO DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA

**Desarrollo de un *scaffold* de celulosa bacteriana de nanofibras alineadas
para el cultivo de células musculares**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Darlyn Lisette Riquelme Montanares

Director de Tesis: Dr. Cristian Acevedo

Co-tutor: Dr. Franck Quero

Septiembre, 2025



CONSTANCIA DE VALIDACIÓN Y CONFIDENCIALIDAD DE MONOGRAFÍA A REPOSITORIO ACADÉMICO

1.- IDENTIFICACIÓN DEL TRABAJO ACADÉMICO

Tipo de monografía (marcar una opción): ☐ Memoria o trabajo de título ☒ Tesis de Postgrado

Título del trabajo:

Desarrollo de un *scaffold* de celulosa bacteriana de nanofibras alineadas para el cultivo de células musculares

Nombre del candidata): Darlyn Lisette Riquelme Montanares

Carrera / Grado: Doctorado

Campus: Casa Central

Departamento: Doctorado en Biotecnología

2.- VALIDACIÓN DEL PROFESOR GUÍA/DIRECTOR DE TESIS

Yo, Cristian Acevedo, en mi calidad de profesor(a) guía/director(a) del trabajo académico mencionado anteriormente

DEJO CONSTANCIA que:

- He revisado esta versión del documento y corresponde a la versión final aprobada del trabajo.
- El trabajo cumple con los requisitos académicos y de formato establecidos por la institución.

3.- EVALUACIÓN DE CONFIDENCIALIDAD POR PROPIEDAD INDUSTRIAL (marcar una opción)

☒ El trabajo **NO contiene** información que amerite confidencialidad y puede ser publicado de inmediato en repositorio con acceso abierto.

☐ El trabajo contiene información con potenciales implicancias de propiedad industrial o intelectual y requiere un periodo de confidencialidad (**embargo**) por (**marcar una opción**):

☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ 2 años ☐ 3 años ☐ 5 años ☐ 10 años

Fundamentación de la necesidad de confidencialidad (obligatorio si se solicita embargo):



4.- FIRMAS

Profesor(a) guía o director(a) de memoria o tesis:

Fecha: 3 septiembre 2026 **Firma:**

SUSAN AGUIRRE

Estudiante o Candidato(a):

[Firma manuscrita]

Fecha: 3 septiembre 2026 **Firma:**

Este formulario debe ser insertado como página 2 de la memoria o tesis, completado y firmado por estudiante y profesor(a) antes de la entrega en portal PRISMA de Biblioteca USM.

Comisión evaluadora

Dra. Claudia Altamirano.

Dr. Javier Enrione.

Dr. Nelson Osses.

Dr. Ricardo Ceriani.

Sin prisa, pero sin pausa.

Resumen

Los *scaffolds* basados en celulosa bacteriana (CB) representan una alternativa altamente prometedora en ingeniería de tejidos, al ofrecer estructuras biomiméticas capaces de imitar la matriz extracelular y favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación de células musculares. La presente tesis tuvo como objetivo desarrollar un *scaffold* de nanofibras alineadas de CB, obtenido mediante la aplicación sinérgica de un campo eléctrico durante su biosíntesis y un posterior proceso de tracción mecánica, con el fin de optimizar la orientación celular *in-vitro*.

Para ello, se diseñó y fabricó una cámara de microcrecimiento con electrodos de grafito, que permitió aplicar de manera controlada un campo eléctrico durante la producción de CB. A través de simulaciones, se establecieron las condiciones óptimas de intensidad y distribución del campo, logrando inducir una orientación dirigida de las nanofibras en la zona central del *scaffold*. Posteriormente, el material fue sometido a ciclos de tracción mecánica, lo que potenció la alineación fibrilar, verificada mediante microscopía electrónica de barrido y análisis de coherencia angular. La caracterización química mediante FTIR-ATR confirmó la preservación de la estructura molecular de la celulosa, mientras que las isothermas de adsorción de vapor demostraron que las propiedades higroscópicas del material permanecieron intactas, un factor esencial para la retención de nutrientes en el cultivo celular. La biocompatibilidad fue evaluada mediante ensayos de citotoxicidad (WST-1), comprobándose, además, con la línea celular C2C12, que la superficie alineada de los *scaffolds* favorece la adhesión y promueve la diferenciación miogénica. Los resultados evidencian que la aplicación combinada de campo eléctrico y tracción mecánica genera *scaffolds* con una orientación nanofibrilar significativamente superior respecto a los controles, lo que se traduce en un incremento de sus propiedades mecánicas y en la creación de un microambiente más favorable para el desarrollo y maduración de células musculares.

En conclusión, el proceso integrado de aplicación de campo eléctrico a la biosíntesis de CB y su posterior tracción mecánica constituye una estrategia eficaz para la fabricación de *scaffolds* de nanofibras altamente orientados y con gran potencial de aplicación en Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) based scaffolds represent a highly promising alternative in tissue engineering, offering biomimetic structures capable of mimicking the extracellular matrix and promoting muscle cell adhesion, proliferation, and differentiation. The objective of this thesis was to develop a scaffold of aligned BC nanofibers, obtained through the synergistic application of an electric field during biosynthesis and a subsequent mechanical traction process, to optimize cell orientation in vitro.

To this end, a micro growth chamber with graphite electrodes was designed and manufactured, allowing for the controlled application of an electric field during BC production. Through simulations, optimal field intensity and distribution conditions were established, successfully inducing a directed orientation of the nanofibers in the central region of the scaffold. The material was subsequently subjected to mechanical traction cycles, which enhanced fibrillar alignment, verified by scanning electron microscopy and angular coherence analysis. Chemical characterization using FTIR-ATR confirmed the preservation of the cellulose molecular structure, while vapor adsorption isotherms demonstrated that the material's hygroscopic properties remained intact, an essential factor for nutrient retention in cell culture. Biocompatibility was evaluated using cytotoxicity assays (WST-1), and it was also confirmed, using the C2C12 cell line, that the aligned surface of the scaffolds favors adhesion and promotes myogenic differentiation. The results show that the combined application of an electric field and mechanical traction generates scaffolds with a significantly higher nanofibrillar orientation compared to controls, which translates into an increase in their mechanical properties and the creation of a more favorable microenvironment for the development and maturation of muscle cells. In conclusion, the integrated process of applying an electric field to CB biosynthesis and its subsequent mechanical traction constitutes an effective strategy for the manufacture of highly oriented nanofiber scaffolds with great application potential in tissue engineering and regenerative medicine.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mis profesores guía Dr. Cristian Acevedo, perteneciente al del Centro de Biotecnología Daniel Alkalay Lowitt y Co-guía Dr. Frank Quero perteneciente a la Universidad de Chile, por su colaboración y apoyo durante este proyecto. Al Dr. Ricardo Henríquez del Departamento de Física USM, por su colaboración y apoyo durante este proyecto en su fase inicial. Al Dr. Paulo Díaz de la Universidad de los Andes, por su apoyo en los experimentos de FTIR y sorción de agua. Al Dr. Tomás Corrales por colaborar con la obtención de las imágenes SEM presentadas en esta tesis.

Por otro lado, agradecer al laboratorio de Biofilms bacterianos dirigido por la Dra. Paola Scavone del Instituto Clemente Estable, Uruguay por su apoyo en la cuantificación de lipopolisacáridos.

El financiamiento de la Beca de Doctorado Nacional ANID convenio #1182021221469, el programa PIIC /2023 de la Dirección de Postgrado de la Universidad Técnica Federico Santa María, y al proyecto Fondecyt Regular 1190100.

Un especial agradecimiento a mi familia compuesta por mi hijo Benjamín León y mi pareja Nicolás, a mis padres Juan y Verónica, y mis hermanos. A mis amigos del doctorado y compañeros de laboratorio CBDAL, por el cariño y apoyo durante estos años.

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Miogénesis	18
2.2. Líneas celulares	20
2.3. Músculo esquelético.	21
2.4. Ingeniería de tejidos	22
2.5. Ingeniería de Tejidos en Músculo Esquelético	23
2.6. Celulosa	24
2.7. Celulosa bacteriana	25
2.8. Métodos de alineación de nanofibras de celulosa bacteriana	26
2.9. Alineación de nanofibras de celulosa bacteriana mediante la aplicación de campos eléctricos	27
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Diseñar una metodología de producción de CB bajo la aplicación de campo eléctrico	29
4.1.1. Condiciones de cultivo <i>Komagataeibacter sucrofermentans</i>	29
4.1.2. Diseño de cámara micro crecimiento: simulaciones de campo eléctrico	31
4.1.3. Selección de dimensiones	32
4.1.4. Selección y validación de materiales para electrodos	33
4.1.5. Sistema de aplicación de campo eléctrico.....	34
4.1.6. Condiciones de campo eléctrico	34
4.1.7. Purificación, secado y cortado de las muestras.....	35
4.1.8. Determinación y cuantificación de lipopolisacáridos (LPS) presente en CB. ...	36
4.2. Desarrollar un método de tracción mecánica para alinear nanofibras CB	37
4.2.1. Ensayos de tracción en <i>scaffolds</i> de CB	37
4.2.3. Determinación del módulo de Young	38
4.3. Estudiar el efecto sinérgico entre la electroestimulación y la tracción mecánica para la producción de un <i>scaffolds</i> de nanofibras de CB.	39
4.3.1. Estudio del alineamiento de las nanofibras a través de microscopía electrónica de barrido (SEM)	39
4.3.2. Análisis de orientación de fibra	40
4.3.3. Estudio de morfología de las nanofibras mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)	41

4.3.4.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	42
4.3.5.	Determinación del Índice de Cristalinidad mediante ATR-FTIR.....	42
4.3.6.	Isotermas de sorción de agua.....	43
4.3.7.	Evaluación de interacción entre factores.....	45
4.4.	Evaluar la biocompatibilidad del <i>scaffolds</i> en un modelo <i>in-vitro</i> de células musculares.	45
4.4.1.	Condiciones de cultivo de células musculares	45
4.4.2.	Ensayo de citotoxicidad <i>in-vitro</i>	46
4.4.3.	Evaluación morfología celular	47
4.4.4.	Inmunofluorescencia.....	48
5.	RESULTADOS.....	49
5.1.	Condiciones de cultivo control <i>Komagataeibacter sucrofermentans</i>	49
5.2.	Diseño de cámara micro crecimiento y simulación de campo eléctrico	50
5.2.1.	Evaluación visual de materiales de electrodos en medio de cultivo bajo campo eléctrico.....	52
5.2.2.	Efecto del campo eléctrico en la producción de CB	54
5.2.3.	Simulación del campo eléctrico aplicado en la microcámara.....	56
5.2.4.	Biosíntesis de celulosa bacteriana bajo inducción de campo eléctrico	58
5.2.5.	Determinación de LPS presente en muestras de celulosa bacteriana.....	59
5.3.	Caracterización nanométrica de la CB mediante microscopía de fuerza atómica (AFM).....	61
5.4.	Caracterización del comportamiento mecánico de CB bajo tracción uniaxial	62
5.5.	Evaluación de interacción entre factores: campo eléctrico y tracción mecánica	65
5.5.1.	Microscopia electrónica de barrido SEM.	66
5.6.	Análisis de sorción de vapor dinámico	73
5.7.	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	76
5.8.	Índice de cristalinidad	78
5.9.	Proliferación de células musculares.....	79
5.10.	Ensayo de inmunofluorescencia para evaluación de diferenciación miogénica	80
6.	DISCUSIÓN.....	82
7.	CONCLUSIONES	90
8.	RECOMENDACIONES	91

9. REFERENCIAS	92
10. ANEXOS	106
11. FINANCIAMIENTOS	113
12. PRODUCTOS	114

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Líneas celulares de origen músculo esquelético	20
Tabla 2: Estudios publicados que utilizan campos eléctricos en la síntesis y alineación de CB.	27
Tabla 3: Parámetros cinéticos de <i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> en medio HS.....	50
Tabla 4: Dimensiones evaluadas para la microcámara y las placas de electrodos.....	50
Tabla 5: Propiedades físicas y electroquímicas de materiales utilizados como electrodos en la microcámara de crecimiento	53
Tabla 6: Producción de celulosa bacteriana bajo diferentes intensidades de campo eléctrico	55
Tabla 7: Resultados del ensayo LAL gel-clot en muestras de CB purificada y no purificada, con y sin polimixina B.	60
Tabla 8: Efecto de los ciclos de tracción sobre la alineación de nanofibras.....	62
Tabla 9: Comparación del módulo de Young según el número de ciclos de tracción aplicados	65
Tabla 10: Condiciones experimentales para cada muestra.	66
Tabla 11: Efecto de los factores sobre la alineación de nanofibras	71
Tabla 12: Parámetros del modelo GAB (Guggenheim, Anderson y de Boer) para muestras de CB bajo distintos tratamientos.....	74
Tabla 13: Bandas características de CB detectadas por ATR-FTIR en todos los tratamientos.....	77
Tabla 14: Absorbancia relativa y cálculo del índice de cristalinidad (IC) en muestras	78
Tabla 15: Puntos seleccionados de la fase exponencial de crecimiento bacteriano según la curva logarítmica (DO_{600} nm).....	106
Tabla 16: Condiciones experimentales para cada muestra.	108
Tabla 17: Dilución de punto final LPS	108

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mercado de Ingeniería de Tejidos. Tamaño por Aplicación, 2020–2030 (Miles de Millones de USD). (Grand View Research, 2025).	15
Figura 2: Anatomía del músculo esquelético. El músculo esquelético es un tejido altamente alineado organizado jerárquicamente. (Carnes & Pins, 2020).....	16
Figura 3: Progresión miogénica desde la activación de células satélite. A) Etapas de proliferación, diferenciación y fusión hasta llegar a la maduración celular con la obtención de miofibras. B: Perfil de expresión de moduladores claves del proceso miogénico (Modificada de Schmidt et al., 2019).	19
Figura 4: Esquema ilustrativo de la organización del músculo esquelético. (Junqueira & Carneiro, 2015).....	22
Figura 5: Estructura molecular de la celulosa. Elaboración propia.	24
Figura 6: Estructura general de celulosa. Las cadenas se entrecruzan mediante enlaces de hidrógeno para formar microfibrillas de celulosa (Horwath, 2007).....	25
Figura 7: Esquema resumen de metodología de producción de CB bajo la aplicación de campo eléctrico.....	35
Figura 8: Proceso de obtención de <i>scaffolds</i> de CB. Purificación alcalina con NaOH y lavados hasta neutralidad; secado controlado de la lámina de CB en estufa; corte en discos y almacenamiento estéril en placa <i>Petri</i> con agua desionizada.....	36
Figura 9: Interpretación GEL CLOT. (+) resultado positivo, (-) resultado negativo.	37
Figura 10: Imagen resumen. Ensayo de tracción y determinación del módulo de Young en CB. Elaboración propia.	39
Figura 11: Caracterización morfológica de <i>scaffolds</i> de celulosa bacteriana (SEM, análisis de orientación de nanofibras, AFM).	41
Figura 12: Caracterización fisicoquímica de <i>scaffolds</i> de CB (FTIR-ATR e isothermas de sorción de agua).	44

Figura 13. Flujo experimental para evaluar la biocompatibilidad <i>in-vitro</i> de <i>scaffolds</i> de celulosa bacteriana con mioblastos C2C12.....	47
Figura 14: Tinción fluorescente de núcleos, citoesqueleto y expresión de MHC en <i>scaffolds</i>	48
Figura 15: Curva de crecimiento de <i>K. sucrofermentans</i> cultivado en medio HS.	49
Figura 16: Mapas de contorno y líneas de campo eléctrico en distintas configuraciones de la microcámara de crecimiento.....	51
Figura 17: Tensor de campo eléctrico obtenido para la configuración de la microcámara (40 × 50 × 30 mm) con electrodos de grafito (20 × 30 × 0,25 mm).....	52
Figura 18: Evaluación visual del comportamiento de electrodos en condiciones de cultivo y campo eléctrico.....	54
Figura 19: Imagen de software y proyección de sistema de aplicación de campo eléctrico <i>in-situ</i> de CB. A) Tapa de silicona B) electrodos de grafito, C) Camara 3D.	55
Figura 20: Fotografías de electrodos y sistema de aplicación de campo eléctrico real.	56
Figura 21: Simulación de la distribución del campo eléctrico en la microcámara de crecimiento, realizada en Mathematica.....	58
Figura 22: Morfología macroscópica de celulosa bacteriana cultivadas bajo diferentes intensidades de campo eléctrico.	59
Figura 23: Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo topográfico de celulosa bacteriana bajo diferentes condiciones de cultivo. A) CB control, B) CB 0.2 V/cm, C) CB 0.4 V/cm.....	61
Figura 24: Ensayos de tracción en <i>scaffolds</i> de celulosa bacteriana.....	63
Figura 25: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de orientación de CB sometida a diferentes tratamientos. Escala: 200 μm	67

Figura 26: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de orientación de celulosa bacteriana bajo la aplicación de un campo eléctrico (0.2 V/cm) y tratamientos mecánicos adicionales. Escala: 200 μm	69
Figura 27: Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de orientación de celulosa bacteriana bajo la aplicación de un campo eléctrico de 0.4 V/cm y tratamientos mecánicos adicionales. Escala: 200 μm	70
Figura 28: Representación del efecto combinado del campo eléctrico (X1) y la tracción mecánica (X2) sobre la alineación de nanofibras de CB.	72
Figura 29: Superficie de respuesta en 3D del modelo estadístico para el coeficiente de coherencia (Y).....	73
Figura 30: Comparación de las isothermas de adsorción experimentales y ajuste por modelo de GAB a 20°C. A) CB control, CB 30 C, CB 0.4 V/cm, y CB 0.4 V/cm + 30 C.	76
Figura 31: Espectros ATR-FTIR de muestras de celulosa bacteriana bajo diferentes condiciones experimentales. Mostrados de abajo hacia arriba: CB, CB 30 C, CB 0.4 V/cm, CB 0.4 V/cm + 30 C.....	77
Figura 32: Ensayo de adhesión celular mediante WST-1, realizado 4 horas después de la siembra de células musculares sobre <i>scaffolds</i> de celulosa bacteriana.....	79
Figura 33: Imágenes de inmunofluorescencia en células C2C12 diferenciadas tras cinco días de cultivo.	81
Figura 34: Curvas esfuerzo–deformación de <i>scaffolds</i> de celulosa bacteriana sometidas a distintos números de ciclos de tracción mecánica.....	112

1. INTRODUCCIÓN

Cada año se realizan aproximadamente 4,5 millones de procedimientos quirúrgicos reconstructivos en todo el mundo, como resultado de accidentes automovilísticos, ablación del cáncer o intervenciones estéticas (Grasman et al., 2015). Dentro de estos procedimientos, la regeneración del tejido muscular esquelético representa un desafío clínico significativo. El injerto autólogo de músculo, considerado el estándar terapéutico, conlleva múltiples desventajas: es invasivo, costoso, limitado en disponibilidad y asociado a complicaciones postoperatorias (Grasman et al., 2015; Gerli et al., 2018). Alternativas como la inyección de células musculares cultivadas ex vivo han demostrado una eficacia limitada, lo que subraya la necesidad urgente de nuevas estrategias terapéuticas (Kroehne et al., 2008; Grasman et al., 2015)

En este contexto, la ingeniería de tejidos ha emergido como una disciplina que ofrece soluciones innovadoras para regenerar o reemplazar tejidos dañados. Se estima que el tamaño del mercado global de ingeniería de tejidos fue de 19.360 millones de dólares el pasado 2024 y se proyecta una tasa de crecimiento anual compuesta del 14,3% hasta 2030, impulsado por la prevalencia de enfermedades crónicas musculoesqueléticas, cardiovasculares, y metabólicas (Grand View Research, 2025).

Este crecimiento ha sido potenciado por la necesidad de soluciones innovadoras de ingeniería de tejidos que puedan reparar o reemplazar eficazmente los tejidos dañados. Las mejoras en biomateriales, la bioimpresión 3D, la investigación con células madre y las técnicas de edición genética han impulsado este campo. Estos avances han facilitado la creación de tejidos complejos y funcionales, lo que aumenta el potencial de intervenciones terapéuticas exitosas (Grand View Research, 2025). Una proyección importante, es que las afecciones médicas musculo esqueléticas y esqueléticas crónicas impulsen la demanda de implantes basados en biomateriales. Las empresas más populares relacionadas con los productos e instrumentos de cultivo celular tridimensional son BD Biosciences con un 27% de participación de mercado, seguida de Life Technologies (16%), Corning (11%), Sigma-Aldrich (8%), Lonza (6%), Insphero (4%), 3D Biotek (4%) y Global Cell Solutions (3%) (Cascone & Lamberti, 2020). Se puede observar el aumento de tamaño de mercado de Ingeniería de tejidos en la Figura 1.

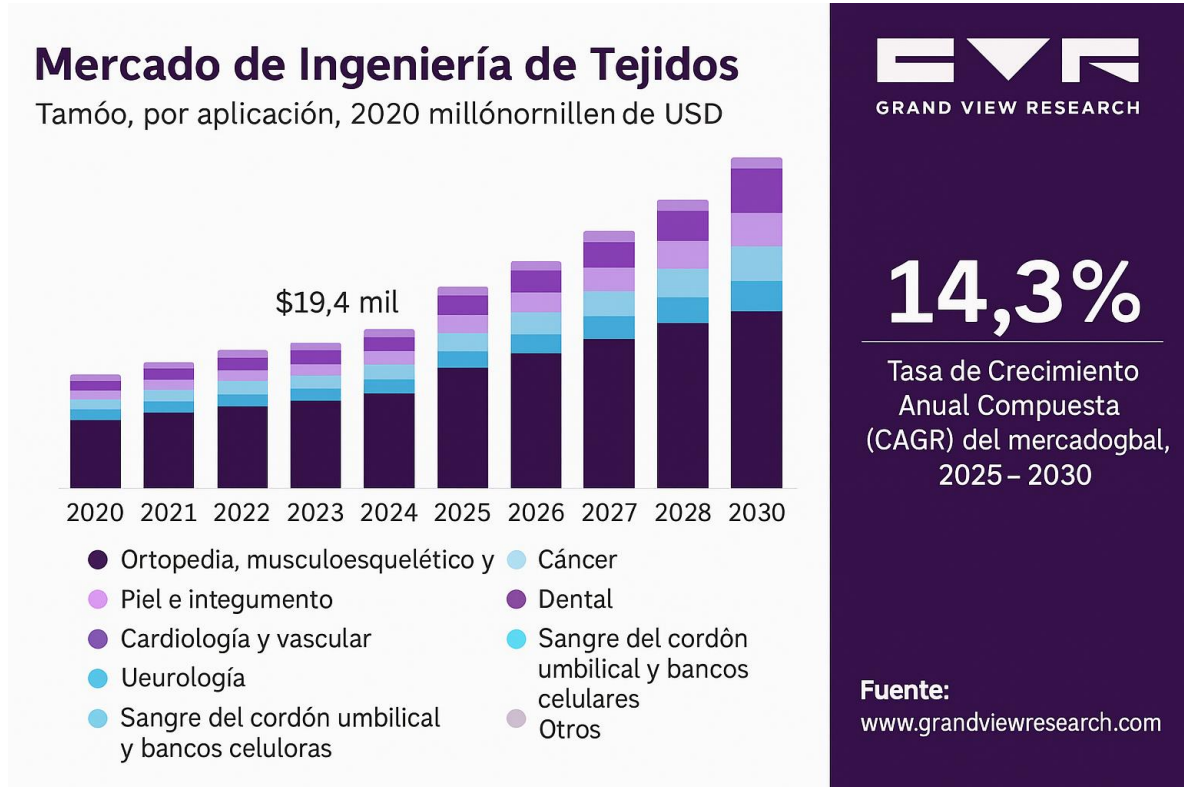


Figura 1. Mercado de Ingeniería de Tejidos. Tamaño por Aplicación, 2020–2030 (Miles de Millones de USD). (Grand View Research, 2025).

La ingeniería de tejidos en músculo esquelético *in-vitro* busca recrear el microambiente necesario para el crecimiento y maduración celular mediante el cultivo de mioblastos sobre andamios (*scaffolds*) que imitan la matriz extracelular (ECM) nativa. Estos permiten recrear el microambiente necesario para la adhesión, migración, proliferación y diferenciación de las células, promoviendo la regeneración de tejidos dañados o perdidos. Se ha descrito que un requisito en esta área es el desarrollo de *scaffolds* que faciliten la alineación celular para dirigir la regeneración y el crecimiento muscular esquelético. Para lograr esto, los *scaffolds* deben imitar las estructuras jerárquicas presentes en la ECM del tejido muscular nativo (Qazi et al., 2015; Grasman et al., 2015; Mueller et al., 2021).

La ECM es un complejo *scaffolds* natural viscoelástico compuesto por un ensamblaje proteico denso y funcional (colágeno tipo IV no fibrilar, laminina, colágeno fibrilar tipo I, proteoglicanos y glicosaminoglicanos sulfatados) con una arquitectura única específica del tejido (Thorsteinsdóttir et al. 2011; Kuraitis et al. 2012; Brown & Badylak 2014). Esta matriz proporciona una estructura tridimensional y un microambiente para que las células modulen diferentes procesos biológicos, tales como adhesión, migración, proliferación, diferenciación, señalización célula-célula y deposición de ECM (Rogers et al. 2014; They

2010). El tejido muscular esquelético posee una estructura altamente organizada, compuesta por elementos paralelos que pueden dividirse en fascículos, miofibras y miofilamentos (véase la Figura 2) (Carnes & Pins, 2020).

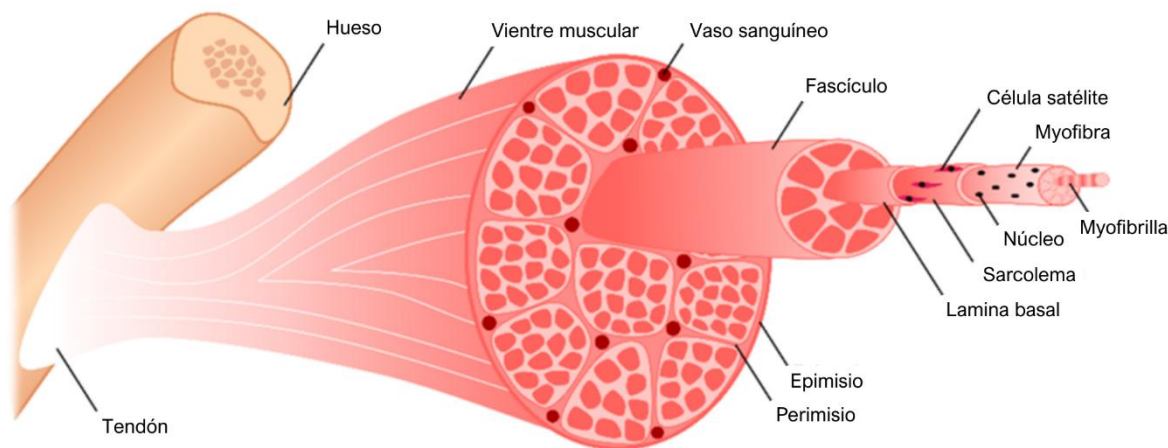


Figura 2. Anatomía del músculo esquelético. El músculo esquelético es un tejido altamente alineado organizado jerárquicamente. (Carnes & Pins, 2020)

Esta área tiene dos grandes enfoques, el primero en el área biomédica donde se busca generar tejido funcional que se pueda trasplantar a un paciente, y el segundo en el área alimentaria para la generación de carne cultivada (Acevedo et al., 2018; MacQueen et al., 2019; Nakayama et al., 2017). Tradicionalmente, diversos materiales tanto de origen sintético como natural han sido evaluados para la fabricación de *scaffolds*. Los polímeros sintéticos ofrecen ventajas en cuanto a reproducibilidad y facilidad de modificación, pero a menudo carecen de los motivos bioactivos necesarios para una interacción celular óptima. Por otro lado, los polímeros naturales presentan una alta biocompatibilidad y poseen señales intrínsecas de reconocimiento celular, aunque pueden mostrar limitaciones en cuanto a propiedades mecánicas y control sobre la degradación. Frente a estas limitaciones, la búsqueda de nuevos biomateriales ha orientado la atención hacia soluciones híbridas y materiales innovadores.

Dentro de este escenario, la celulosa bacteriana (CB) ha emergido como un biomaterial de gran interés y potencial para la ingeniería de tejidos. Es un biopolímero extracelular sintetizado por diversas especies bacterianas, principalmente *Gluconateobacter xylinus* (renombrada a *Komagataeibacter xylinus*). (Sousa et al., 2024). En esta tesis se utilizó la subespecie *Komagataeibacter sucrofermentans*, característica por la producción de CB altamente pura. Su síntesis inicia con la extrusión de subfibrillas elementales (~1.5 nm de

diámetro), las cuales se ensamblan en microfibrillas y posteriormente en una red tridimensional de nanofibras (El-Gendi et al., 2022). Esta red se forma en la interfaz aire-líquido debido al movimiento aleatorio de las bacterias durante su producción. Se distingue por su altísima pureza, elevada cristalinidad y una red tridimensional de nanofibras que imitan la estructura de la ECM nativa. Estas propiedades confieren a la CB una excelente capacidad de retención de agua, alta resistencia mecánica y una biocompatibilidad comprobada, aspectos fundamentales para su aplicación en medicina regenerativa (Portela et al. 2019; Keshk et al. 2020). A pesar de las ventajas mencionadas, la aplicación clínica de la CB enfrenta ciertos desafíos que requieren de una investigación exhaustiva. Entre ellos, se destacan la necesidad de mejorar la integración entre el *scaffolds* y el tejido circundante, la personalización de sus propiedades mecánicas para aplicaciones específicas y la optimización de procesos de producción a gran escala que mantengan la homogeneidad y funcionalidad del material. La resolución de estos desafíos es fundamental para garantizar que los *scaffolds* basados en CB puedan transitar con éxito desde la investigación preclínica hasta aplicaciones terapéuticas en pacientes.

La aplicación de la CB en el campo de la ingeniería de tejidos ha abarcado diversas áreas, desde la fabricación de apósitos para heridas hasta la creación de *scaffolds* para la regeneración de tejidos blandos y duros. La capacidad de la CB para conformarse a geometrías complejas y su potencial para ser combinada con otras moléculas bioactivas la posicionan como una herramienta versátil en la regeneración de tejidos específicos, como en aplicaciones de ingeniería ósea o cartilaginosa (Keshk et al. 2020). Varias estrategias de ingeniería de tejidos han sido desarrolladas para fabricar *scaffolds* que replican la estructura y topografía de la ECM muscular nativa. Estos enfoques se clasifican en tres categorías principales: micropatronado, que incluye técnicas como la fotolitografía y la litografía blanda, permitiendo la creación de estructuras con patrones definidos que facilitan la replicación de la arquitectura natural de la ECM; electrohilado, que produce nanofibras alineadas que imitan las propiedades mecánicas y estructurales de la ECM, favoreciendo la adhesión y proliferación celular; y bioplotting, que utiliza impresoras 3D para depositar biomateriales en patrones específicos, creando estructuras tridimensionales complejas que emulan la ECM. La implementación de estas estrategias no solo permite replicar la topografía de la ECM muscular nativa, sino que también mejora significativamente la eficacia en la guía de la regeneración tisular, favoreciendo un entorno propicio para la

adhesión, proliferación y diferenciación celular, aspectos clave para el éxito de las terapias de ingeniería de tejidos.

Esta tesis doctoral examina en profundidad el potencial de la CB como biomaterial para la ingeniería de tejidos. Se propone desarrollar *scaffolds* con nanofibras alineadas obtenidas por la aplicación de campos eléctricos *in situ* durante la biosíntesis; para ello se emplea una cámara de microcrecimiento diseñada para controlar la orientación fibrilar. Además, se evaluó la sinergia entre este tratamiento y uno posterior de tracción mecánica con el fin de potenciar la alineación y las propiedades mecánicas del andamiaje. El comportamiento biológico de los *scaffolds* se investigó mediante cultivo de la línea celular C2C12, analizando viabilidad, distribución, morfología y proliferación celular hasta 72 horas. Los resultados muestran que la alineación de las nanofibras de CB potenciada por la tracción mecánica orienta el crecimiento y la organización de las células musculares.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Miogénesis

La miogénesis constituye el proceso biológico mediante el cual las células satélites (CS) se activan, proliferan y diferencian para generar nuevas fibras musculares o reparar las ya existentes. Este fenómeno tiene lugar tanto durante el desarrollo embrionario como en la regeneración postnatal y está regulado de manera estricta por una red integrada de factores de transcripción y señales moleculares (Schultz & McCormick, 1994). A nivel ontogenético, la miogénesis primaria da lugar a las fibras musculares iniciales a partir de mioblastos embrionarios, mientras que la miogénesis secundaria contribuye a la formación de fibras adicionales que integran la masa muscular definitiva (Parker et al., 2003).

En el plano molecular, la dinámica funcional de las CS está controlada por los factores *Pax3/Pax7* y por los factores reguladores miogénicos (*MRFs*): *Myf5*, *MyoD*, *miogenina* (*MyoG*) y *MRF4* (Weintraub, 1993; Azzabi et al., 2013). Las células satélites en estado quiescente expresan predominantemente *Pax7* (y *Myf5*); tras su activación se observa un incremento en *MyoD*, que favorece la entrada en ciclo y la proliferación celular. A partir de este punto, una fracción de las células conserva la expresión de *Pax7* y retorna a un estado de autorrenovación, mientras que otras reprimen *Pax7* y elevan la expresión de miogenina y *MRF4*, lo que conduce a la diferenciación, la fusión celular y la formación de miotubos que maduran en fibras musculares funcionales, como se muestra en la Figura 3 (Francetic

& Li, 2015; Kuang et al., 2008). El equilibrio entre autorrenovación y diferenciación es crítico para la homeostasis del tejido muscular y para el mantenimiento del reservorio de células madre en el músculo adulto. Dentro de este marco regulatorio, la miosina de cadena pesada (*MHC*) adquiere un papel central como marcador tardío de diferenciación y como determinante funcional de la capacidad contráctil de las fibras musculares. La expresión y el ensamblaje de las isoformas de *MHC* constituyen la culminación de la cascada miogénica, reflejando la maduración sarcomérica y la adquisición de propiedades mecánicas y contráctiles propias de los miotubos maduros (Pette & Staron, 2000). Por tanto, la detección cuantitativa y morfológica de *MHC* no sólo confirma la entrada en etapas tardías de diferenciación, sino que permite inferir la restauración de la maquinaria contráctil esencial para aplicaciones de ingeniería tisular y estudios funcionales traslacionales. La línea celular murina C2C12 es uno de los modelos más empleados para reproducir las etapas de proliferación, diferenciación y maduración miogénica (Burattini et al., 2004). En condiciones proliferativas, las células C2C12 son mononucleadas y adoptan morfologías estrelladas; la reducción del suero del medio de cultivo, o el alcance de la confluencia, desencadena cambios transcripcionales característicos: aumento de *MyoD* (etapa temprana), posterior inducción de miogenina (etapa intermedia) y, finalmente, expresión de marcadores tardíos de diferenciación como la *MHC*, asociados a la formación y maduración de miotubos (Veliça & Bunce, 2011; Pette & Staron, 2000).

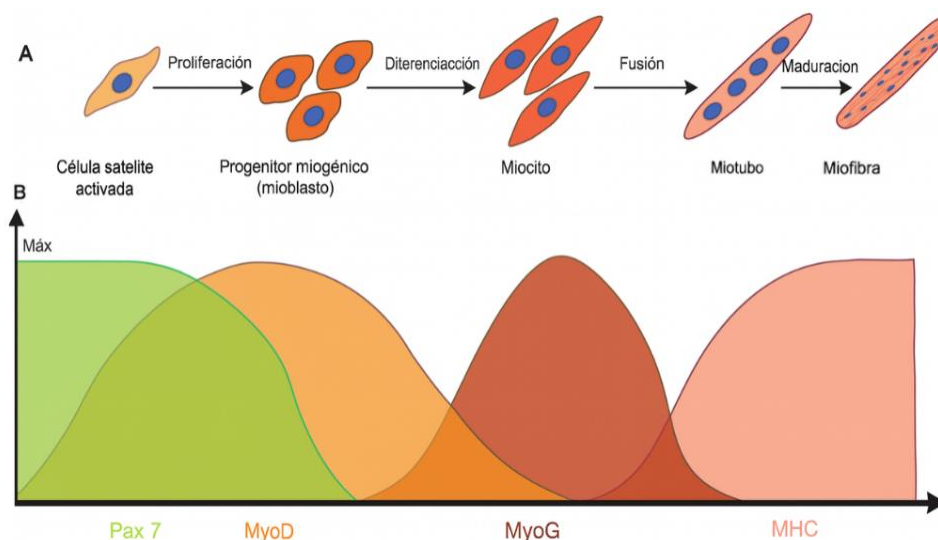


Figura 3. Progresión miogénica desde la activación de células satélite. A) Etapas de proliferación, diferenciación y fusión hasta llegar a la maduración celular con la obtención de miofibras. B: Perfil de expresión de moduladores claves del proceso miogénico. (Modificada de Schmidt et al., 2019).

2.2. Líneas celulares

Los cultivos celulares, son fundamental en ingeniería de tejidos, ya que el crecimiento y diferenciación de la célula huésped dependen de los métodos de cultivos adecuados para cada tipo celular a utilizar. Estos se utilizan para observar si el método de investigación tiene el efecto deseado sobre tejidos y células, además de comprender las razones de los resultados obtenidos, para que luego puedan aplicarse en el futuro en nuevas tecnologías.

Se entiende por línea celular a un cultivo primario que ha sido sometido a subcultivo sucesivo hasta estabilizarse. Por lo tanto, crece de forma indefinida adaptadas a condiciones de laboratorio (Freshney, 2015). Una línea celular se define como una población de células capaces de crecer de forma indefinida en cultivo, derivadas de tejidos específicos y adaptadas a condiciones de laboratorio. En la Tabla 1, se presenta la clasificación de las cuatro categorías de células que se emplean con mayor frecuencia en el estudio de músculo esquelético.

Tabla 1: Líneas celulares de origen músculo esquelético

Células	Morfología	Origen	Especie	Edad	Características	Cita
C2C12	Fibroblastoide	Músculo esquelético	Ratón	Embrionario	Capacidad de formar miotubos	(Morgan et al., 1992)
L6	Fibroblastoide	Músculo esquelético	Rata	Embrionario	Capacidad de formar miotubos	(Richler & Yaffe, 1970)
Mioblastos primarios	Variable (fusiforme/mio génica)	Músculo esquelético	Humano/ Ratón	Adulto	Diferenciación directa a miotubos; fisiología cercana al tejido nativo	(Li et al., 2023)
Células madre pluripotentes inducidas (iPSCs)	Variable (colonias epitelioides)	Células somáticas reprogramadas	Humano	Adulto	Potencial de diferenciación hacia mioblastos y miotubos; modelo versátil y ético	(Li et al., 2023)

En el estudio del músculo esquelético y la miogénesis, las líneas celulares son modelos experimentales ampliamente utilizados para estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en estos procesos. La línea celular más empleada en estudios de regeneración muscular es la C2C12, derivada de mioblastos de ratón (Yaffe & Saxel, 1977). Estas células proliferan rápidamente y, bajo condiciones de suero reducido, se diferencian en miotubos multinucleados, expresando marcadores miogénicos clave como *MyoD*, *miogenina* y *MHC* (cadena pesada de miosina). Esto las convierte en un modelo ideal para analizar la miogénesis, la respuesta a biomateriales y señales bioquímicas, así como para evaluar estrategias de ingeniería de tejidos. Si bien las líneas celulares ofrecen ventajas prácticas, es importante considerar sus limitaciones. Al ser modelos inmortalizados, pueden presentar diferencias respecto a las células primarias humanas, por lo que los resultados deben ser validados en sistemas complementarios más cercanos al entorno fisiológico.

2.3. Músculo esquelético.

El músculo esquelético es un tejido contráctil especializado cuya principal función es generar movimiento voluntario y mantener la postura corporal. Está compuesto por haces de fibras musculares multinucleadas que se conectan mediante tendones a los huesos (Astrand et al., 2010). Cada fibra muscular está rodeada por tejido conjuntivo: el endomisio envuelve cada fibra individual, el perimisio agrupa las fibras en fascículos, y el epimisio recubre el músculo en su conjunto, permitiendo su deslizamiento y protección estructural (Junqueira & Carneiro, 2015). Las fibras musculares, también llamadas miocitos, son células largas y multinucleadas con una alta especialización estructural. En su interior contienen miofibrillas organizadas en unidades repetitivas denominadas sarcómeros, responsables de la contracción. Cada sarcómero está compuesto por filamentos de actina y miosina, regulados por proteínas como la troponina y la tropomiosina. Además, el retículo sarcoplásmico actúa como reservorio de calcio, mientras que los túbulos T permiten la propagación del potencial de acción hacia el interior de la fibra. La regeneración del músculo esquelético es posible gracias a un grupo de células madre musculares conocidas como células satélites (CS), localizadas entre la lámina basal y el sarcolema de las fibras musculares (Mauro, 1961). Estas células, normalmente quiescentes, se activan en respuesta a daño tisular y participan en la reparación, crecimiento y mantenimiento del

tejido muscular (Bischoff & Heintz, 1994; Frontera & Ochala, 2015). En la Figura 4, se puede observar un esquema ilustrativo.

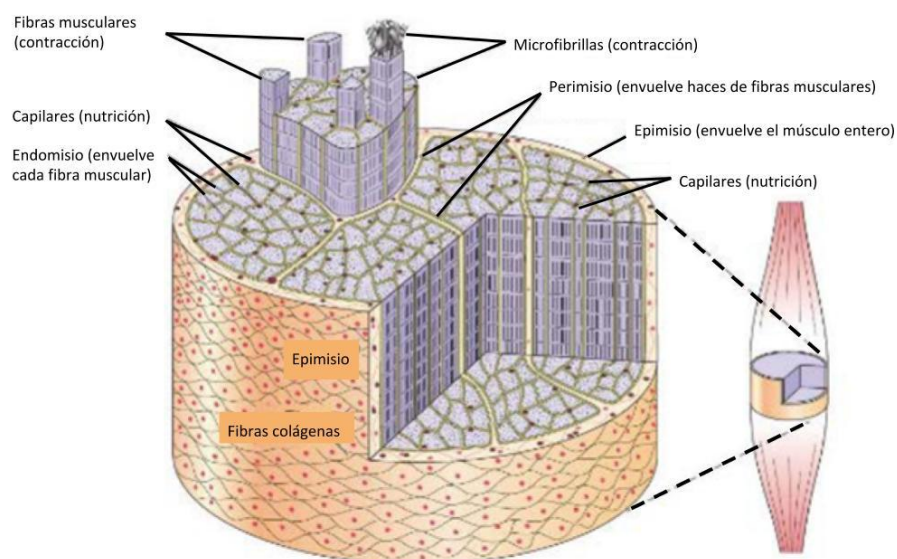


Figura 4. Esquema ilustrativo de la organización del músculo esquelético. (Junqueira & Carneiro, 2015)

2.4. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos fue un término acuñado en 1998 por la Fundación Nacional de Ciencias, para definir “la aplicación de principios y métodos de ingeniería y ciencias de la vida hacia la comprensión fundamental de las relaciones estructura-función en tejidos de mamíferos normales y patológicos y el desarrollo de sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función del tejido” (O’Brien et al., 2011). La ingeniería de tejidos involucra los principios de trasplante celular de la medicina clínica, y la bioingeniería que engloba disciplinas como la ingeniería mecánica, ciencias de los materiales, y biotecnología para construir sustitutos biológicos que restaurarán y mantendrán la función normal en los tejidos enfermos y lesionados (Atala, 2004). Los pilares fundamentales de la ingeniería de tejidos son las células, factores de crecimiento y biomateriales como *scaffolds*, también se denomina tríada de ingeniería de tejidos (Langer & Vacanti, 1993). Los *scaffolds*, (o "andamio" en español) se refiere a una estructura de soporte que desempeñan un papel esencial al proporcionar un soporte estructural para la adhesión, proliferación y diferenciación celular. Además, estos pueden modular señales bioquímicas y mecánicas que favorecen la regeneración del tejido muscular.

2.5. Ingeniería de Tejidos en Músculo Esquelético

El músculo esquelético tiene la capacidad de regenerarse ante un daño, por lesión y enfermedades degenerativas. Sin embargo, luego de sufrir estas lesiones, la auto regeneración endógena se ve gravemente afectada en condiciones de pérdida muscular traumática de volumen (Turner & Badylak, 2012; Cezar & Mooney, 2016).

En particular, en ingeniería de tejidos de músculo esquelético, los *scaffolds* influyen en la fusión de mioblastos y la formación de miotubos, contribuyendo a la generación de fibras musculares funcionales. Lo que se traduce a un enfoque terapéutico prometedor para diseñar reemplazos de musculoesqueléticos específicos del paciente que pueden aumentar la función muscular, estimular la regeneración y mejorar la calidad de vida (Azzabi et al., 2013). Sin embargo, muchos de los modelos actuales de *scaffolds* generan miofibras desorganizadas, limitando su integración con el tejido receptor y su capacidad de restaurar su función muscular (Wolf et al., 2015). Para lograr una regeneración muscular efectiva, es crucial replicar la organización unidireccional de las miofibras, ya que esta alineación paralela es fundamental para una contracción eficiente del tejido nativo. Uno de los principales desafíos en esta área es crear microambientes que favorezcan esta alineación celular para obtener un tejido funcional. Se han propuesto el uso de *scaffolds* electroactivos y materiales con propiedades mecánicas modulables como soluciones para mejorar la orientación y diferenciación celular, permitiendo así el desarrollo de fibras musculares más funcionales.

Se conoce desde hace tiempo que las nanoestructuras integradas en *scaffolds* facilitan la liberación dirigida de cargas en células y tejidos, permiten el acceso al compartimento intracelular y modulan el comportamiento celular. Parámetros topográficos condicionan de manera determinante la respuesta biológica mediante las interacciones entre la membrana celular y el material y la consiguiente transducción de señales intracelulares (Mardling et al., 2020). Tales topografías pueden inducir una alineación celular altamente orientada y, en ciertos casos, favorecer la penetración espontánea de la membrana (Higgins et al., 2020). Asimismo, la rigidez del sustrato constituye una señal mecánica crítica que regula la adhesión, la proliferación y la expresión génica en células musculares, lo que remarca la necesidad de integrar señales topográficas y mecánicas en el diseño de *scaffolds* para aplicaciones en medicina regenerativa.

2.6. Celulosa

La celulosa es un polisacárido lineal compuesto por unidades repetitivas de β -D-glucosa, unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ -glucosídicos. Su fórmula molecular es $(C_6H_{10}O_5)_n$ y su estructura se observa en la Figura 5.

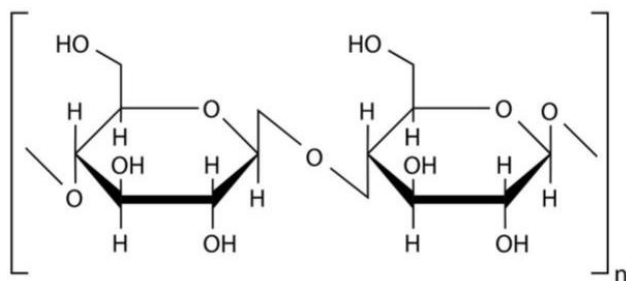


Figura 5. Estructura molecular de la celulosa. Elaboración propia.

Es el biopolímero más abundante en la naturaleza, y constituye la estructura primaria de la pared celular en plantas, algas y algunos microorganismos. Su estructura cristalina y altamente ordenada le confiere una gran resistencia mecánica, estabilidad química y biodegradabilidad, lo que la convierte en un material clave en múltiples aplicaciones industriales y biomédicas (Sousa et al., 2024).

La celulosa se organiza en microfibrillas, las cuales presentan regiones cristalinas y amorfas. Como se observa en la Figura 6. Su alto grado de polimerización y la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas le otorgan características notables como:

- Alta resistencia mecánica: Especialmente en estado cristalino, con una resistencia comparable a la de algunos polímeros sintéticos (Petersen & Gatenholm, 2011).
- Hidrofobicidad parcial: Aunque la celulosa tiene grupos hidroxilo (-OH), su estructura impide la disolución en agua, y puede retener grandes cantidades de humedad.
- Biodegradabilidad: Se degrada mediante enzimas específicas como la celulasa, lo que la hace un material ecológico y sostenible.
- Químio-mecanización: Puede ser modificada químicamente para mejorar sus propiedades y aplicaciones (Carvalho et al., 2019).

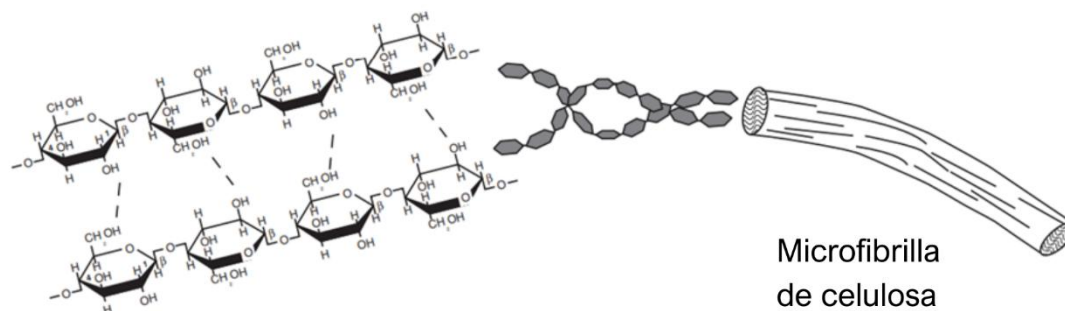


Figura 6. Estructura general de celulosa. Las cadenas se entrecruzan mediante enlaces de hidrógeno para formar microfibrillas de celulosa (Horwath, 2007)

Existen tres fuentes principales de celulosa: i) vegetal, extraída de fuentes como algodón, madera y cáñamo. Es la base de productos como papel, cartón y fibras textiles. ii) Algal y Fúngica. iii) Bacteriana (CB): Producida por microorganismos como *Komagataeibacter sucrofermentans*, con una estructura más pura y con potencial para aplicaciones en ingeniería de tejidos y biomedicina (Wahid et al., 2021).

2.7. Celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana (CB) es un biopolímero extracelular sintetizado por bacterias de diferentes géneros como *Acetobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sarcina* (Ross et al., 1991). Como resultado del movimiento aleatorio de estas bacterias, se produce una red tridimensional de nano fibras de celulosa. La capacidad de unión al agua de estas nano fibras es debido a su gran área superficial y alta concentración de grupos hidroxilo hidrófilos, por lo cual el material que se obtiene es similar a un hidrogel el contenido de agua es de alrededor del 99% (Gelin et al., 2007; Sano et al., 2010). Las diferentes condiciones de cultivo para la producción de CB puede afectar su morfología. Primeramente, se encuentran los cultivos estáticos, donde la celulosa se forma como una película hidratada, bajo este procedimiento de cultivo se ha logrado un mayor rendimiento de producción de este biopolímero (Bungay & Serafica, 1999). Por otra parte, la CB obtenida en cultivos de agitación constante se forma como esferas en suspensión, bajo esta modalidad las bacterias pueden apagar su maquinaria genética para detener la producción de CB.

La CB es un material altamente versátil y puede fabricarse en distintos tamaños y formas. Su potencial en ingeniería de tejidos se debe a sus propiedades intrínsecas, como biocompatibilidad, biodegradabilidad, alta integridad mecánica, hidroexpansibilidad y elevada relación superficie-volumen (Carvalho et al., 2019). Además, puede absorber y retener otros polímeros, ocupando sus espacios vacíos e interactuando con su red de nanofibras, lo que permite su funcionalización para diversas aplicaciones biomédicas (Tang et al., 2022). A nivel molecular, las nanofibras de CB pueden alcanzar resistencias mecánicas de 1.6-3.0 GPa, pero su alineación a macroescala sigue siendo un desafío tecnológico (Petersen & Gatenholm, 2011). Su estructura altamente porosa facilita la adhesión y proliferación celular, permitiendo su uso en la regeneración de piel, hueso, cartílago y tejidos blandos (Wahid et al., 2021).

2.8. Métodos de alineación de nanofibras de celulosa bacteriana

La celulosa bacteriana (CB) es una red tridimensional de nanofibras, su estructura aleatoria, aunque adecuada para muchas aplicaciones, puede representar una limitación para aquellas que requieren propiedades mecánicas específicas o direccionalidad estructural, como en la ingeniería de tejidos. Por ello, se han desarrollado diversos métodos para inducir la alineación de las nanofibras de CB, lo cual mejora su resistencia, orientación celular y funcionalidad en aplicaciones biomédicas. Sin embargo, la estructura aleatoria de las nanofibras de CB puede ser una limitante para aplicaciones que requieren propiedades mecánicas específicas. Para superar esto, se han desarrollado métodos que controlan la alineación de las fibrillas, mejorando su resistencia y funcionalidad en dispositivos biomédicos (Cetin et al., 2025, Bodea et al., 2019).

- **Uso de sustratos microestructurados:** Una de las estrategias más efectivas consiste en utilizar moldes o plantillas con microestructuras, como rejillas de polidimetilsiloxano (PDMS), ubicadas en la interfaz aire-líquido del medio de cultivo. Estas plantillas guían el crecimiento de la CB en una dirección preferencial, lo cual resulta en una orientación alineada de las nanofibras. Se ha demostrado que este método puede aumentar el módulo de Young y la resistencia a la tracción en más de un 250% respecto a CB convencional (Rahman & Netravali, 2016).
- **Estiramiento mecánico post-síntesis:** Una vez formada la película de CB, se puede someter a estiramiento mecánico controlado, lo cual realinea las nanofibras en la

dirección del esfuerzo. Esta técnica mejora la orientación estructural, aumentando significativamente la rigidez y resistencia del material (Yao et al., 2017).

- Flujo direccional del medio de cultivo: Otra técnica consiste en generar un flujo constante del medio de cultivo en una dirección específica durante la biosíntesis. Este flujo orienta la secreción de nanofibras por parte de las bacterias, resultando en una red de CB alineada. La velocidad del flujo afecta directamente la cristalinidad y la estabilidad térmica del material final (Luo et al., 2017).

2.9. Alineación de nanofibras de celulosa bacteriana mediante la aplicación de campos eléctricos

El uso de campos eléctricos se ha consolidado como una estrategia efectiva para inducir la orientación de las nanofibras de CB durante su biosíntesis por cepas de *Komagataeibacter sucrofermentans*. Esta aproximación busca replicar la organización jerárquica y anisotrópica de tejidos biológicos, en los cuales la alineación de fibras es fundamental para alcanzar propiedades mecánicas específicas y favorecer la orientación celular. Se presenta un resumen en la Tabla 2, con la revisión bibliográfica.

Tabla 2: Estudios publicados que utilizan campos eléctricos en la síntesis y alineación de CB.

Referencia	Configuración experimental	Condiciones del campo eléctrico	Principales hallazgos
Sano et al. (2010)	Microelectrodos de Al en canal microfluídico (1 cm × 300 μm).	1–5 V, CC (10–50 V/m).	<i>K. xylinus</i> ensambla CB en entornos micro y macro, sugiriendo síntesis 3D de abajo hacia arriba.
Sano et al. (2013)	Alambres de Al en vaso de precipitados de 100 mL.	5–20 V, CC (110–440 V/m).	<i>K. xylinus</i> se desplaza desde el ánodo al cátodo. Orientación dependiente de la intensidad aplicada.
Liu et al. (2016)	Electrodos de Pt de 2 mm separados 115 mm.	10 mA, CC (≈50 V/m).	La síntesis de CB se promueve en el cátodo (12 h) e inhibe en el ánodo (6 h), probablemente por cambios metabólicos y estrés ácido.
Luo et al. (2017)	Configuración no especificada.	CC, 10 mA (40 kV/m).	Orientación de fibras en dirección del campo, con aumento en resistencia a tracción y estabilidad térmica.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

La aplicación de un campo eléctrico durante la biosíntesis *in-situ* de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter sucrofermentans*, inducirá la formación de un *scaffold* con nanofibras orientadas. Posteriormente, al aplicar estiramiento mecánico controlado, se favorecerá sinérgicamente una orientación aún mayor del *scaffold*, optimizándolo para aplicaciones en cultivos celulares musculares.

Objetivo general:

Desarrollar un *scaffold* de nanofibras altamente orientadas de celulosa bacteriana por *Komagataeibacter sucrofermentans*, a través la combinación sinérgica de campo eléctrico y estiramiento mecánico para cultivos de células musculares.

Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Diseñar una metodología de producción de CB por *Komagataeibacter sucrofermentans*, bajo la aplicación de campo eléctrico.

Objetivo específico 2: Desarrollar un método de tracción mecánica para alinear nanofibras de celulosa bacteriana.

Objetivo específico 3: Estudiar el efecto sinérgico entre la electroestimulación *in-situ* en la biosíntesis y la posterior tracción mecánica en la orientación de las nanofibras.

Objetivo específico 4: Evaluar la biocompatibilidad del *scaffolds* en un modelo *in-vitro* de células musculares.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Diseñar una metodología de producción de CB bajo la aplicación de campo eléctrico

4.1.1. Condiciones de cultivo *Komagataeibacter sucrofermentans*

Se utilizó la cepa *Komagataeibacter sucrofermentans* (BPR2001, DSM 15973, DSMZ, Alemania), rehidratada según las instrucciones del proveedor. La activación inicial se realizó en medio *HS* (Hestrin Schramm) (Hestrin & Schramm, 1954).

Protocolo de rehidratación y activación

La ampolla liofilizada se abrió asépticamente mediante fractura controlada bajo campana de flujo laminar, añadiendo 2 gotas (40 μL) de agua estéril para facilitar la extracción del contenido con pinzas estériles. Se añadió 500 μL de medio *HS* al vial, dejándolo reposar durante 30 minutos. Posteriormente, se mezcló suavemente el contenido y se inocularon 250 μL (concentración inicial estimada: 10^5 - 10^6 *UFC/mL* según especificaciones DSMZ) en 5 *mL* de medio fresco, incubando en condiciones estáticas a 30 °C por 3 días, en tubos falcón de 15 *mL*. Los cultivos se incubaron en condiciones estáticas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 72 horas hasta la formación visible de la película de celulosa en la superficie del medio.

Escalado y mantenimiento de stocks

Los cultivos primarios se escalaron progresivamente de matrices Erlenmeyer de 25 *mL* previamente autoclavados (121°C, 20 *min*) con tapones de algodón envueltos en gasa para permitir intercambio gaseoso mientras se previene contaminación, posteriormente a 100 *mL* en frascos Erlenmeyer de 250 *mL*. Para el mantenimiento a largo plazo, se prepararon stocks congelados mezclando 800 μL de cultivo bacteriano en fase exponencial ($\text{DO}_{600} = 0.8$ -1.0) con 200 μL de glicerina estéril al 87% (concentración final de glicerina: 15% v/v) en viales criogénicos estériles de 2 *mL*. Los viales se homogeneizaron suavemente, se etiquetaron con fecha y se almacenaron a -80°C. Estos stocks mantuvieron viabilidad por hasta 24 meses. Para reactivar los stocks, se descongeló un vial a temperatura ambiente y se sembró 100 μL por agotamiento en placas de agar HS, siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente (incubación 72h, 30°C), antes de transferir a cultivo líquido. Los stocks de trabajo se consideraron viables cuando presentaron: (i) formación de película de celulosa continua y translúcida en ≤ 72 horas, (ii) ausencia de turbidez o precipitados en el medio, (iii) pH estable entre 4.5 - 5.5, y (iv) ausencia de

contaminación verificada mediante tinción de Gram. Los stocks de trabajo se almacenaron a 4°C por un máximo de 30 días, realizando subcultivos cada 15 días para mantener viabilidad óptima.

Composición del medio HS

El medio *HS* fue preparado con 20 g/L de glucosa (Merck), 5 g/L de extracto de levadura (Merck), 5 g/L de proteosa-peptona (Sigma-Aldrich), 2,7 g/L de NaH₂PO₄ (Merck) y 1,15 g/L de ácido cítrico (Sigma-Aldrich) en agua destilada. El pH fue ajustado a 5,5 usando NaOH (Winkler) y se autoclavó a 121°C por 20 minutos. Para medio sólido, se añadieron 15 g/L de agar bacteriológico (Merck) antes del ajuste de pH. Ambos medios se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente antes del uso. Las placas se vertieron asépticamente (25 mL por placa de 90 mm) y se secaron en campana de flujo laminar durante 30 minutos.

Cinética de crecimiento

Se generó una curva de crecimiento midiendo la absorbancia 600 nm cada hora durante 72 horas, utilizando tres cultivos independientes de 100 mL como réplicas biológicas. Las mediciones se realizaron en espectrofotómetro UV-Vis calibrado, utilizando como blanco una alícuota de medio HS estéril. La DO inicial se estandarizó a 0.05 para asegurar reproducibilidad entre experimentos.

Análisis cinético

El crecimiento bacteriano se modeló mediante la ecuación exponencial:

$$\text{Ecuación 1. } Y = Y_0 E^{\mu x}$$

en donde

- *Y* corresponde a los valores de densidad óptica determinados a 600 nm de los cultivos de *Komagataeibacter.sucrofermentans*
- *X* corresponde al tiempo (horas)
- *Y*₀ es el valor de densidad óptica en el cual *x* = 0.
- *μ* representa la tasa de crecimiento específico de la bacteria, parámetro a partir del cual se obtiene el tiempo de duplicación (*td*)

El tiempo de duplicación se calcula aplicando la siguiente ecuación:

Ecuación 2. $td = \frac{\ln(2)}{\mu}$

Para el cálculo de μ se utilizaron exclusivamente los datos de la fase exponencial, identificada por la linealidad de $\ln(DO_{600})$ vs tiempo con coeficiente de determinación $R^2 \geq 0.95$. Los parámetros cinéticos se determinaron mediante regresión lineal de los puntos experimentales en escala semilogarítmica.

4.1.2. Diseño de cámara micro crecimiento: simulaciones de campo eléctrico

Para garantizar la generación de un campo eléctrico homogéneo, se realizaron simulaciones utilizando el software *Wolfram Mathematica*, (14.1, Champaign, IL 2025) con el objetivo de evaluar la intensidad y direccionalidad de las líneas de campo eléctrico. Se evaluaron sistemáticamente cuatro configuraciones geométricas mediante simulaciones de elementos finitos, variando las dimensiones de la microcámara y el área de los electrodos hasta obtener la configuración que minimizara la heterogeneidad del campo eléctrico, asegurando una distribución uniforme para inducir una alineación controlada en las nanofibras de CB.

Fuerza eléctrica

La fuerza eléctrica F ejercida sobre una partícula cargada en un campo eléctrico uniforme se describe mediante la ecuación:

Ecuación 3. $F = qE$

- F es la fuerza ejercida sobre la partícula (N),
- q es la carga eléctrica de la partícula (C),
- E es la intensidad del campo eléctrico (V/cm).

Campo eléctrico uniforme

Para obtener un campo uniforme, se aplicó un potencial eléctrico V entre dos placas paralelas separadas por una distancia d , obteniendo la intensidad del campo mediante la relación, donde:

Ecuación 4. $E = \frac{V}{d}$

- E es la intensidad del campo eléctrico (V/cm),

- V es la diferencia de potencial aplicada entre las placas (V)
- d es la distancia entre placas (cm).

4.1.3. Selección de dimensiones

En esta etapa se definieron las dimensiones óptimas del sistema con el fin de asegurar un campo eléctrico uniforme y una distribución homogénea del biopolímero (CB) dentro de la microcámara de cultivo. Se consideró un área suficiente que permitiera la adecuada exposición al campo eléctrico. Por otro lado, la selección de las dimensiones de los electrodos y su disposición relativa se realizó en función de las dimensiones de la microcámara de cultivo, que considera una separación adecuada que permite reducir gradientes locales y obtener una mayor uniformidad en la región central de exposición. Se validó la geometría del sistema elegido mediante el análisis del tensor de gradiente del campo eléctrico explicado, lo que permitió confirmar la homogeneidad espacial del campo en la zona de interés. Para evaluar la uniformidad y orientación del campo eléctrico generado en la microcámara de cultivo, se calculó el tensor de gradiente del campo eléctrico (∇E), definido como la matriz de derivadas parciales de cada componente del campo respecto a cada coordenada espacial. Este tensor permite cuantificar cómo varía localmente la intensidad y dirección del campo eléctrico en función de la geometría de exposición, proporcionando información clave sobre la homogeneidad y la presencia de gradientes significativos. Los elementos diagonales $\left(\frac{\partial E_x}{\partial x}, \frac{\partial E_y}{\partial y}, \frac{\partial E_z}{\partial z}\right)$ indican los cambios longitudinales en cada dirección, mientras que los términos fuera de la diagonal representan acoplamientos o variaciones transversales. La validación geométrica del sistema de exposición se sustenta en estudios previos que han aplicado el análisis del tensor de gradiente eléctrico para determinar la dirección y magnitud de los campos en sistemas experimentales, confirmando su utilidad para correlacionar la geometría de los electrodos con la distribución resultante del campo eléctrico (Szymański, 2018).

Ecuación 5.

$$\nabla E = \begin{pmatrix} \frac{\partial E_x}{\partial x} & \frac{\partial E_x}{\partial y} & \frac{\partial E_x}{\partial z} \\ \frac{\partial E_y}{\partial x} & \frac{\partial E_y}{\partial y} & \frac{\partial E_y}{\partial z} \\ \frac{\partial E_z}{\partial x} & \frac{\partial E_z}{\partial y} & \frac{\partial E_z}{\partial z} \end{pmatrix}$$

Donde:

- E_x, E_y, E_z son componentes del campo eléctrico en las direcciones x, y, z , respectivamente.
- $\frac{\partial E_i}{\partial j}$ Identifica cada elemento del tensor, indicando como cambia cada componente del campo respecto a su coordenada espacial.

4.1.4. Selección y validación de materiales para electrodos

En el diseño del sistema de estimulación eléctrica (microcámara de cultivo) para la biosíntesis orientada de CB, la selección del material de los electrodos constituye un aspecto crítico, dado su impacto en la estabilidad electroquímica del sistema y en la integridad del medio biológico. Los electrodos debían cumplir con dos criterios fundamentales: (i) alta conductividad eléctrica para asegurar una transmisión eficiente del campo, y (ii) resistencia a la corrosión en medios acuosos y biológicos. Adicionalmente, se consideró como requisito que fueran químicamente inertes bajo las condiciones de cultivo, evitando la liberación de iones o compuestos que pudieran comprometer la viabilidad bacteriana o alterar la calidad del biopolímero producido. Estos criterios son consistentes con lo reportado en la literatura, donde materiales han sido empleados por su estabilidad y baja reactividad en sistemas de bioestimulación y cultivo celular

La validación de los materiales seleccionados se llevó a cabo mediante un protocolo en dos etapas:

- Ensayo en agua desionizada: Se probaron los electrodos en agua y se aplicaron las condiciones eléctricas previstas (potencial y campo eléctrico). Se monitorearon variables como signos de corrosión, cambio de color del medio de cultivo o alteraciones visuales en la superficie del electrodo. Sólo aquellos electrodos que no

presentaron reacciones adversas o alteraciones se consideraron aptos para la siguiente etapa.

- Prueba en medio de cultivo: Verificar la compatibilidad y estabilidad de los electrodos en condiciones más complejas, propias del entorno biológico. Los electrodos se introdujeron en el medio de cultivo *HS*. Se evaluaron los mismos parámetros que en la prueba anterior, con especial atención a la posibilidad de que se liberen iones o compuestos que pudieran afectar el crecimiento bacteriano o la calidad de la celulosa. Se corroboró que la aplicación del campo eléctrico se realizara de manera uniforme y sin inducir reacciones químicas no deseadas en el medio.

4.1.5. Sistema de aplicación de campo eléctrico

La microcámara se diseñó mediante CAD (Autodesk Inventor 2023) con tolerancias de $\pm 0.1\text{ mm}$, fabricándose por estereolitografía en resina High Temp (Formlabs Clear Resin V4) con resolución de capa de $25\text{ }\mu\text{m}$. El curado térmico post-impresión siguió el protocolo del fabricante: rampa de calentamiento de $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 160°C , mantenimiento isotérmico durante 3 horas, y enfriamiento controlado a $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Como electrodos se emplearon placas de grafito, seleccionadas a partir del proceso descrito en la sección 4.1.4 Selección y validación de materiales para electrodos, donde se determinó su idoneidad frente a la corrosión, la inercia química y la compatibilidad con el medio de cultivo. Estos electrodos fueron conectados a una fuente de poder continua (INSTEK CFG821), configurada para entregar los potenciales requeridos en los ensayos. Antes de cada aplicación del campo eléctrico, la cámara fue desinfectada rigurosamente mediante enjuagues con etanol al 70% y agua desionizada estéril, garantizando condiciones asépticas durante el proceso experimental. Las dimensiones finales de la cámara y la selección de los materiales se definieron a partir de simulaciones computacionales orientadas a garantizar la homogeneidad del campo eléctrico, las cuales se presentan en la sección de Resultados.

4.1.6. Condiciones de campo eléctrico

En condiciones asépticas, se inocularon 7 mL de stock de 72 horas ($\text{DO}_{600} = 0.1\text{ ABS}$) en 70 mL de medio *HS* estéril. La conductividad eléctrica se verificó mediante conductímetro calibrado (Hanna HI-2300) registrando $7.5\text{ mS}/\text{cm}$ a temperatura ambiente. El campo eléctrico se aplicó en un rango de $0.1\text{ V}/\text{cm}$ y $1\text{ V}/\text{cm}$, de forma continua durante 72 horas

con estabilidad de voltaje, mediante una fuente de poder corriente continua, siguiendo el método descrito por Sano et al. (2010). Al finalizar la biosíntesis de celulosa bacteriana bajo la aplicación del campo eléctrico, se procedió a medir el pH del medio de cultivo utilizando un pHmetro calibrado previamente con soluciones buffer estándar (pH 4.0 y 7.0).

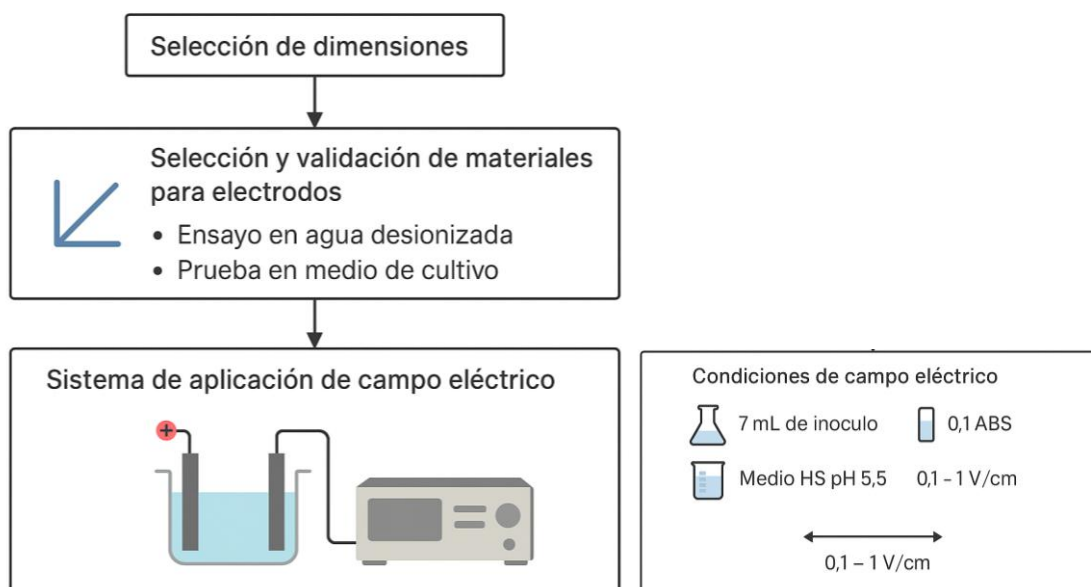


Figura 7. Esquema resumen de metodología de producción de CB bajo la aplicación de campo eléctrico.

4.1.7. Purificación, secado y cortado de las muestras

Las membranas de CB se purificaron mediante inmersión en 30 mL de NaOH 0.1 M durante 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación suave (60 rpm). Posteriormente, se realizaron lavados de agua destilada estéril de 5 a 7 ciclos hasta alcanzar pH 7.0, verificado mediante pHmetro. Esto fue acompañado de un tratamiento UV por 30 minutos. Luego se sometieron a un secado por convección en la estufa por 24 horas a 30°C. Para su uso como *scaffolds* fueron cortadas con un sacabocado de 1 cm². Luego fueron guardadas en placas Petri selladas con *Parafilm* en agua desionizada. La Figura 8, describe el proceso

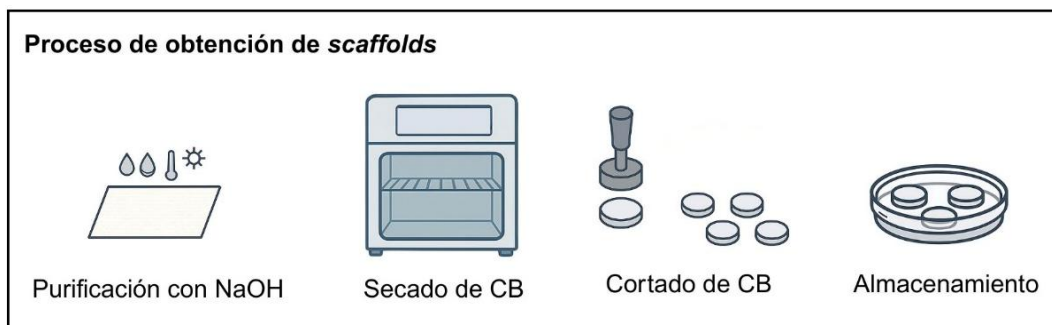


Figura 8. Proceso de obtención de *scaffolds* de CB. Purificación alcalina con NaOH y lavados hasta neutralidad; secado controlado de la lámina de CB en estufa, corte en discos y almacenamiento estéril en placa *Petri* con agua desionizada.

4.1.8. Determinación y cuantificación de lipopolisacáridos (LPS) presente en CB.

La cuantificación de endotoxinas se realizó mediante el ensayo endotoxinas por gelificación LAL gel-clot (PharmaOnco™ Kit IO-HMM27, sensibilidad: 0.125 EU/mL) siguiendo la norma USP <85>. Ensayo basado en la activación del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) en presencia de endotoxinas (Hurley, 1995). Las muestras de CB se cortaron de un tamaño 1 cm^2 manipuladas bajo condiciones estériles en tubos de vidrio certificados como libres de endotoxinas. Cada muestra se incubó con $100 \mu\text{L}$ de agua libre de endotoxinas (ALE) y reactivo LAL. El procedimiento consistió en someter las muestras a una preincubación a 100°C durante 5 minutos en termobloque, con el fin de desnaturalizar posibles interferentes. Posteriormente, tras el enfriamiento, se adicionaron $100 \mu\text{L}$ de agua libre de endotoxinas (ALE) y el reactivo LAL, seguido de una incubación a 37°C durante 60 minutos. Finalmente, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos y se realizó la lectura visual, considerando como resultado positivo (+) la formación de un gel cohesivo al invertir el tubo, y como resultado negativo (–) la ausencia de gelificación (Figura 9). Adicionalmente, se evaluó un tratamiento con polimixina B ($100 \mu\text{g/mL}$, 30 min, 37°C), antibiótico capaz de neutralizar endotoxinas. Se analizaron diluciones seriadas (1:1, 1:2 y 1:4) para determinar el punto final de detección.

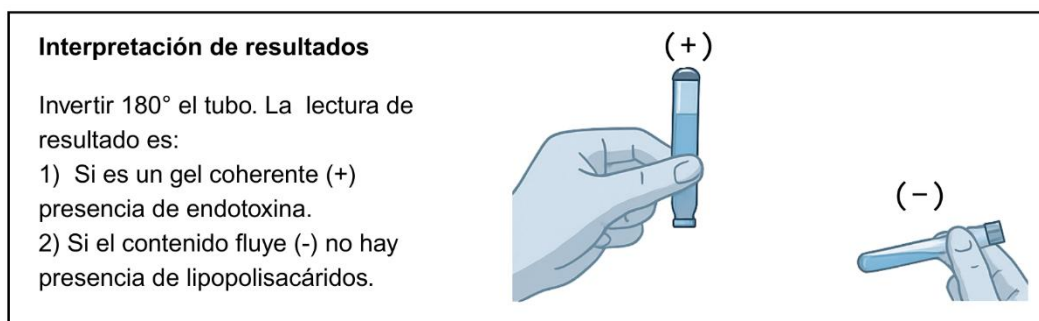


Figura 9. Interpretación GEL CLOT. (+) resultado positivo, (-) resultado negativo.

La concentración de endotoxinas se calculó usando la siguiente relación:

Ecuación 6. $Endotoxina \left(\frac{Eu}{mL} \right) = * \lambda \times dilución\ punto\ final$

Donde λ corresponde a la sensibilidad del reactivo LAL ($0.125\ EU \cdot mL^{-1}$ en este caso).

Este análisis permitió estimar de forma cualitativa y semi-cuantitativa los niveles residuales de endotoxinas presentes en las muestras de CB, sirviendo como base para validar los protocolos de purificación y asegurar la inocuidad del biomaterial.

4.2. Desarrollar un método de tracción mecánica para alinear nanofibras CB

4.2.1. Ensayos de tracción en *scaffolds* de CB

El objetivo de este ensayo fue caracterizar la respuesta de la CB a los ciclos de estiramiento, con el fin de estandarizar los parámetros de tracción que serían aplicados en estudios posteriores con tratamientos de campo eléctrico y tracción mecánica. Las muestras de CB se recortaron en dimensiones de $15\ mm \times 60\ mm$, manteniéndose hidratadas en agua destilada hasta el momento del ensayo.

4.2.2. Configuración del ensayo de tracción

El estiramiento se realizó mediante un sistema de tracción, equipado con celdas de carga de $\pm 0.1\ N$ de precisión y mordazas recubiertas en goma para evitar el deslizamiento de las muestras. La velocidad de cruceta se fijó en $2\ mm \cdot min^{-1}$, con una distancia inicial entre mordazas de $22\ mm$, las pruebas se ejecutaron a temperatura ambiente. Para establecer una línea base en el comportamiento mecánico de los *scaffolds*, se realizaron ensayos de

tracción sobre un grupo control sin aplicación de campo eléctrico. Las muestras fueron sometidas a 5, 15 y 30 ciclos (5 C, 15 C, 30 C) de estiramiento uniaxial.

4.2.3. Determinación del módulo de Young

El módulo de Young fue determinado a partir de datos experimentales obtenidos en ensayos de tracción uniaxial. Para cada muestra, se registraron los valores de fuerza aplicada (en newtons) y la elongación correspondiente (en milímetros). El resumen del proceso se observa en la Figura 10.

Cálculo del área transversal

Las muestras fueron cortadas con dimensiones conocidas, registrando su longitud inicial (L_0), ancho (b) y espesor (h) en tres puntos diferentes promediando los valores para una estimación precisa de la sección transversal. El área transversal (A) se calculó como

Ecuación 7. $A = b * h$

Donde A es el área transversal (mm^2), b es el ancho (mm) y h el espesor (mm)

Cálculo de deformación unitaria y esfuerzo

A partir de los datos experimentales se calcularon los siguientes parámetros:

La deformación unitaria (strain)

Ecuación 8. $\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$

Donde

- ε : es la deformación unitaria (adimensional),
- ΔL : elongación medida durante el ensayo (mm)
- L_0 : Longitud inicial de la muestra (mm)

El esfuerzo stress

Ecuación 9. $\sigma = \frac{F}{A}$

Donde

- σ : esfuerzo N/mm^2 o Mpa
- F : fuerza aplicada (N)
- A : área transversal calculada (mm^2)

Cálculo del módulo de Young

Se seleccionó la región inicial del ensayo correspondiente al comportamiento elástico lineal (usualmente para deformaciones menores al 2%) Se aplicó un ajuste lineal por regresión a los datos seleccionados. La pendiente de la recta resultante corresponde al módulo de Young (E) del material:

Ecuación 10.
$$E = \frac{d\sigma}{d\varepsilon}$$

- E es el módulo de Young (N/mm^2 o MPa).

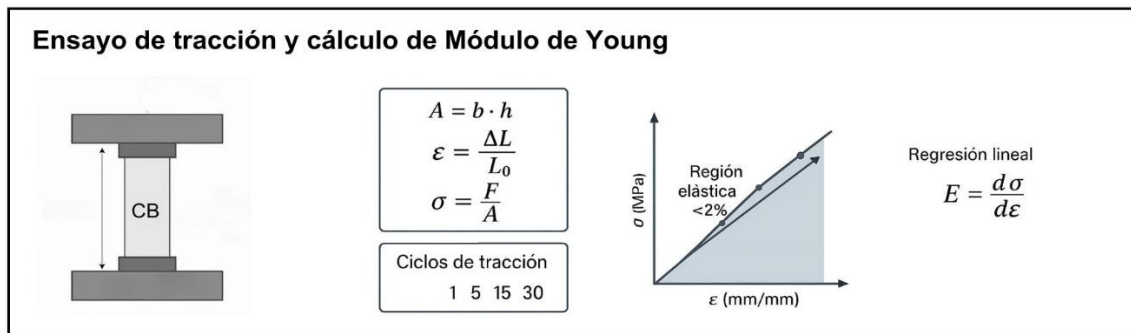


Figura 10. Imagen resumen. Ensayo de tracción y determinación del módulo de Young en CB. Elaboración propia.

4.3. Estudiar el efecto sinérgico entre la electroestimulación y la tracción mecánica para la producción de un *scaffolds* de nanofibras de CB.

4.3.1. Estudio del alineamiento de las nanofibras a través de microscopía electrónica de barrido (SEM)

La estructura fibrilar se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido Carl Zeiss SEM (EVO MA 10, Alemania), operando a 15 kV , corriente de haz de 100 pA y distancia de

trabajo de 8.5 mm. Todas las muestras de CB con sus respectivos tratamientos se secaron por 48 h a 30 °C y, posteriormente, se recubrieron con oro mediante pulverización catódica (capa de ~5 nm de espesor sobre la superficie de la muestra) mediante un pulverizador catódico de magnetrón de diodo (SPI Sputter Coater modelo 12161, EE. UU.). Se analizaron 10 campos aleatorios por muestra a diferentes magnificaciones. El diámetro promedio de la fibra, el ángulo entre las nanofibras y la dirección de estiramiento se determinaron a partir de diferentes imágenes de SEM utilizando la herramienta de ángulo del software ImageJ 1.40 G (NIH, EE. UU.). El rango de alineación posible estaba entre -90° y 90°. Un valor de 0° indica una alineación perfecta

4.3.2. Análisis de orientación de fibra

El análisis cuantitativo de orientación fibrilar se realizó mediante el plugin OrientationJ v2.0.5 (EPFL) en ImageJ/FIJI v1.53 (Rezakhaniha et al., 2012). Se procesaron imágenes de 2048 × 2048 píxeles, aplicando ventana gaussiana local ($\sigma = 1$ px) para evaluar el tensor de estructura. Se analizaron mínimo 200 fibras por muestra. Desde el complemento, se utilizaron los modos "Distribución" y "Dirección dominante" para analizar imágenes. OrientaciónJ también se utilizó para obtener frecuencias máximas de la distribución de ángulos para evaluar la coherencia de la orientación en varias técnicas de imagen (Ecuación 11).

$$\text{Ecuación 11. } C = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 2 (\cos^2 \alpha) - 1$$

Donde

- C: representa la coherencia de la orientación (valor entre 0 y 1)
- α : es el ángulo promedio de la fibra.
- n: es el número total de fibras analizadas

La coherencia varía de 0 a 1, donde 0 representa una imagen isotrópica sin ninguna orientación preferencial y 1 representa una imagen de distribución perfectamente alineada.

Interpretación de resultados

Coherencia > 0.7: Alineación excelente. 0.5 < Coherencia ≤ 0.7: Alineación buena 0.25 < Coherencia ≤ 0.5: Alineación moderada. Coherencia ≤ 0.25: Sin orientación preferencial

4.3.3. Estudio de morfología de las nanofibras mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

La evaluación cualitativa de la morfología del soporte nanoestructurado se llevó a cabo usando Flex AFM (Nanosurf Inc., Basilea, Suiza). se utilizaron chips qp-BioAC de NanoSensors (Watsonville, CA, EE. UU.), los cuales cuentan con tres voladizos con constantes elásticas y dimensiones distintas, lo que permitió seleccionar el más adecuado según la naturaleza de la muestra. Cada voladizo posee un radio de punta aproximado de 10 nm, proporcionando alta resolución en la caracterización de superficies nanoestructuradas. Además, incorporan un recubrimiento Uniqprobe que consiste en una capa reflectante de oro, que mejora la sensibilidad en la detección del láser y garantiza una mayor estabilidad del voladizo durante las mediciones. Las muestras son analizadas usando el modo contacto con vigas de silicio con constante nominal de resorte de 6 N/m y una frecuencia de resonancia de 1500 kHz, velocidad de barrido 0.5-1.0 Hz, con un área de barrido $5 \times 5 \mu\text{m}$ hasta $50 \times 50 \mu\text{m}$ (Cortes et al., 2020). La Figura 11, muestra la secuencia de procesos y técnicas utilizadas para observar y cuantificar la alineación de las nanofibras, integrando los resultados de SEM y AFM para una caracterización completa de la morfología fibrilar

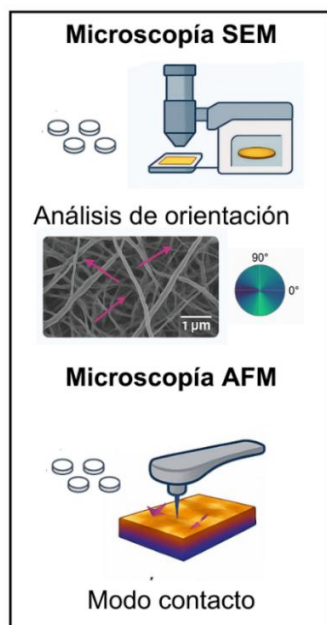


Figura 11. Caracterización morfológica de *scaffolds* de celulosa bacteriana. La microscopía electrónica de barrido (SEM) se utilizó para analizar la microestructura superficial y realizar el análisis de orientación de las nanofibras mediante el software OrientationJ (ImageJ). La microscopía de fuerza atómica (AFM), en modo contacto, permitió evaluar la nanoestructura y topografía del material con resolución nanométrica.

4.3.4. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Se utilizó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (Perkin Elmer Spectrum Two, EE. UU.) para comprobar que la estructura de celulosa no fuera afectada en la alineación de las nanofibras.

Preparación de las muestras

Antes de la adquisición de los espectros, las muestras se secaron durante 48 h a 30 °C utilizando un incubador refrigerado (Velp Scientifica, modelo FOC225E, Italia). con el fin de eliminar la humedad residual y asegurar la reproducibilidad de la señal.

Parámetros de adquisición

Las mediciones se realizaron con 16 escaneos por espectro, una resolución espectral de 4 cm⁻¹ fuerza aplicada de 40 N (presión constante) y un rango de número de onda de 500–4000 cm⁻¹, condiciones estándar que permiten obtener una adecuada relación señal/ruido y precisión en la identificación de bandas características. Cada muestra fue analizada por triplicado en diferentes puntos de la superficie para considerar la posible variabilidad espacial y confirmar la consistencia espectral. Los espectros obtenidos presentaron alta similitud entre réplicas, lo que respalda la precisión y confiabilidad del método.

4.3.5. Determinación del Índice de Cristalinidad mediante ATR-FTIR

El índice de cristalinidad (IC) se estimó a partir de los resultados obtenidos por espectroscopía ATR-FTIR. Este parámetro permite evaluar de manera indirecta el grado de orden estructural entre las regiones cristalinas y amorfas del biopolímero (Nelson & O'Connor, 1964; Sun et al., 2004).

Bandas características analizadas

Para su determinación se consideraron dos bandas características de la celulosa.

- 1429 cm⁻¹: atribuida a la vibración de deformación del grupo CH₂ en regiones cristalinas.
- 895 cm⁻¹: atribuida a la vibración C–O–C de tipo β-glucósido, asociada a regiones amorfas.

Ecuación 12.
$$IC = \frac{A_{1429}}{A_{895}}$$

Donde:

- IC: Índice de cristalinidad (sin dimensiones)
- A_{1429} : Intensidad (o absorbancia) de la banda a 1429 cm^{-1} .
- A_{895} : Intensidad de la banda a 895 cm^{-1} .

El procesamiento de los espectros ATR-FTIR se realizó siguiendo un protocolo estandarizado que incluyó la corrección automática de la línea base en el rango espectral de $500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ para eliminar interferencias del fondo. Posteriormente, todas las intensidades espectrales se normalizaron respecto a la banda de mayor intensidad para permitir comparaciones cuantitativas entre muestras. La medición de los picos característicos se realizó determinando la altura máxima de cada banda de interés, asegurando la reproducibilidad mediante un mínimo de tres mediciones por muestra en diferentes puntos de la superficie. Finalmente, se calculó el índice de cristalinidad promedio junto con su desviación estándar correspondiente, proporcionando una medida estadísticamente robusta del grado de cristalinidad de cada tratamiento evaluado.

4.3.6. Isotermas de sorción de agua

Las isotermas de sorción de agua de los diferentes tratamientos de nanofibras alineadas de CB, utilizando el analizador dinámico de sorción de vapor (DVS) (Intrinsic, Surface Measurement Systems). Las mediciones de sorción de agua se realizaron manteniendo una temperatura constante de 20°C durante todo el proceso experimental. El análisis cubrió un amplio rango de humedad relativa (HR) desde 0 hasta 95% HR, aplicando incrementos graduales de 10% por paso para asegurar una caracterización completa del comportamiento de sorción. En cada nivel de humedad relativa, se permitió que las muestras alcanzaran el equilibrio termodinámico, definido como el punto donde la variación de masa fuera inferior al 0.01% por hora, garantizando mediciones estables y reproducibles. Todo el proceso se desarrolló bajo una atmósfera controlada de nitrógeno de alta pureza (99.99%) para prevenir interferencias atmosféricas y asegurar la precisión de las mediciones gravimétricas. Cada muestra se secó por convección previamente hasta obtener la masa seca constante (X_0). La masa inicial de las muestras estuvo en el rango de $10\text{--}15\text{ mg}$. Posteriormente, se estableció una presión parcial de vapor (p) en el equipo, y la masa de la muestra (m_1) fue registrada en función del tiempo.

Modelo de ajuste GAB

Para ajustar los valores experimentales del contenido de humedad en equilibrio (*CHE*), se utilizó el modelo *GAB* (Guggenheim, Anderson y de Boer), ampliamente aplicado en sistemas biopoliméricos por su capacidad para describir tanto la adsorción en monocapa como en multicapa (Van den Berg & Bruin, 1981).

Ecuación 13.
$$CHE = \frac{X_0 * C * K}{(1 - K * a_w) * (1 + (C - 1) * K * a_w)}$$

- Contenido de humedad en equilibrio (*g agua/g sólido seco*)
- X_0 : Contenido de humedad de la monocapa (*g agua/g sólido seco*)
- C : Constante de Guggenheim, característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa.
- K : Constante relacionada con el calor de adsorción de multicapa.
- a_w : Actividad de agua.

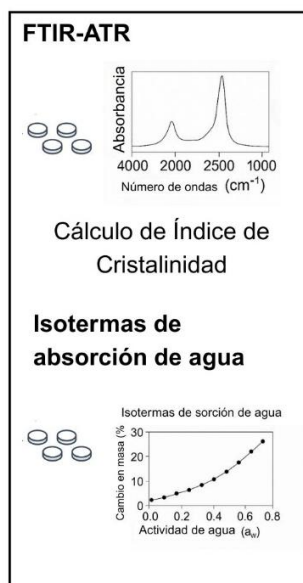


Figura 12. Esquema de caracterización fisicoquímica de scaffolds de CB. e incluyen los análisis por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier en modo de reflectancia total atenuada (FTIR-ATR), utilizados para calcular el índice de cristalinidad, y las isotermas de sorción de agua, empleadas para determinar la capacidad de absorción y la interacción del material con la humedad ambiental. Elaboración propia.

4.3.7. Evaluación de interacción entre factores

Para evaluar el efecto combinado de la intensidad de campo eléctrico y los ciclos de tracción sobre las propiedades de las muestras, se diseñó un experimento utilizando un diseño factorial 3^2 (Montgomery, 2017) Nueve combinaciones de condiciones fueron evaluadas. Cada muestra se sometió a una combinación específica de intensidad de campo eléctrico y ciclos de tracción, permitiendo analizar tanto los efectos individuales como la interacción entre ambos factores en las propiedades evaluadas. El estudio de las combinaciones entre factores permite predecir comportamientos e impactos relacionados sobre las variables evaluadas.

Ecuación 14. $\sigma = aV + bE + c(V * E) + dV^2 + cE^2$

- σ : variable de respuesta.
- V : intensidad del campo eléctrico (V/cm).
- E : número de ciclos de tracción.
- a, b, c, d coeficientes del modelo.

4.4. Evaluar la biocompatibilidad del *scaffolds* en un modelo *in-vitro* de células musculares.

4.4.1. Condiciones de cultivo de células musculares

La línea celular de mioblastos de ratón (*Mus musculus*) C2C12 (ACC 565) se adquirió en European Collection Cell Cultures (ECACC), suministrada por el laboratorio de Ingeniería de Tejidos de la Universidad Federico Santa María. Las células se cultivaron en frascos de cultivo T-75 cm^2 en condiciones estándar ($37^\circ C$ y 5% de CO_2 en una atmósfera humidificada al 95%) usando DMEM (High glucose) como medio de cultivo celular, suplementado con suero bovino fetal al 10%, L -glutamina (2 mM) y 1% antibióticos (100 U/mL de penicilina y 100 $\mu g/mL$ de estreptomina) (Enrione et al., 2017). Las cuales se sub cultivarán cada 72 horas al alcanzar 80% de confluencia para mantener su estado proliferativo óptimo. El procedimiento de subcultivo incluyó lavados con PBS estéril precalentado, tripsinización con tripsina-EDTA 0.25% durante 3-5 minutos a $37^\circ C$, neutralización con medio completo y reposición con dilución 1:10 para mantener la densidad de población original, verificando una viabilidad celular superior al 95% mediante exclusión con azul de tripiano.

4.4.2. Ensayo de citotoxicidad *in-vitro*

El ensayo de citotoxicidad se realizó utilizando la prueba WST-1 (4-[3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3 disulfonato de benceno) el cual genera un producto de sal insoluble de color púrpura (formazán). Este método permite evaluar la actividad metabólica de las células, ya que las sales de tetrazolio solubles en agua son reducidas a formazán únicamente en presencia de células metabólicamente activas (Berridge, 2005). El WST-1 es un ensayo colorimétrico en el cual la cantidad de formazán producido se cuantifica mediante espectrofotometría.

La prueba se efectuó de manera indirecta siguiendo la norma ISO 10993-5 para ensayos de citotoxicidad *in-vitro*, en la que las muestras se consideran citotóxicas si la viabilidad celular disminuye al 70% o menos en comparación con el control negativo. Este método indirecto se basa en el uso de medio condicionado, evitando el contacto directo entre las células y los *scaffolds*, lo que permite evaluar únicamente los efectos de los productos solubles liberados por el material. Para evaluar la citotoxicidad de los *scaffolds*, estos se cortaron en fragmentos de $1 \times 1 \text{ cm}^2$ y se colocaron en placas de cultivo de 24 pocillos con medio completo (DMEM suplementado con 10% SBF, 1% antibióticos y 1% L-glutamina) durante 24 horas. Posteriormente, el medio condicionado por el contacto con los *scaffolds* se utilizó para el crecimiento de células C2C12, sembradas a una densidad de 5×10^3 células. El efecto citotóxico se evaluó a las 24 y 48 horas de cultivo mediante la adición del reactivo WST-1, incubando las placas durante 1 hora a 37°C , y midiendo midiendo la absorbancia a 460 nm . Este proceso de acondicionamiento permitió que cualquier compuesto soluble presente en los *scaffolds* se liberara al medio de cultivo, generando así el medio condicionado que posteriormente se utilizó para los ensayos celulares. En la Figura 13, se puede observar un esquema de trabajo utilizado. Como control negativo se emplearon células cultivadas con medio fresco (24 h en incubadora) sin contacto con los *scaffolds*, y como blanco, medio fresco (24 h en incubadora) sin células ni adición del reactivo WST-1. El cálculo de la citotoxicidad se realizó utilizando la siguiente fórmula:

Ecuación 15. $\% \text{ Viabilidad} = \frac{(DOm - DOb)}{(DOc - DOb)}$

- DOm = Densidad óptica muestra
- DOb = Densidad óptica blanco
- DOc = Densidad óptica control



Figura 13. Flujo experimental para evaluar la biocompatibilidad *in-vitro* de *scaffolds* de celulosa bacteriana con mioblastos C2C12. El esquema muestra la incubación de los *scaffolds* en medio completo durante 24 horas para generar medio condicionado, la posterior exposición de células C2C12 a dicho medio, y la cuantificación de la viabilidad celular mediante el ensayo WST-1, que mide la actividad metabólica por la reducción de sales de tetrazolio a formazán. Elaboración propia.

4.4.3. Evaluación morfología celular

Para la evaluación de la morfología celular, se sembraron sobre los *scaffolds* de celulosa las células C2C12 a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por cm^2 . Las células se dejaron proliferar por 3 días, donde luego el medio de proliferación se cambió por medio de diferenciación. Se realizó doble tinción fluorescente utilizando Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para tinción nuclear y rodamina faloidina (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para tinción del citoesqueleto de actina. El procedimiento de tinción incluyó la fijación de las células con paraformaldehído 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con buffer TRIS (pH 7.6) de 5 minutos cada uno. Posteriormente se realizó la permeabilización con Tritón X-100 0.1% durante 10 minutos, seguida de tres lavados adicionales con buffer TRIS. La incubación simultánea de ambos fluoróforos se realizó durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, utilizando Hoechst 33342 en dilución 1:10.000 y rodamina faloidina en dilución 1:200. Finalmente, se realizaron tres lavados con buffer TRIS y las muestras se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su observación en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2FL, Tokyo, Japón).

4.4.4. Inmunofluorescencia

Se realizó inmunofluorescencia para identificar la expresión del marcador tardío de miogénesis (miosina cadena pesada monoclonal de ratón, 1:500, sc-376157; Santa Cruz Biotechnology). Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por centímetro cuadrado y proliferaron en condiciones estándar, para luego cambiar a medio de diferenciación, en el cual se reemplaza suero bovino fetal por suero de caballo. Las células se diferenciaron hasta distintos tiempos según el marcador que se quería identificar 5 días. El protocolo de inmunofluorescencia incluyó la fijación de las células con paraformaldehído 4% durante 10 minutos, seguida de tres lavados con buffer TRIS pH 7.6 y permeabilización con Tritón X-100 0.1% durante 15 minutos. Posteriormente se realizó el bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% durante 30 minutos, seguido de la incubación con el anticuerpo primario anti-*MHC* (1:500) durante 1 hora a 37°C. Después de tres lavados con buffer TRIS, se incubó el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 (cabra anti-ratón) en dilución 1:500 durante 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se realizaron tres lavados con buffer TRIS y las muestras se observaron inmediatamente en un microscopio invertido de epifluorescencia (Nikon Eclipse TS2FL, Tokyo, Japón)

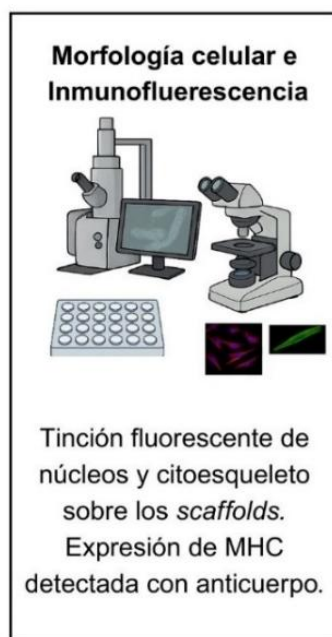


Figura 14. Esquema representativo del proceso de inmunofluorescencia utilizado para la caracterización celular. Se muestra la tinción fluorescente de núcleos, la observación de la morfología celular y la detección específica de la expresión del marcador de miosina de cadena pesada (*MHC*) en células C2C12. Elaboración propia.

5. RESULTADOS

5.1. Condiciones de cultivo control *Komagataeibacter sucrofermentans*

El crecimiento de *Komagataeibacter sucrofermentans* en medio HS se monitoreo mediante mediciones de densidad óptica (DO) a 600 nm cada hora, durante 72 horas utilizando como referencia (blanco) el medio HS fresco. La Figura 15, muestra la curva de crecimiento y la representación en escala logarítmica para la fase exponencial, donde se calcularon la tasa específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (g). La curva de crecimiento obtenida mostró las fases características: latencia (0-2.1 h), exponencial (2.1-10.3 h) y estacionaria (>10.3 h) (Figura 15A). El análisis de la fase exponencial mediante regresión lineal de $\ln(DO_{600})$ vs tiempo (Figura 15B) permitió determinar los parámetros cinéticos presentados en la Tabla 3.

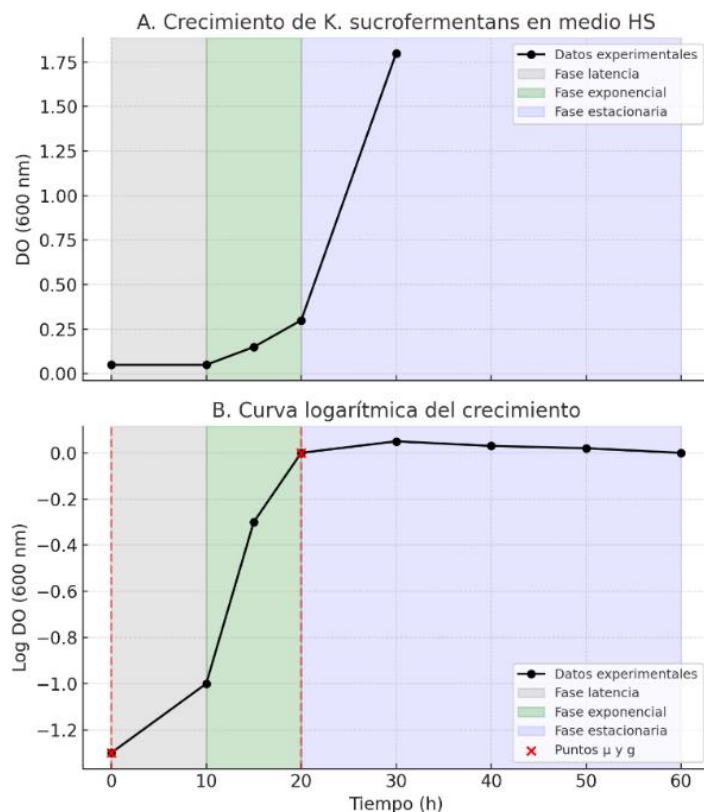


Figura 15. Curva de crecimiento de *Komagataeibacter sucrofermentans* cultivado en medio HS. (A) Curva de crecimiento expresada como densidad óptica (DO) a 600 nm. (B) Curva de crecimiento en escala logarítmica (Log DO 600 nm) empleada para la determinación de parámetros cinéticos. Las áreas sombreadas indican las fases de crecimiento: latencia (gris), exponencial (verde) y estacionaria (azul). Los puntos en rojo representan los valores experimentales utilizados para el cálculo de μ ($0.15 h^{-1}$) y t_d (4.63 h).

Tabla 3: Parámetros cinéticos de *Komagataeibacter sucrofermentans* en medio HS

Parámetro	μ (h^{-1})	td (h)	Duración fase lag (h)	DO ₆₀₀ Máx
Valor $\pm$ DE	0.15 $\pm$ 0.00	4.63 $\pm$ 0.25	2.85 $\pm$ 0.12	2.1 $\pm$ 0.3

5.2. Diseño de cámara micro crecimiento y simulación de campo eléctrico

Para el diseño de la microcámara experimental se evaluaron dos configuraciones geométricas para la microcámara y dos para los electrodos mediante simulaciones computacionales en Mathematica (Tabla 4).

Tabla 4: Dimensiones evaluadas para la microcámara y las placas de electrodos

Elemento	Opción	Ancho (mm)	Largo (mm)	Alto (mm)
Microcámara	#1	40	50	30
	#2	20	30	25
Electrodos	#A	10	10	0.15
	#B	20	30	0.25

Nota. Las dimensiones corresponden a configuraciones geométricas evaluadas en las simulaciones de campo eléctrico (Mathematica). Las medidas de la microcámara se expresan como ancho $\times$ largo $\times$ alto de la cavidad interna, mientras que las de los electrodos corresponden al área de contacto y espesor de la placa.

La Figura 16, muestra resultados de la simulación de campo eléctricos de las microcámaras con diferentes dimensiones, la microcámara #1, al presentar mayores dimensiones, favorece una mayor exposición al campo eléctrico, que la opción #2 limita la distribución del biopolímero dentro del volumen de crecimiento. En cuanto a las placas de electrodos, la opción #B (20 $\times$ 30 $\times$ 0.25 mm) generó una transferencia de corriente más homogénea, lo que se tradujo en un campo eléctrico con mayor uniformidad. Las simulaciones evidenciaron que la aplicación de un voltaje adecuado entre los electrodos seleccionados produce una distribución del campo eléctrico compatible con los requisitos necesarios para inducir la alineación controlada de nanofibras de CB. Entre las configuraciones evaluadas, la combinación de microcámara #1 y electrodos tipo B resultó ser la más favorable, al proporcionar un campo uniforme y predominantemente uniaxial, condiciones críticas para promover la orientación direccional de las nanofibras en el medio de cultivo.

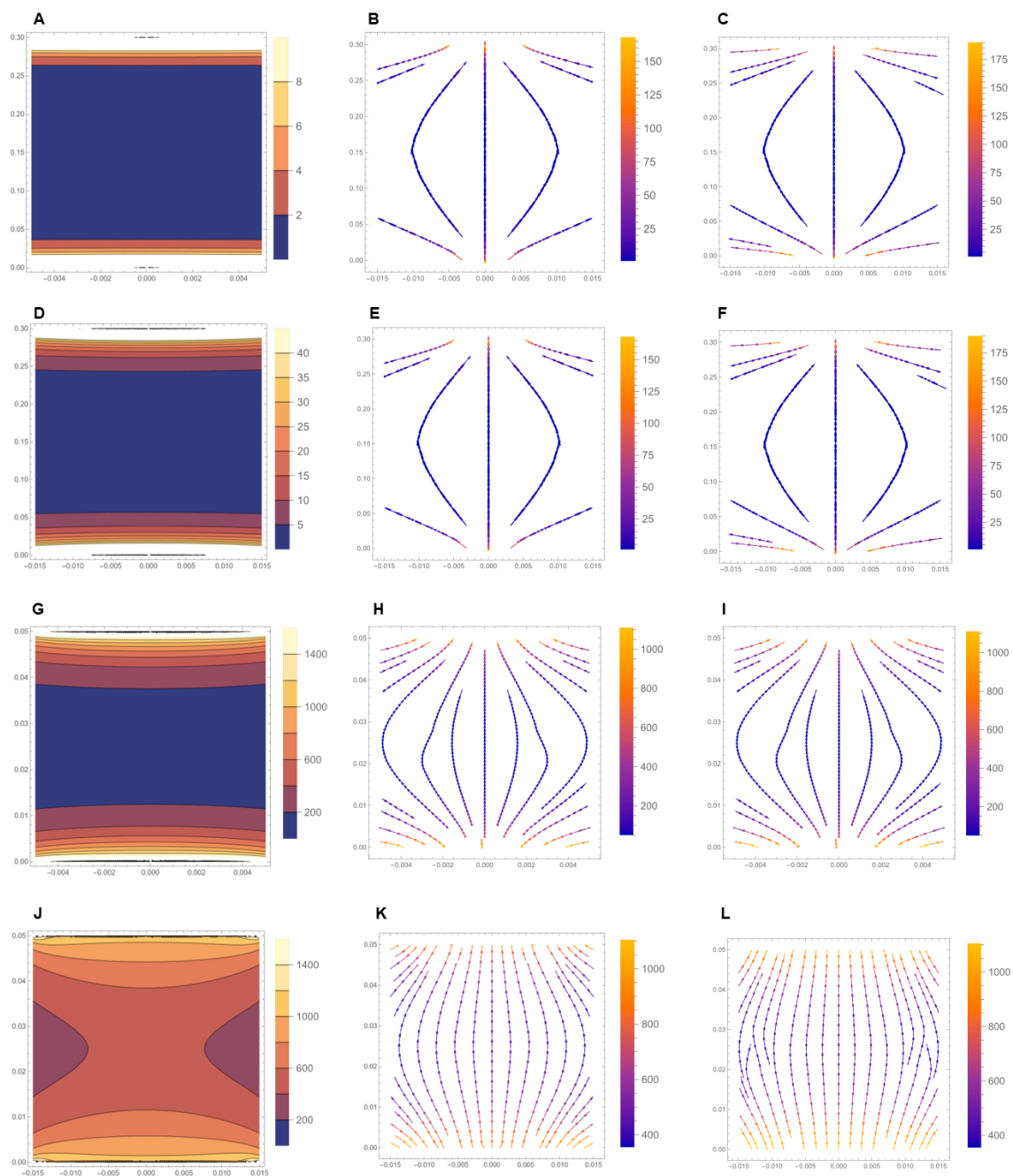


Figura 16. Mapas de contorno y líneas de campo eléctrico en distintas configuraciones de la microcámara de crecimiento. Se observa la uniformidad y orientación del campo necesarias para inducir la alineación controlada de nanofibras de celulosa bacteriana. Las simulaciones fueron realizadas mediante el software Mathematica. Configuración 1: Microcámara #1 + Electrodo #A (A, B, C). Configuración 2: Microcámara #1 + Electrodo #B (D, E, F). Configuración 3: Microcámara #2 + Electrodo #A (G, H, I). Configuración 4: Microcámara #2 + Electrodo #B (J, K, L).

El análisis matricial del tensor de campo eléctrico se realizó con el propósito de confirmar la validez de la configuración geométrica seleccionada.

$$E = \begin{pmatrix} 689.92 & 0 & -2,82 \times 10^{-13} \\ 0 & 1729.52 & 0 \\ -2,82 \times 10^{-13} & 0 & -2419.45 \end{pmatrix}$$

Figura 17. Tensor de campo eléctrico obtenido para la configuración de la microcámara (40 × 50 × 30 mm) con electrodos de grafito (20 × 30 × 0,25 mm). Los valores diagonales reflejan la intensidad en los ejes principales, confirmando un campo predominantemente uniaxial. Los valores están expresados en V/m (simulación realizada con intensidad de entrada de 1 V/cm).

Los valores diagonales de la matriz (689,92; 1729,52; -2419,45) corresponden a la intensidad del campo en los ejes *x*, *y* y *z*, respectivamente. La mayor magnitud observada en el eje *y* sugiere que el campo se concentra principalmente en esta dirección, lo que favorecería la orientación de las nanofibras en dicho eje. En contraste, el valor negativo asociado al eje *z* indica una disminución de la intensidad en esa dimensión. Los términos extra diagonales, cercanos a cero (del orden de 10⁻¹³), reflejan una interacción mínima entre componentes, lo que confirma la presencia de un campo prácticamente uniaxial. En conjunto, estos resultados respaldan la selección de la configuración geométrica de la microcámara (40 × 50 × 30 mm) con electrodos de grafito (20 × 30 × 0,25 mm), al proporcionar la mejor combinación de uniformidad e intensidad de campo. Esta disposición se estableció como base para los experimentos de aplicación de campo eléctrico durante la biosíntesis *in-situ* de CB.

5.2.1. Evaluación visual de materiales de electrodos en medio de cultivo bajo campo eléctrico

Con el objetivo de seleccionar un material de electrodo adecuado para la aplicación de campos eléctricos durante el cultivo de *Komagataeibacter sucrofermentans*, se llevó a cabo una evaluación visual comparativa de tres materiales comúnmente utilizados: cobre, acero inoxidable y grafito. La elección del material del electrodo es un aspecto crítico, ya que influye directamente en la eficiencia de transferencia de corriente y en la estabilidad química del sistema. Un material inadecuado puede liberar especies reactivas o productos de corrosión que interfieran con el crecimiento bacteriano o afecten la producción de celulosa.

Para este análisis, los electrodos fueron inicialmente sumergidos en agua destilada y posteriormente en medio de cultivo HS, manteniendo la aplicación de un campo eléctrico continuo durante 72 horas. Las observaciones se registraron a las 2 y 72 horas, documentando los cambios en el entorno del electrodo (agua o medio de cultivo) y en su superficie. Los resultados visuales de este ensayo se presentan en la Figura 18. En el caso del cobre, a las 2 horas se evidenció una coloración parda en el agua, indicativa de oxidación superficial. A las 72 horas, la solución presentó turbidez marcada, depósitos visibles y un cambio notable en su coloración, asociado a la liberación de iones cúpricos y productos de corrosión. El electrodo mostró deterioro evidente, confirmando su inestabilidad en condiciones de cultivo. El acero inoxidable presentó un oscurecimiento leve del medio de cultivo a las 2 horas, que se intensificó tras 72 horas, alcanzando una coloración negra en la zona cercana al electrodo. Este efecto sugiere la ocurrencia de reacciones redox indeseadas, lo que compromete la estabilidad del sistema. Además, el electrodo mostró la formación de una película superficial y manchas de oxidación, evidenciando procesos de degradación progresiva. Por el contrario, el grafito exhibió una estabilidad significativamente mayor. Tras 2 horas, el medio permaneció sin alteraciones visibles, y después de 72 horas se observó una capa superficial de CB sin signos de turbidez ni precipitados metálicos. El electrodo no presentó cambios estructurales ni de coloración, lo que confirma su baja reactividad y alta estabilidad bajo campo eléctrico. Las propiedades fisicoquímicas relevantes de los materiales se resumen en la Tabla 5, incluyendo parámetros como conductividad eléctrica, resistividad, densidad, potencial redox y punto de fusión. Entre ellos, el grafito resalta por su baja reactividad y elevada estabilidad química, reduciendo el riesgo de electrólisis y liberación de iones metálicos al medio de cultivo. Además, su menor densidad facilita la manipulación y minimiza la probabilidad de contaminación en comparación con el acero y el cobre.

Tabla 5: Propiedades físicas y electroquímicas de materiales utilizados como electrodos en la microcámara de crecimiento

Material	Conductividad (S/m)	Resistividad ($\Omega * m$) 20°C	Densidad (g/cm^3) a	Potencial redox (V)	Punto de fusión T °C	Ref
Acero	1.01×10^7	20×10^{-8}	7.9	Fierro: - 0.44	1528	ThoughtCo
Cobre	5.87×10^7	1.72×10^{-8}	8.9	+ 0.33	1083	ThoughtCo
Grafito	5.9×10^6	3.5×10^{-5}	1.8	Carbono: + 0.73	~2500	AZoM (2019)

En conjunto, estos resultados respaldan la elección del grafito como el material más idóneo para aplicaciones con microorganismos, garantizando tanto la estabilidad del medio de cultivo como la integridad estructural de los electrodos.

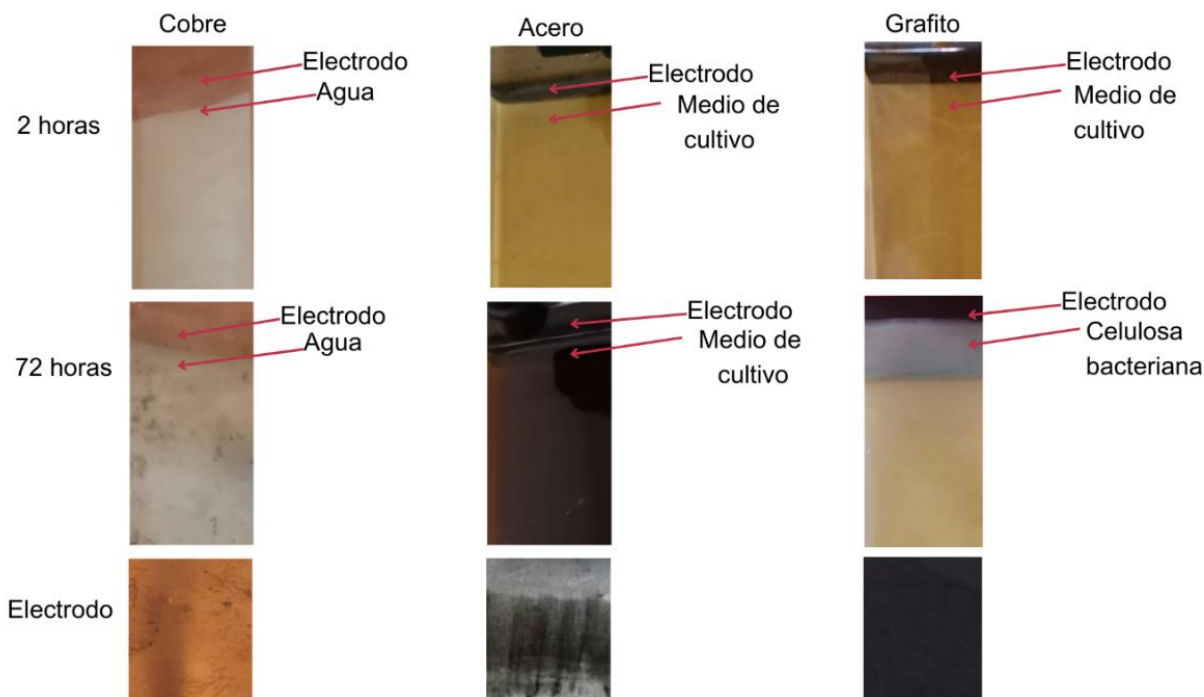


Figura 18. Evaluación visual del comportamiento de electrodos en condiciones de cultivo y campo eléctrico. Se observan los efectos de cada material sobre el medio y sobre la integridad del electrodo. El cobre y el acero generan turbidez, precipitados y productos de corrosión, mientras que el grafito mantiene el medio estable y permite la formación de celulosa bacteriana.

5.2.2. Efecto del campo eléctrico en la producción de CB

Con el propósito de evaluar la influencia de distintos niveles de campo eléctrico sobre la producción de CB se realizaron cultivos de *Komagataeibacter sucrofermentans* bajo condiciones controladas, aplicando una diferencia de potencial en una microcámara de diseño específico. La producción de biopolímero fue monitoreada al término del ensayo, observando la presencia o ausencia de CB como indicador de viabilidad metabólica bajo cada condición eléctrica. Los resultados experimentales se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Producción de celulosa bacteriana bajo diferentes intensidades de campo eléctrico

Campo eléctrico (V/cm)	Voltaje sometido (V)	Producción de biopolímero	Cambio pH medio de cultivo
0	0	SI	NO
0.2	1	SI	NO
0.4	2	SI	NO
0.6	3	SI	NO
0.8	4	NO	SI
1	5	NO	SI

Nota. Rango de viabilidad identificado 0.2- 0.6 V/cm y umbral de inhibición $\geq 0.8 V/cm$. $n=5$

Las mediciones de pH obtenidas en los cultivos de *Komagataeibacter sucrofermentans*, en 0.8 y 1 V/cm alcanzaron valores entre 7.8 - 8, indicando un entorno más alcalino, donde la viabilidad celular se compromete, dado que el crecimiento óptimo de esta bacteria generalmente se encuentra entre 4.5 - 6.0. La alcalinidad excesiva puede alterar el metabolismo celular, provocar estrés osmótico y afectar negativamente la síntesis del biopolímero. Además, un pH elevado puede favorecer la electrólisis del medio, generando subproductos nocivos que interfieren con la actividad metabólica de las bacterias. Se evidenció que la síntesis de biopolímero fue notable en muestras expuestas a intensidades de hasta 0.6 V/cm , mientras que a partir de 0.8 V/cm la producción fue completamente inhibida. En función de los resultados, se establece que un rango seguro para aplicar campo eléctrico, sin afectar la viabilidad bacteriana ni la integridad del medio, se encuentra entre 0.2 y 0.6 V/cm . Este intervalo constituye un rango óptimo para estudios posteriores orientados a inducir la alineación nanofibrilar de la CB sin comprometer la producción del biopolímero. Los siguientes ensayos se realizaron solo en condiciones de 0, 0.2, y 0.4 V/cm , ya que estos son los rangos compatibles con una biosíntesis estable y replicable. Las configuraciones experimentales utilizadas se ilustran en las Figuras 19 y 20.

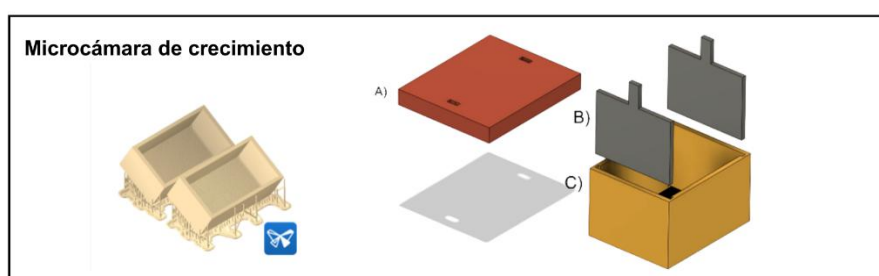


Figura 19. Imagen de software y proyección de sistema de aplicación de campo eléctrico *in-situ* de CB. A) Tapa de silicona B) electrodos de grafito, C) Camara 3D.



Figura 20. Fotografías de electrodos y sistema de aplicación de campo eléctrico real. A la izquierda se observa un electrodo de grafito utilizado en la microcámara de cultivo, mientras que a la derecha se muestra la conexión de la cámara a la fuente de poder de corriente continua empleada para aplicar los potenciales eléctricos durante la biosíntesis de CB.

5.2.3. Simulación del campo eléctrico aplicado en la microcámara

Con el fin de evaluar la distribución espacial del campo eléctrico generado dentro de la microcámara de crecimiento, se realizaron simulaciones computacionales mediante el software Mathematica. Estas simulaciones permitieron visualizar la intensidad del campo y la orientación de sus líneas de flujo en los ejes X y Y bajo diferentes condiciones de voltaje. Este análisis fue fundamental para determinar si las condiciones generadas en la cámara son favorables para inducir la alineación direccional de las nanofibras de CB. La Figura 21, presenta los resultados obtenidos para tres condiciones: sin aplicación de voltaje (0 V/cm), y con intensidades de campo eléctrico de 0.2 V/cm y 0.4 V/cm .

En el panel A, correspondiente a 0 V/cm , se observa que no existe distribución de campo eléctrico en el espacio de la cámara, manteniéndose una intensidad nula en toda el área de cultivo. Esta condición se emplea como control negativo, y permite comparar los efectos generados por la aplicación de campos eléctricos. Los paneles B y C muestran la distribución de intensidad del campo a 0.2 V/cm y 0.4 V/cm , respectivamente. En ambas condiciones se aprecia una distribución simétrica en el área de la cámara, con regiones de mayor intensidad hacia los bordes y una zona central con intensidad más homogénea. Esta configuración favorece la creación de un entorno estable en el centro de cultivo, lo que resulta adecuado para promover la orientación ordenada de nanofibras sin inducir estrés eléctrico en el sistema. Por otra parte, los paneles D, E y F representan la direccionalidad de las líneas de campo eléctrico en el eje X para 0 , 0.2 y 0.4 V/cm , respectivamente. Mientras que a 0 V/cm no se detecta orientación alguna, las condiciones de 0.2 y 0.4 V/cm

muestran claramente una concentración de líneas hacia el centro, lo que sugiere una orientación del campo favorable para inducir alineación unidireccional de las nanofibras en ese eje.

De forma análoga, los paneles G, H e I ilustran la orientación del campo eléctrico en el eje Y, donde también se evidencia una curvatura de las líneas de campo hacia el centro de la cámara cuando se aplican 0.2 y 0.4 V/cm . Este patrón confirma la homogeneidad y simetría del campo en ambas direcciones, lo cual es deseable para la orientación estructural del biopolímero durante la biosíntesis. En conjunto, estos resultados demuestran que el rango de intensidad entre 0.2 y 0.4 V/cm genera un campo suficientemente uniforme y direccionado en el centro de la cámara, constituyéndose como un entorno óptimo para inducir la alineación controlada de nanofibras de CB durante el proceso de crecimiento *in situ*.

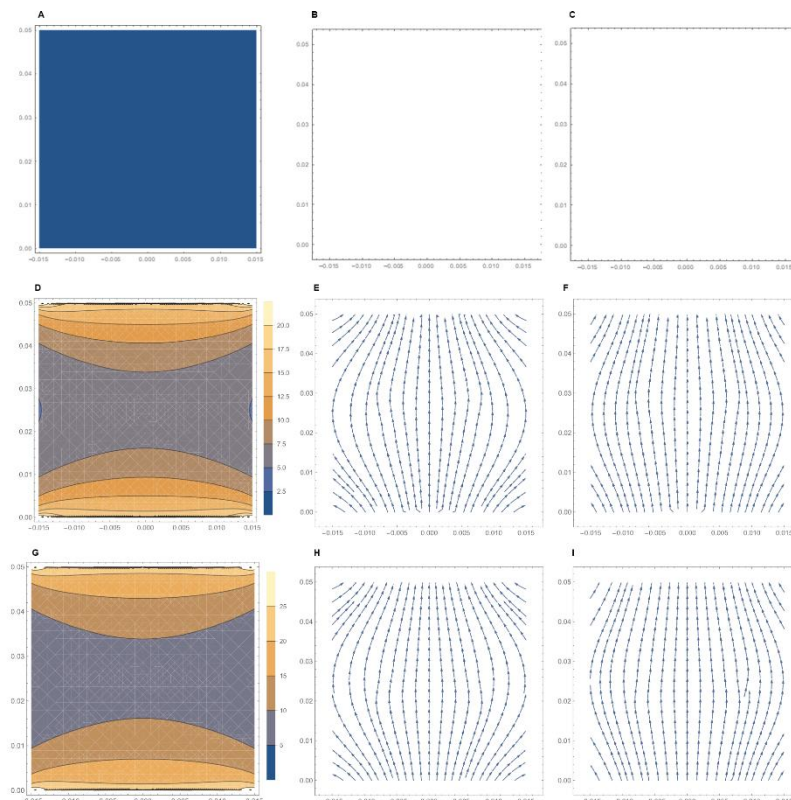


Figura 21. Simulación de la distribución del campo eléctrico en la microcámara de crecimiento, realizada en Mathematica. (A–C) Distribución de intensidad de campo para 0, 0.2 y 0.4 V/cm , respectivamente. (D–F) Direccionalidad de las líneas de campo eléctrico en el eje X para 0, 0.2 y 0.4 V/cm . (G–I) Direccionalidad de las líneas de campo eléctrico en el eje Y para 0, 0.2 y 0.4 V/cm . Se observa que, a mayor intensidad aplicada, aumenta la orientación de las líneas hacia el centro de la cámara, lo que sugiere un entorno favorable para la alineación estructural de las nanofibras de celulosa bacteriana

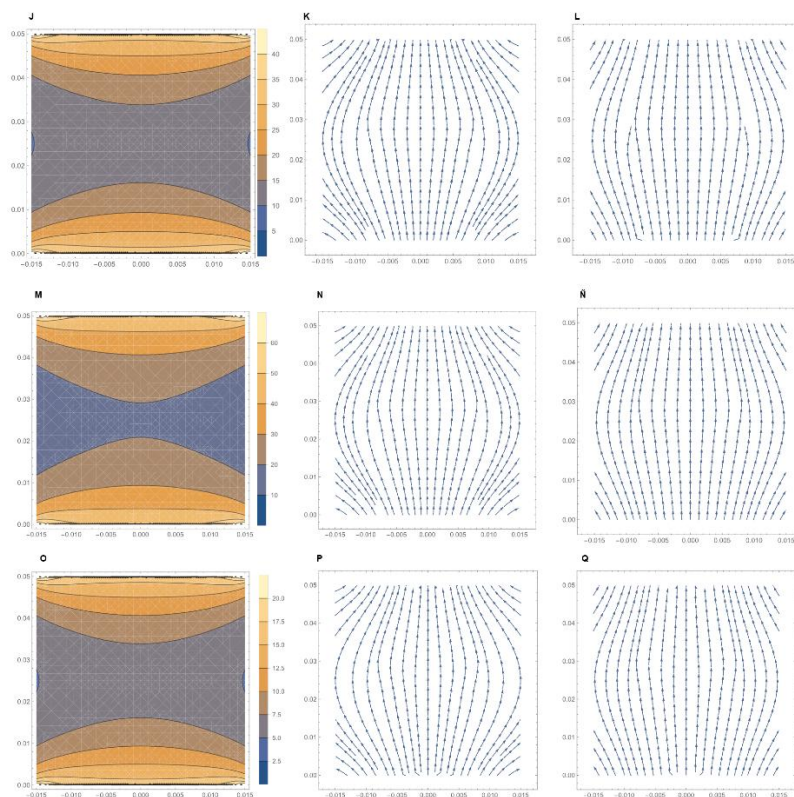


Figura 21. Simulación de la distribución del campo eléctrico en la microcámara de crecimiento, realizada en Mathematica. (A–C) Distribución de intensidad de campo para 0, 0.2 y 0.4 V/cm , respectivamente. (D–F) Direccionalidad de las líneas de campo eléctrico en el eje X para 0, 0.2 y 0.4 V/cm . (G–I) Direccionalidad de las líneas de campo eléctrico en el eje Y para 0, 0.2 y 0.4 V/cm . Se observa que, a mayor intensidad aplicada, aumenta la orientación de las líneas hacia el centro de la cámara, lo que sugiere un entorno favorable para la alineación estructural de las nanofibras de celulosa bacteriana.

5.2.4. Biosíntesis de celulosa bacteriana bajo inducción de campo eléctrico

Con el objetivo de evaluar el efecto del campo eléctrico sobre la morfología y producción de CB. Se cultivo *Komagataeibacter sucrofermentans* bajo diferentes intensidades de campo eléctrico 0 V/cm (control), 0.2 V/cm y 0.4 V/cm durante 72 horas horas de incubación a 30°C. La Figura 22, presenta la apariencia macroscópica de la CB obtenidas bajo estas condiciones. Visualmente, no se observaron diferencias notables en su forma rectangular, adaptada a la geometría de la microcámara, de textura lisas y uniformes, transparentes con opacidad blanquecina, independientemente de la intensidad del campo aplicado. La formación de la membrana es visible en la superficie del medio de cultivo, no se adhieren a los electrodos y es visible desde las 48 horas. Son de fácil manipulación, mantienen su integridad y flexibilidad en todo el proceso.

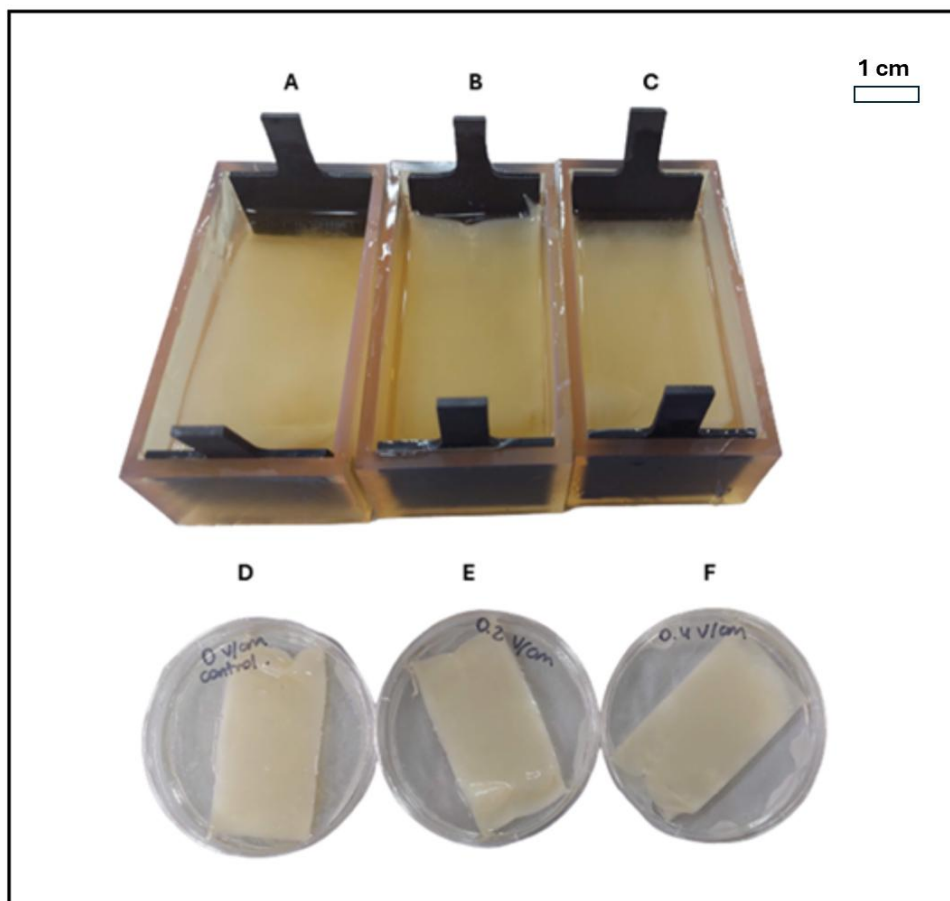


Figura 22. Morfología macroscópica de CB cultivadas bajo diferentes intensidades de campo eléctrico. A-C: CB en microcámaras experimentales durante el cultivo (A: 0 V/cm, B: 0.2 V/cm, C: 0.4 V/cm). D-F: CB extraídas y purificadas (D: 0 V/cm control, E: 0.2 V/cm, F: 0.4 V/cm). Se observa una apariencia morfológica similar entre condiciones, sin diferencias macroscópicas visibles. *Fotografía de celulosa sintetizada bajo campo eléctrico.*

5.2.5. Determinación de LPS presente en muestras de celulosa bacteriana

Con el fin de evaluar la presencia de lipopolisacáridos (LPS) en muestras de CB obtenidas bajo diferentes condiciones de purificación, se empleó un ensayo endotóxico utilizando diluciones seriadas (1:1, 1:2, 1:4) y la aplicación de polimixina B (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), un antibiótico que neutraliza específicamente endotoxinas bacterianas como el LPS. Este análisis permitió cuantificar de manera comparativa los niveles residuales de endotoxinas y la eficacia de los tratamientos de purificación aplicados. Los resultados obtenidos en diferentes condiciones experimentales se resumen en las Tabla 7, incluyendo controles positivos, muestras tratadas con polimixina y fases líquidas del cultivo.

Tabla 7: Resultados del ensayo LAL gel-clot en muestras de CB purificada y no purificada, con y sin polimixina B.

Nombre	Dilución 1:1	Dilución 1:2	Dilución 1:4	Punto final (EU mL ⁻¹)
CB no purificada + polimixina	+	+	+	≥0.5
CB no purificada	+	-	-	0.25
CB purificada + polimixina	+	-	-	0.125
CB purificada	-	-	-	<0.125 (no detectable)
Control negativo (ALE + LAL)	-	-	-	ND
Control positivo (endotoxina estándar)	+	+	-	0.25
Sobrenadante no purificado	+	ND	ND	ND
Sobrenadante purificado	+	ND	ND	ND

Nota. (+) Presencia de LPS detectada, (-) Ausencia de LPS. ND: No determinado Cálculo estimado considerando sensibilidad del kit ($\lambda = 0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$) y masa seca de CB equivalente (4 mg por muestra). ** Control positivo preparado con endotoxina estándar certificada.

El control negativo permaneció consistentemente sin formación de gel (-), confirmando la ausencia de contaminación cruzada durante el procedimiento, mientras que el control positivo validó la sensibilidad del reactivo LAL ($0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$). Las muestras de CB purificada presentaron ausencia total de endotoxinas detectables en todas las diluciones evaluadas ($<0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$), demostrando la eficacia del protocolo de purificación aplicado. La adición de polimixina B en estas muestras no modificó el resultado, confirmando que el proceso de purificación eliminó los LPS de manera eficiente. Por el contrario, la CB no purificada evidenció presencia de endotoxinas hasta la dilución 1:2 (punto final = $0.25 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$). De forma inesperada, el tratamiento con polimixina B en estas muestras no redujo la detección de LPS, sino que mantuvo la positividad incluso en la dilución 1:4, lo que sugiere un posible atrapamiento del antibiótico en la matriz de CB o una interferencia con la reacción del LAL. Finalmente, los sobrenadantes de cultivo, tanto de CB purificada como no purificada, resultaron positivos en la dilución 1:1, indicando la presencia de LPS solubles en el medio post-fermentación.

5.3. Caracterización nanométrica de la CB mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para evaluar la organización superficial y la orientación de las nanofibras de CB se utilizó microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo topográfico. En la Figura 23, se muestran imágenes representativas de CB cultivada bajo tres condiciones: control (0 V/cm), 0.2 V/cm y 0.4 V/cm .

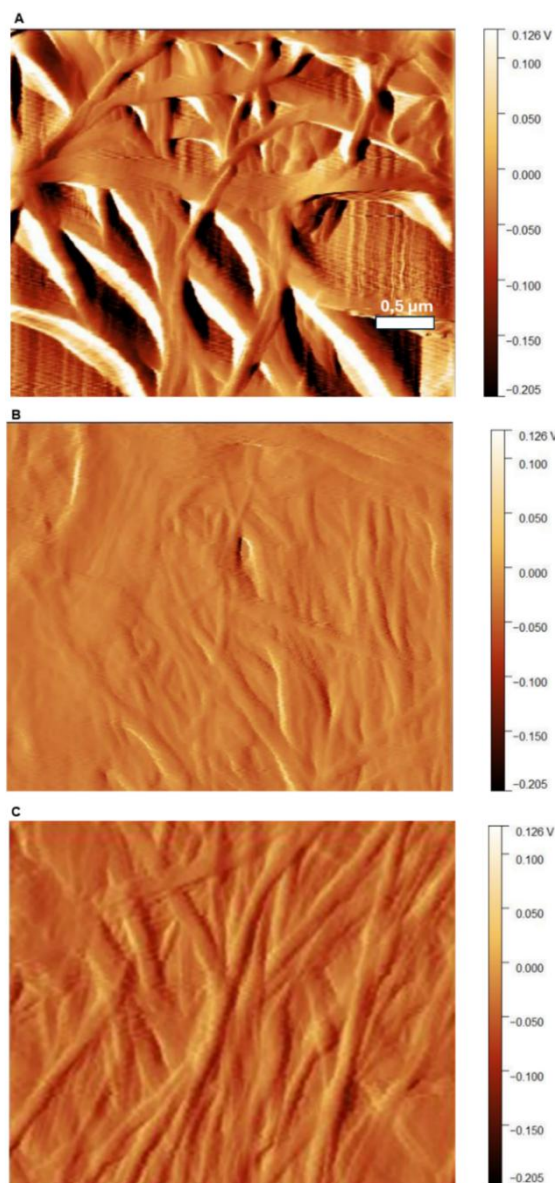


Figura 23. Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fuerza atómica (AFM) en modo topográfico de celulosa bacteriana bajo diferentes condiciones de cultivo. A) CB control, B) CB 0.2 V/cm , C) CB 0.4 V/cm .

En la condición control (0 V/cm , Fig. 23A), la superficie presentó un arreglo fibrilar caótico, con fibras distribuidas aleatoriamente, zonas de empaquetamiento irregular y mayor rugosidad topográfica. A 0.2 V/cm (Fig. 23B), se observó una disposición más homogénea, con reducción de las irregularidades extremas y presencia de una orientación parcial de las nanofibras en una dirección predominante. Finalmente, en la condición de 0.4 V/cm (Fig. 23C), se evidenció una alineación marcada de las fibrillas, con un patrón paralelo y continuo, confirmando que esta intensidad favorece la orientación direccional durante la biosíntesis.

5.4. Caracterización del comportamiento mecánico de CB bajo tracción uniaxial

El ensayo consistió en aplicar una fuerza progresiva sobre cada muestra de CB, registrando la relación entre la fuerza aplicada (N) y el estiramiento (mm). Este análisis permitió identificar las fases características de deformación del material, así como los efectos de los ciclos de tracción sobre la orientación fibrilar y las propiedades mecánicas de la CB.

La Figura 24 muestra imágenes representativas de la morfología superficial de las muestras (A, C, F) y sus curvas fuerza/elongaciones correspondientes (B, D, G). Las imágenes muestran diferencias en la orientación y densidad fibrilar, que se correlacionan con la respuesta mecánica registrada. Las curvas mostradas en los paneles B, D y G confirman estos patrones, reflejando variabilidad en la resistencia y elongación según la microestructura interna del *scaffold*. La Tabla 8, muestra los efectos de ciclos de tracción en la alineación de nanofibras.

Tabla 8: Efecto de los ciclos de tracción sobre la alineación de nanofibras

Muestra	Ciclos de tracción	Alineación inducida
#1	5 C	Positivo
#2	15 C	Positivo
#3	30 C	Positivo

La alineación inducida se determinó mediante observación cualitativa de micrografías SEM y análisis de orientación (OrientationJ, ImageJ). El término “Positivo” indica presencia de fibras con direccionalidad predominante respecto al eje de tracción. Cada condición se evaluó con $n = 3$ réplicas independientes.

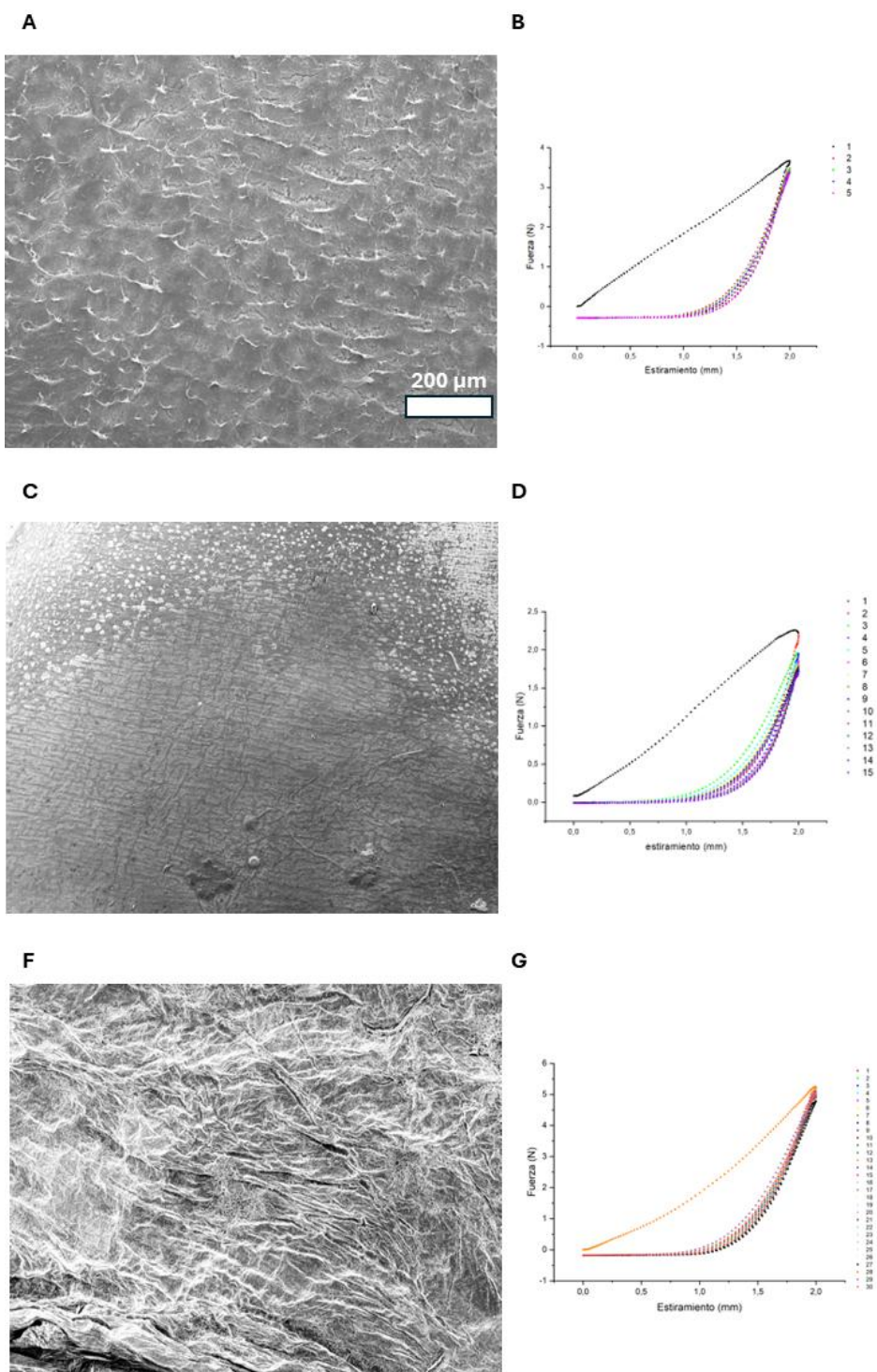


Figura 24. Ensayos de tracción en *scaffolds* de celulosa bacteriana. A, C, F) Imágenes microscópicas de las muestras antes del ensayo. B, D, G) Curvas fuerza-estiramiento representativas para las respectivas muestras. Se evidencian tres fases características del comportamiento mecánico de la CB bajo tracción.

- Fase de acomodación inicial: En los primeros 0.5 *mm* de estiramiento, la curva muestra una pendiente suave, lo cual indica una baja resistencia inicial. Esta fase corresponde a la respuesta elástica del scaffold en su estado natural, reflejando la reorganización de las nanofibras sin alineación dirigida.
- Fase de endurecimiento: Con un mayor ciclo de estiramiento, se observa un aumento en la pendiente de la curva, alcanzando resistencias de hasta 5.5 *N* en algunas muestras. Este incremento se debe al entrelazado tridimensional de las nanofibras, que proporciona mayor resistencia a medida que el material se deforma.
- Fase de saturación y límite de ruptura: Las curvas muestran una ligera desviación cerca del límite de estiramiento, indicando una tendencia a la saturación. Sin embargo, en estas muestras control no se alcanzó el punto de ruptura, sugiriendo que los parámetros aplicados son adecuados para observar la deformación elástica sin comprometer la integridad estructural del material.

Los resultados obtenidos establecen un patrón de comportamiento mecánico consistente para las muestras control, el cual sirve como referencia para futuras comparaciones con muestras sometidas a campo eléctrico y ciclos de tracción adicionales. La baja dispersión entre las curvas sugiere que el procedimiento de cultivo y preparación de la CB fue homogéneo y reproducible. Este control será esencial para evaluar los efectos de los tratamientos experimentales en la alineación de las nanofibras y en la resistencia mecánica de los *scaffolds*. Esta información es fundamental para la estandarización de los ciclos de tracción, permitiendo definir un número óptimo de ciclos que maximicen la alineación sin comprometer la estructura del *scaffold*, los cuales se evaluarán durante 15 y 30 ciclos.

La Tabla 9, muestra los valores de módulo de Young obtenidos para CB sometidas a distintos números de ciclos de estiramiento mecánico. El control (0 ciclos) presentó un módulo de 4,7 MPa, reflejando la rigidez inicial del material. Tras 5 ciclos, el valor disminuyó a 3,2 MPa, indicando una pérdida de rigidez asociada al reacomodo de las fibras. Posteriormente, con 15 ciclos el módulo descendió aún más a 1,5 MPa, lo que sugiere un efecto acumulativo de relajación estructural y microfracturas en la red fibrilar. Finalmente, a los 30 ciclos se observó un aumento hasta 4,1 MPa, lo que evidencia un proceso de realineamiento progresivo de las nanofibras que permite recuperar parcialmente la capacidad de transmitir esfuerzos. Estos resultados demuestran que el número de ciclos

aplicados influye de manera directa en las propiedades mecánicas de la CB modulando su rigidez en función del balance entre desorganización inicial y orientación fibrilar inducida.

Tabla 9: Comparación del módulo de Young según el número de ciclos de tracción aplicados

Tratamiento	N° ciclos	Elongación	Módulo de Young (MPa)	Interpretación
Control	0	2 mm	4,7 MPa	Alta rigidez inicial
1	5	2 mm	2,4 MPa	Disminución significativa de rigidez
2	15	2 mm	1,5 MPa	Rigidez aún menor, material debilitado
3	30	2 mm	4,1 MPa	Recuperación de rigidez posible reorganización estructural

Valores del módulo de Young obtenidos a partir de ensayos de tracción uniaxial en scaffolds de celulosa bacteriana (CB) sometidos a distintos números de ciclos de estiramiento ($n = 3$). El módulo se calculó en la región elástica inicial ($< 2\%$ de deformación) según la pendiente de la curva esfuerzo–deformación.

La recuperación del módulo elástico a 30 ciclos sugiere que existe un punto óptimo de tratamiento mecánico que permite maximizar la alineación fibrilar sin comprometer permanentemente la integridad estructural del *scaffold*. Esta información es fundamental para la estandarización de protocolos de acondicionamiento mecánico, permitiendo definir parámetros óptimos que maximicen la alineación sin comprometer la funcionalidad del biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos.

5.5. Evaluación de interacción entre factores: campo eléctrico y tracción mecánica

Con el objetivo de estudiar la interacción entre el campo eléctrico y la tracción mecánica cíclica en la alineación y organización de la CB se diseñó un experimento multifactorial donde se combinaron diferentes niveles de ambos tratamientos. La hipótesis subyacente fue que la aplicación simultánea de estos factores puede generar efectos sinérgicos sobre la orientación de las nanofibras, superando los efectos observados cuando cada estímulo se aplica de forma independiente.

Se analizaron tres intensidades de campo eléctrico (0, 0.2 y 0.4 V/cm) y tres condiciones de tracción mecánica (0, 15 y 30 ciclos), se reúne la información en la Tabla 10, dando lugar

a nueve combinaciones experimentales. Cada muestra fue cultivada en condiciones controladas utilizando el sistema de microcámara y electrodos descrito previamente, aplicando los estímulos definidos durante la fase de biosíntesis.

Tabla 10: Condiciones experimentales para cada muestra.

Muestras	Campo eléctrico	Ciclos de tracción
M #1	0	0
M #2	0	15
M #3	0	30
M #4	0.2	0
M #5	0.2	15
M #6	0.2	30
M #7	0.4	0
M #8	0.4	15
M #9	0.4	30

Nota. Diseño factorial 3^2 con dos factores: campo eléctrico (0, 0.2 y 0.4 V/cm aplicados durante la biosíntesis en microcámara) y tracción mecánica (0, 15 y 30 ciclos uniaxiales aplicados como acondicionamiento posterior antes de la caracterización). Las muestras M#1–M#9 corresponden a todas las combinaciones de niveles.

Este diseño experimental permite analizar no solo los efectos individuales del campo eléctrico y de la tracción mecánica, sino también las posibles interacciones entre ambos factores. De esta manera, se busca identificar las condiciones que optimicen la orientación estructural y la organización fibrilar de la CB, lo cual resulta fundamental para el desarrollo de *scaffolds* con propiedades mejoradas.

5.5.1. Microscopia electrónica de barrido SEM.

En las Figuras 25–27 se presentan imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de CB cultivadas bajo diferentes condiciones de campo eléctrico y tracción mecánica. Estos resultados permiten observar los efectos individuales y combinados de ambos factores sobre la estructura superficial y la orientación de las fibras. El análisis morfológico mediante SEM reveló diferencias notorias en la disposición de las nanofibras de CB según el número de ciclos de tracción aplicados.

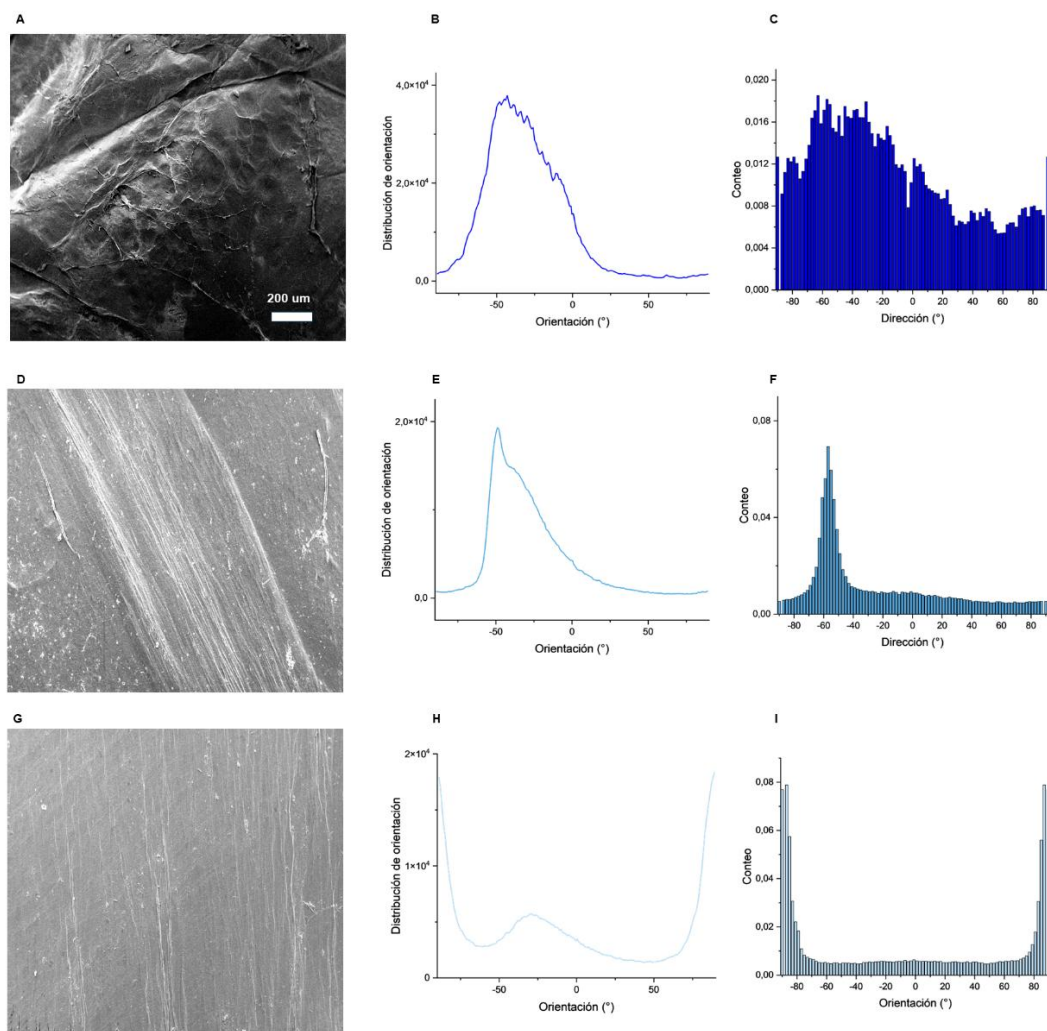


Figura 25. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de orientación de CB sometida a diferentes tratamientos. Escala: 200 μm . (A) SEM de CB control. (B) gráfico de orientación CB control. (C) distribución angular CB control. (D) SEM de CB tratada a 30 C. (E) gráfico de orientación CB 15 C. (F) distribución angular CB 15 C. (G) SEM de CB tratada a 30 C. (H) gráfico de orientación CB 30 C. (I) distribución angular CB 30 C.

El análisis de orientación fibrilar mostró cambios progresivos en la disposición de la CB en función del número de ciclos de tracción aplicados. En la condición control (Figs. 25A–C), las fibras presentaron una disposición desordenada, con ausencia de un ángulo predominante. Tanto el gráfico de orientación como la distribución angular evidenciaron una dispersión amplia y sin picos definidos. En la CB sometida a 15 ciclos de tracción mecánica (Figs. 25D–F), se observó un inicio de alineación fibrilar en una dirección preferencial. Esta tendencia se reflejó en un pico marcado en el gráfico de orientación y en una distribución angular más concentrada respecto al control. Finalmente, en la CB tratada con 30 ciclos

(Figs. 25G–I), las fibras mostraron una disposición marcadamente paralela, con un grado de organización superior al observado en las condiciones anteriores. El gráfico de orientación presentó picos más definidos y la distribución angular mostró la mayor concentración direccional, confirmando la alineación más uniforme alcanzada. En conjunto, los resultados indican que la aplicación de ciclos de tracción mecánica favorece la orientación de las nanofibras de CB, alcanzándose el mayor orden estructural con 30 ciclos.

La Figura 26, y se muestran los efectos de la aplicación de un campo eléctrico (0.2 V/cm) y su combinación con ciclos de tracción mecánica 15 C y 30 C sobre la organización fibrilar de la CB. En la condición tratada únicamente con campo eléctrico 0.2 V/cm (Figs. 26J–L), las fibras exhibieron una ligera tendencia a la orientación, aunque la organización global permaneció heterogénea. El gráfico de orientación presentó un único pico poco definido y la distribución angular reflejó una dispersión amplia, lo que sugiere una alineación parcial. Al aplicar el campo eléctrico en combinación con 15 ciclos de tracción mecánica (Figs. 26M–Ñ), se observó una organización más evidente de las fibras, con una orientación más clara a lo largo de una dirección predominante. El gráfico de orientación mostró un pico más marcado en comparación con el tratamiento eléctrico de 0.2 V/cm y la distribución angular reveló una mayor concentración direccional. Finalmente, la combinación del campo eléctrico con 30 ciclos de tracción mecánica (Figs. 26O–Q) resultó en un alineamiento altamente definido de las nanofibras, con disposición paralela a lo largo de la superficie del material. El gráfico de orientación mostró picos muy pronunciados y la distribución angular presentó la mayor concentración en torno a un rango estrecho de ángulos, confirmando que este tratamiento combinado promueve la orientación más uniforme de la CB.

En conjunto, los resultados indican que la aplicación de un campo eléctrico induce un cierto grado de alineación fibrilar, el cual se potencia significativamente al combinarlo con tracción mecánica, alcanzándose el mayor orden estructural con 30 ciclos.

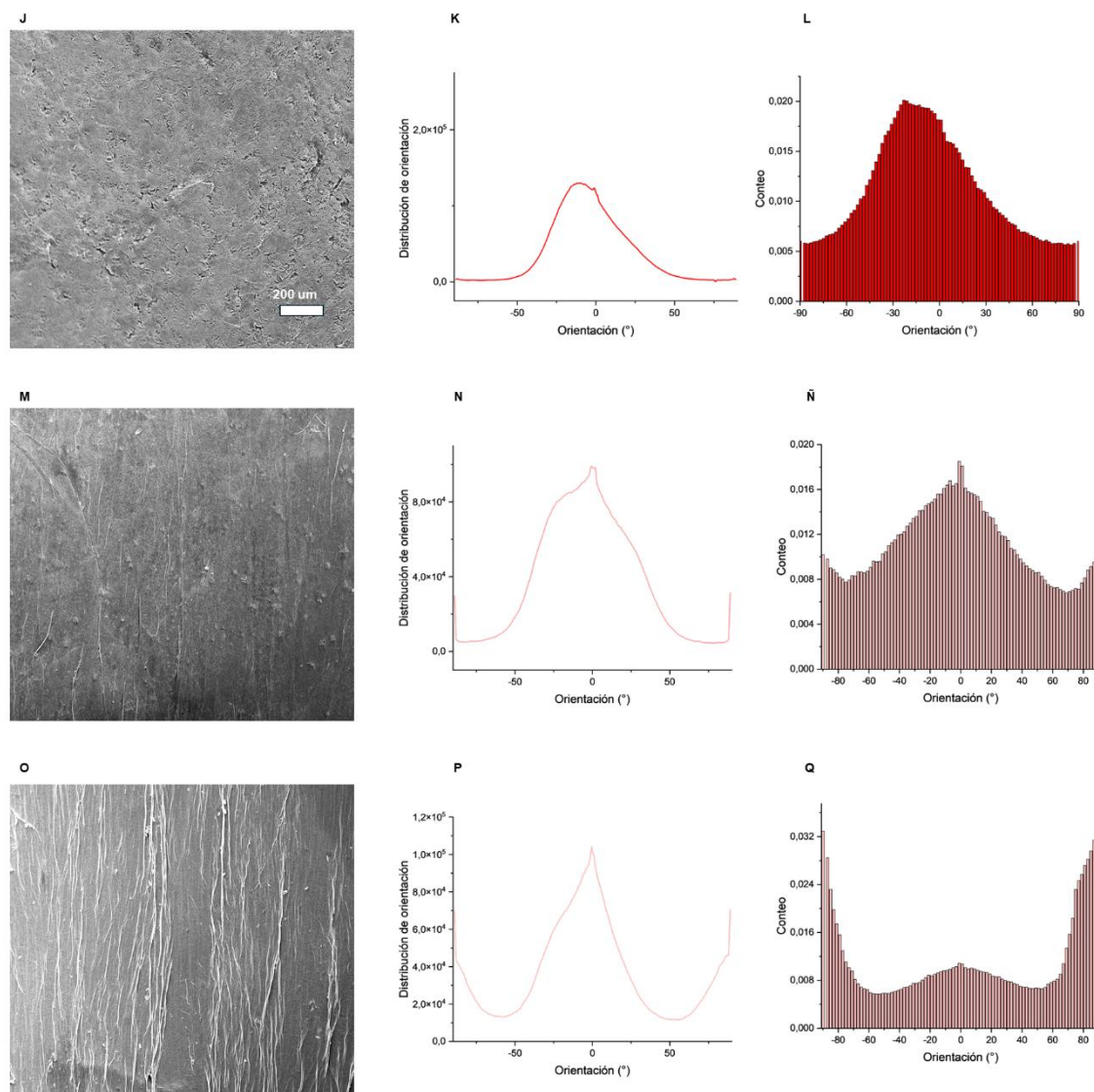


Figura 26. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de orientación de celulosa bacteriana bajo la aplicación de un campo eléctrico (0.2 V/cm) y tratamientos mecánicos adicionales. Escala: 200 μm. (J) SEM de CB tratada con 0.2 V/cm. (K) gráfico de orientación correspondiente. (L) distribución angular de CB 0.2 V/cm. (M) SEM de CB tratada con 0.2 V/cm + 15 C. (N) gráfico de orientación correspondiente. (Ñ) distribución angular de CB 0.2 V/cm + 15 C. (O) SEM de CB tratada con 0.2 V/cm + 30 C. (P) gráfico de orientación correspondiente. (Q) distribución angular de CB 0.2 V/cm + 30 C.

Las imágenes SEM y los análisis de orientación muestran los efectos de la aplicación de un campo eléctrico de 0.4 V/cm, tanto en forma aislada como en combinación con ciclos de tracción mecánica.

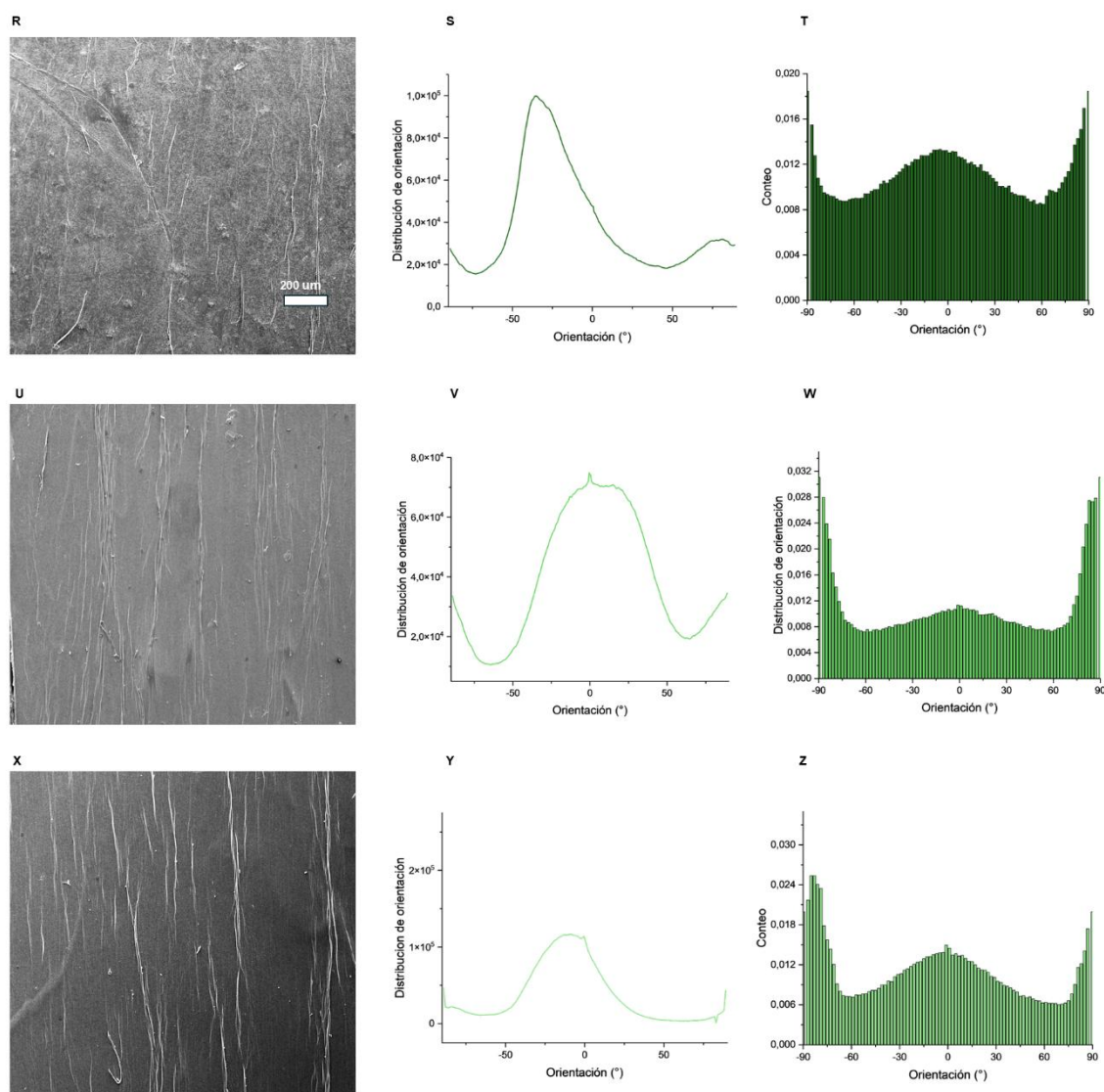


Figura 27. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis de orientación de celulosa bacteriana bajo la aplicación de un campo eléctrico de 0.4 V/cm y tratamientos mecánicos adicionales. Escala: $200 \mu\text{m}$. (R) SEM de CB tratada con 0.4 V/cm . (S) gráfico de orientación correspondiente. (T) distribución angular de CB 0.4 V/cm . (U) SEM de CB tratada con $0.4 \text{ V/cm} + 15 \text{ C}$. (V) gráfico de orientación correspondiente; (W) distribución angular de CB $0.4 \text{ V/cm} + 15 \text{ C}$. (X) SEM de CB tratada con $0.4 \text{ V/cm} + 30 \text{ C}$. (Y) gráfico de orientación correspondiente. (Z) distribución angular de CB $0.4 \text{ V/cm} + 30 \text{ C}$.

En la condición tratada únicamente con el campo eléctrico (Figs. 27R–T), las fibras presentaron una ligera tendencia a la alineación, aunque el patrón observado se mantuvo irregular. El gráfico de orientación mostró un pico amplio y la distribución angular reveló una

dispersión considerable, indicando una organización parcial. Al combinar el campo eléctrico con 15 ciclos de tracción mecánica (Figs. 27U–W), se observó un aumento en la coherencia direccional. Las fibras presentaron una orientación más clara a lo largo de un eje predominante, lo que se reflejó en un pico más definido en el gráfico de orientación y en una distribución angular con mayor concentración respecto al tratamiento eléctrico aislado. Finalmente, la combinación del campo eléctrico con 30 ciclos de tracción mecánica (Figs. 27X–Z) produjo la mayor alineación fibrilar. En esta condición, las fibras se dispusieron de forma marcadamente paralela, con una organización homogénea en toda la superficie observada. El gráfico de orientación mostró picos agudos y la distribución angular evidenció la mayor concentración direccional entre todos los tratamientos evaluados en esta figura. La coherencia OrientationJ aumentó de 0.28 ± 0.05 (control) a 0.43 ± 0.07 (0.2 V/cm) y 0.61 ± 0.08 (0.4 V/cm).

En la Tabla 11, se detalla el efecto de los factores sobre la alineación de las nanofibras, proporcionando valores específicos de efecto, error estándar y p-valor, lo que permite evaluar la significancia estadística de cada factor.

Tabla 11: Efecto de los factores sobre la alineación de nanofibras

Factor	Efecto	Error estándar	P-valor
X1 (Campo eléctrico)	0,092	0,029	0,000
X2 (Tracción mecánica)	0,043	0,029	0,005
X1 * X2 (Interacción)	0,029	0,035	0,096
X1 ² (Término cuadrático)	0,004	0,049	0,868
X2 ² (Término cuadrático)	0,004	0,049	0,868

Nota. El campo eléctrico fue el factor más determinante en la alineación fibrilar de la celulosa bacteriana, seguido por la tracción mecánica. La combinación de ambos factores mostró una tendencia positiva, aunque sin alcanzar significancia estadística completa.

En la Figura 28, el gráfico de superficie de respuesta proporciona una visualización en 3D que ilustra la influencia combinada de los factores X1 (campo eléctrico) y X2 (tracción mecánica) sobre la alineación de las nanofibras, medida mediante el coeficiente de coherencia. En el gráfico, se observa que, el incremento en el valor de X1 se correlaciona con un aumento en la alineación de las nanofibras (Y), evidenciado por las zonas de color en la superficie que representan valores más altos de Y conforme X1 aumenta. Esto indica que el campo eléctrico contribuye a ordenar las fibras, posiblemente debido a la polarización y orientación inducida por el campo. De forma similar, al aumentar la tracción mecánica

(X_2), se observa una mejora en la alineación, aunque el efecto es menos pronunciado que el de X_1 . Las áreas de la superficie correspondientes a valores más altos de Y se extienden con el aumento de X_2 , lo que sugiere que la tracción también contribuye a la alineación, posiblemente mediante la extensión y orientación de las fibras en la dirección de la fuerza aplicada. Por otro lado, se observa que los mayores niveles de alineación se alcanzan cuando ambos factores, X_1 y X_2 , son elevados. Sin embargo, el impacto combinado de estos factores no genera un incremento considerablemente mayor en la alineación comparado con el aumento individual de X_1 . Esto sugiere que el efecto del campo eléctrico es más dominante y que la tracción adicional aporta alineación, pero su combinación no es completamente sinérgica.

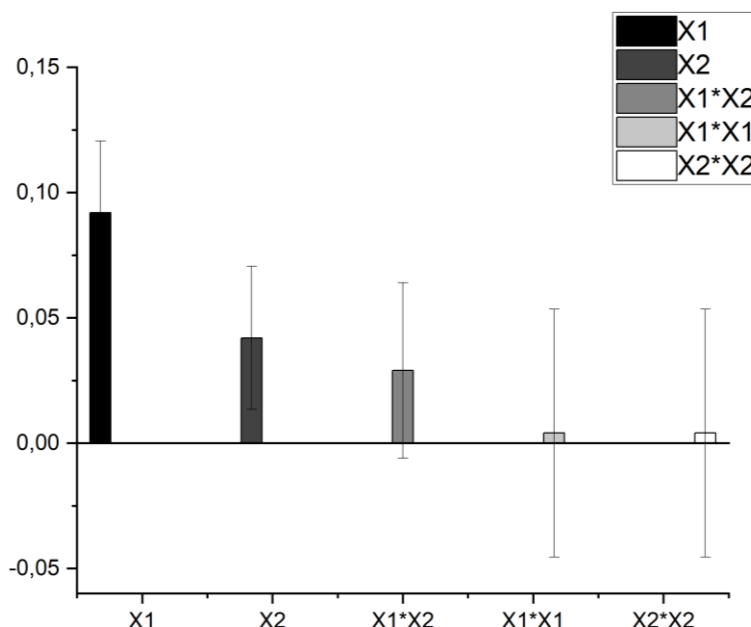


Figura 28: Representación del efecto combinado del campo eléctrico (X_1) y la tracción mecánica (X_2) sobre la alineación de nanofibras de CB. Se observa un aumento progresivo del coeficiente de coherencia con ambos factores, alcanzando el valor óptimo en $0.4 \text{ V/cm} + 30 \text{ C}$.

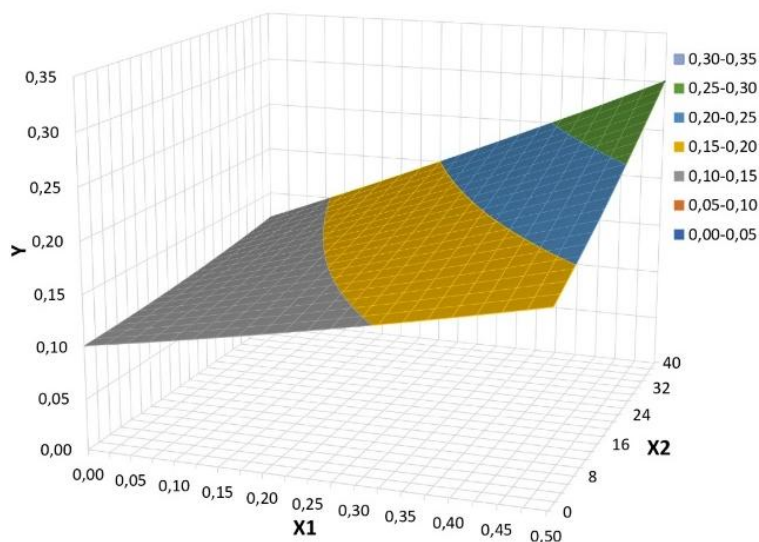


Figura 29: Superficie de respuesta en 3D del modelo estadístico para el coeficiente de coherencia (Y). Visualiza el comportamiento del modelo, evidenciando que la alineación aumenta de manera progresiva con la intensificación de ambos factores, alcanzando valores óptimos con 0.4 V/cm y 30 ciclos.

Respecto al análisis estadístico, el campo eléctrico ($X1$) y la tracción mecánica ($X2$) muestran un efecto positivo y estadísticamente significativo sobre la alineación de las nanofibras ($p\text{-valor} = 0.000$ para $X1$ y $p\text{-valor} = 0.005$ para $X2$). Esto confirma la observación visual del gráfico de superficie, donde un aumento en $X1$ produce una mayor alineación. Con un efecto de 0.092, $X1$ es el factor más influyente en el modelo. Por otro lado, la interacción entre $X1$ y $X2$ tiene un efecto positivo (efecto = 0.029), pero no es estadísticamente significativo ($p\text{-valor} = 0.096$). Esto sugiere que, aunque ambos factores individualmente aumentan la alineación, su combinación no resulta en un incremento significativo adicional en el coeficiente de coherencia. Los términos cuadráticos no muestran significancia estadística (ambos con $p\text{-valores} = 0.868$), lo que implica que los efectos de $X1$ y $X2$ en la alineación son predominantemente lineales.

5.6. Análisis de sorción de vapor dinámico

La capacidad de adsorción de agua de la celulosa bacteriana (CB) se evaluó por DVS a 20°C y se ajustó con el modelo de Guggenheim Anderson de Boer (GAB). Se estudiaron cuatro condiciones: CB control, CB con 30 ciclos de tracción (30 C), CB sometida a 0.4 V/cm y CB $0.4 \text{ V/cm} + 30 \text{ C}$.

Los resultados de la Tabla 12, indican que tanto la tracción mecánica como el campo eléctrico tienen un efecto medible sobre la capacidad de adsorción de vapor de agua en la CB. El campo eléctrico induce una modificación estructural que favorece la retención de humedad, mientras que los ciclos de tracción también aumentan esta capacidad, posiblemente debido a un aumento en la exposición superficial de grupos hidroxilo accesibles.

Tabla 12: Parámetros del modelo GAB (Guggenheim, Anderson y de Boer) para muestras de CB bajo distintos tratamientos

Parámetros	CB	CB 30 C	CB 0.4 V/cm	CB 0.4 V/cm +30 C
m $\left(\frac{mg\ H_2O}{mg\ de\ masa\ seca}\right)$	3.83	4.32	5.97	4.30
C	1.87	6.05	2.23	5.27
K	0.83	0.87	0.85	0.94

Nota. Parámetros estimados mediante el modelo GAB a 20 °C para caracterizar la sorción de agua en scaffolds de CB.

El campo eléctrico induce una modificación estructural que favorece significativamente la retención de humedad, mientras que los ciclos de tracción también aumentan esta capacidad, posiblemente debido a un aumento en la exposición superficial de grupos hidroxilo accesibles. Los parámetros del modelo GAB muestran que el contenido de humedad en monocapa (m) de la muestra control de CB fue de 3.83 g H₂O/g sólido seco, estableciendo la línea base para las comparaciones. La aplicación de 30 ciclos de tracción mecánica incrementó este parámetro a 4.32 g H₂O/g sólido seco, representando un incremento del 12.8% respecto al control. El campo eléctrico de 0.4 V/cm mostró el efecto más pronunciado, elevando el contenido de humedad en monocapa a 5.97 g H₂O/g sólido seco, equivalente a un incremento del 55.9%. La combinación de ambos tratamientos (CB 0.4 V/cm + 30 C) resultó en un valor de 4.30 g H₂O/g sólido seco, correspondiente a un incremento del 12.3% respecto al control. El parámetro C (energía de sorción), relacionado con la energía de interacción agua-sustrato, mostró variaciones considerables entre tratamientos. La muestra control registró un valor de 1.87, mientras que la tracción mecánica indujo el incremento más significativo, elevando este parámetro a 6.05, lo que representa un incremento de 223.5%. El campo eléctrico produjo un incremento moderado

a 2.23, equivalente al 19.3% de incremento. La combinación de tratamientos resultó en un valor de 5.27, representando un incremento de 181.8% respecto al control. Por otro lado, el parámetro K (constante de sorción multicapa) mostró incrementos en todas las condiciones tratadas comparado con el control (0.83). La tracción mecánica aumentó este valor a 0.87, representando un incremento del 4.8%, el campo eléctrico lo elevó a 0.85, con un incremento del 2.4%, y el tratamiento combinado mostró el mayor incremento a 0.94, equivalente al 13.3%. Las isothermas de adsorción presentadas en la Figura 30 muestran que todas las muestras presentan un comportamiento del tipo II de forma sigmoidea, característico de adsorción física en multicapas. A bajas humedades relativas (0.0 - 0.3), todas las muestras muestran un comportamiento similar con cambios de masa mínimos, correspondiente a la región de adsorción en monocapa. A partir de humedad relativa de 0.4 - 0.5, se inicia una región de transición donde comienzan a evidenciarse diferencias entre tratamientos. En la región de alta humedad relativa (0.6-0.8), se observa un incremento exponencial en la capacidad de adsorción, siendo más pronunciado en las muestras tratadas. El ajuste del modelo GAB presenta una excelente correlación entre los datos experimentales y el modelo teórico, confirmando la validez del modelo para describir el comportamiento de sorción en todo el rango de humedad relativa evaluado. En términos de capacidad de adsorción a humedad relativa de 0.8, el orden observado fue: CB 0.4 V/cm exhibe la mayor capacidad de adsorción entre todas las condiciones (~95% de cambio en masa), seguido por CB 0.4 V/cm + 30 °C con una capacidad intermedia-alta (~88% de cambio en masa), CB 30°C muestra una capacidad intermedia (~85% de cambio en masa), y finalmente CB control presenta la menor capacidad de adsorción (~80% de cambio en masa). Este orden es consistente con los valores de contenido de humedad de monocapa obtenidos del modelo GAB. La región de monocapa (actividad de agua < 0.3) predomina la adsorción de moléculas de agua sobre sitios específicos de alta energía en la superficie de la celulosa, mientras que en la región de multicapa (actividad de agua > 0.4) se caracteriza por un incremento exponencial en la adsorción, donde las moléculas de agua se adsorben en capas sucesivas sobre la monocapa inicial. El campo eléctrico de 0.4 V/cm induce la mayor modificación estructural, posiblemente por reordenamiento molecular y mayor accesibilidad de sitios hidroxilo, la tracción mecánica aumenta significativamente la energía de sorción, sugiriendo exposición de sitios de alta energía, y el tratamiento combinado muestra un efecto aditivo no sinérgico, con capacidad intermedia entre ambos tratamientos individuales.

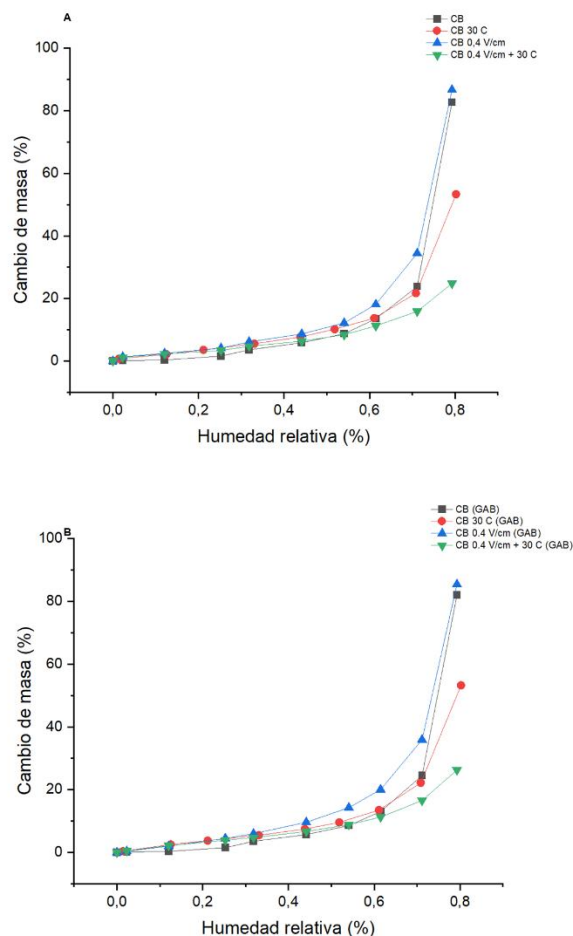


Figura 30. Comparación de las isothermas de adsorción experimentales y ajuste por modelo de GAB a 20°C. A) CB control, CB 30 C, CB 0.4 V/cm, y CB 0.4 V/cm + 30 C. B) Ajuste por modelo GAB a curvas de CB control, CB 30 C, CB 0.4 V/cm, y CB 0.4 V/cm + 30 C.

5.7. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier de reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

En la Figura 31, se muestran los espectros infrarrojos del *scaffolds* más alineado y sus configuraciones base. Se puede apreciar las bandas características para CB. En el primer espectro se pueden ver las posiciones de las bandas típicas de CB en las cuales se puede observar con facilidad las bandas de vibración de enlaces C-H₂ (1314 cm^{-1}), C-O (1031 cm^{-1}), C-O-C (1161 cm^{-1}) y O-H así como bandas en (1335 y 1205 cm^{-1}) y (1635 cm^{-1}) banda correspondiente a vibraciones moleculares del agua adsorbida H-O-H, deformación

de CH₂ a 1435 cm^{-1}), deformación de OH a (1336 cm^{-1}) (Marechal y Chanzy, 2000). En la Tabla 13, se presentan las bandas presentes en todas las muestras.

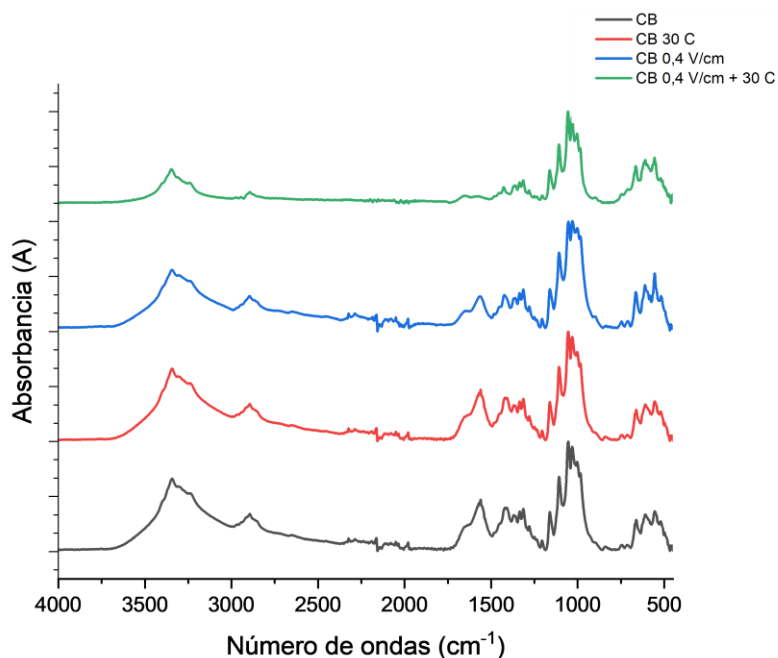


Figura 31. Espectros ATR-FTIR de muestras de celulosa bacteriana bajo diferentes condiciones experimentales. Mostrados de abajo hacia arriba: CB control, CB 30 C, CB 0.4 V/cm, CB 0.4 V/cm + 30 C.

Tabla 13: Bandas características de CB detectadas por ATR-FTIR en todos los tratamientos.

Número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional	Tipo de vibración
1031	C–O	Flexión
1055	C–O	Flexión
1108	C–O–C	Flexión
1161	C–O–C	Flexión
1314	C–H ₂	Flexión
1335	O–H	Flexión
1587	H–O–H	Flexión
1639	H–O–H	Flexión

Nota. Posiciones de banda reportadas como valores medios. $n = 3$ espectros por tratamiento (misma preparación y parámetros de adquisición).

Los tratamientos mantienen las bandas características de la CB confirmando la estabilidad química del material, por lo tanto, la aplicación de campo eléctrico y tracción mecánica es compatible con la preservación de su composición química y que no introducen contaminantes ni producción de degradación detectables. Los cambios observados en las intensidades relativas sugieren reordenamientos estructurales a nivel supramolecular sin alteración de la composición química.

5.8. Índice de cristalinidad

Se presentan en la Tabla 14, los valores obtenidos de absorbancia relativa para las bandas seleccionadas (1429 y 895 cm^{-1}) y el índice de cristalinidad (IC) calculado para cada condición experimental:

Tabla 14: Absorbancia relativa y cálculo del índice de cristalinidad (IC) en muestras

Muestra	$Abs_{1429\text{cm}^{-1}}$	$Abs_{895\text{cm}^{-1}}$	IC (media $\pm$ DE)
CB	0.35	0.07	4.59 ± 0.06
CB + 30 C	1.35	1.00	1.35 ± 0.04
CB 0.4 V/cm	2.31	2.13	1.09 ± 0.03
CB 0.4 V/cm + 30 C	3.31	3.21	1.03 ± 0.02

Nota. El índice de cristalinidad (A_{1430}/A_{895}) se reporta como media $\pm$ DE ($n = 3$)

La muestra sin tratamiento presentó el valor más alto de IC (4.59), reflejando una estructura tridimensional altamente ordenada y densa, con regiones cristalinas predominantes. Este valor es consistente con la organización natural de la CB, caracterizada por un empaquetamiento intermolecular denso y una alta proporción de enlaces de hidrógeno intercatenarios. La aplicación de 30 ciclos de tracción redujo significativamente el IC a 1.26 (reducción del 72.5%). Esta disminución sugiere que los ciclos de deformación mecánica inducen una reorganización de la matriz polimérica, incrementando las regiones amorfas a expensas de las cristalinas. El campo eléctrico de 0.4 V/cm disminuyó aún más el IC a 1.09 (reducción del 76.2%). Este efecto más pronunciado que la tracción mecánica sugiere que la polarización electrostática induce cambios conformacionales más profundos en la organización supramolecular. La combinación de ambos estímulos resultó en la estructura más amorfa (IC = 1.03, reducción del 77.6%). Aunque el efecto combinado no es estrictamente aditivo, representa la máxima disrupción de la organización cristalina alcanzable bajo las condiciones estudiadas. Estos resultados indican que la aplicación de estímulos físicos, si bien favorece la alineación direccional de las nanofibras, también

disminuye su grado de empaquetamiento tridimensional. Esto puede explicarse porque, al alinearse las fibras en una dirección preferencial, se rompe parcialmente la organización interlaminar que sostiene las regiones cristalinas, dando lugar a una estructura más abierta, flexible y funcionalmente anisotrópica (Petersen & Gatenholm, 2011; Rahman & Netravali, 2016).

5.9. Proliferación de células musculares

La Figura 32, muestra los valores de absorbancia obtenidos, los cuales son directamente proporcionales a la cantidad de células fijadas sobre la superficie del biomaterial. Los resultados indican que los *scaffolds* de CB tratadas favorecen una adhesión celular adecuada. Las diferencias observadas entre las muestras permiten inferir el efecto de los tratamientos físicos, como la alineación de las nanofibras, sobre la compatibilidad superficial.

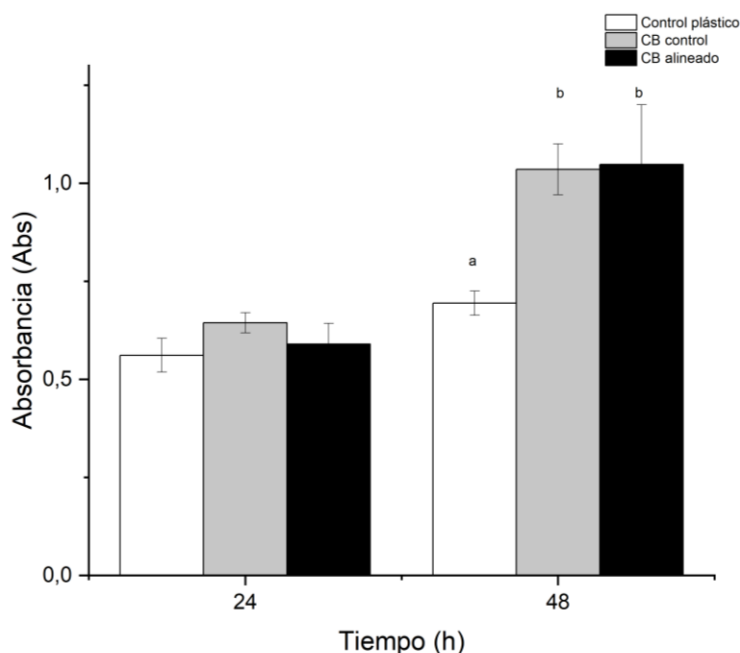


Figura 32. Ensayo de adhesión celular mediante WST-1, realizado 24 Y 48 horas después de la siembra de células musculares sobre control plástico, *scaffolds* CB control y CB alineado. Valores expresados como media $\pm$ DE ($n = 3$). Letras distintas (a, b) indican diferencias significativas entre grupos en el mismo tiempo (ANOVA + Tukey, $p < 0.05$).

Para el análisis estadístico, se aplicó un ANOVA de una vía para comparar los grupos control plástico, CB control y CB alineado. A las 24 horas no se detectaron diferencias

estadísticamente significativas ($F = 4.03$; $p = 0.056$), aunque se observó una tendencia hacia valores superiores en los grupos con CB. En contraste, a las 48 horas se encontraron diferencias significativas ($F = 17.12$; $p < 0.001$), por lo que se aplicó la prueba post hoc de Tukey HSD. Esta reveló que tanto CB control como CB alineado presentaron absorbancias significativamente mayores que el control plástico ($p < 0.01$), sin diferencias entre ambos tipos de CB. Estos hallazgos indican que, independientemente de la orientación de las fibras, la CB mejora la adhesión celular en comparación con la superficie plástica, especialmente tras 48 horas de cultivo.

5.10. Ensayo de inmunofluorescencia para evaluación de diferenciación miogénica

La Figura 33, muestra inmunofluorescencia de células C2C12 a 5 días post-inducción de diferenciación (rojo: actina marcada con rodamina-faloidina, azul: núcleos con Hoechst; verde: *MHC*). Este tiempo corresponde a la fase de diferenciación miogénica, en la que los mioblastos han salido del ciclo celular, fusionado y formado miotubos multinucleados, caracterizados por la expresión robusta de miosina de cadena pesada (*MHC*), un marcador tardío de diferenciación (Yaffe & Saxel, 1977; Burattini et al., 2004). En la superficie plástica (A–C) se observa expresión intensa de *MHC* (verde) y la presencia de dos fibras multinucleadas alineadas; sin embargo, el cultivo en su conjunto no presenta una direccionalidad predominante. En el *scaffold* de CB control (D–F), la organización de actina y núcleos es mayoritariamente no direccional, con expresión detectable de *MHC*, pero sin un patrón definido de orientación. En contraste, en el *scaffold* de CB alineado (G–I) los miotubos muestran una orientación preferente siguiendo la anisotropía del sustrato, junto con una expresión clara de *MHC*, lo que coincide con estudios previos que demuestran que la topografía alineada favorece la organización morfofuncional de células musculares (Denes et al., 2019; Flaibani et al., 2019). En conjunto, estas observaciones confirman que a los 5 días de cultivo las C2C12 se encuentran en plena fase de diferenciación, con formación de miotubos *MHC*-positivos en todas las condiciones, pero con una orientación significativamente más definida en los *scaffolds* alineados, reforzando el rol de la arquitectura del material en la organización tisular (Engler et al., 2006; Jana et al., 2016).

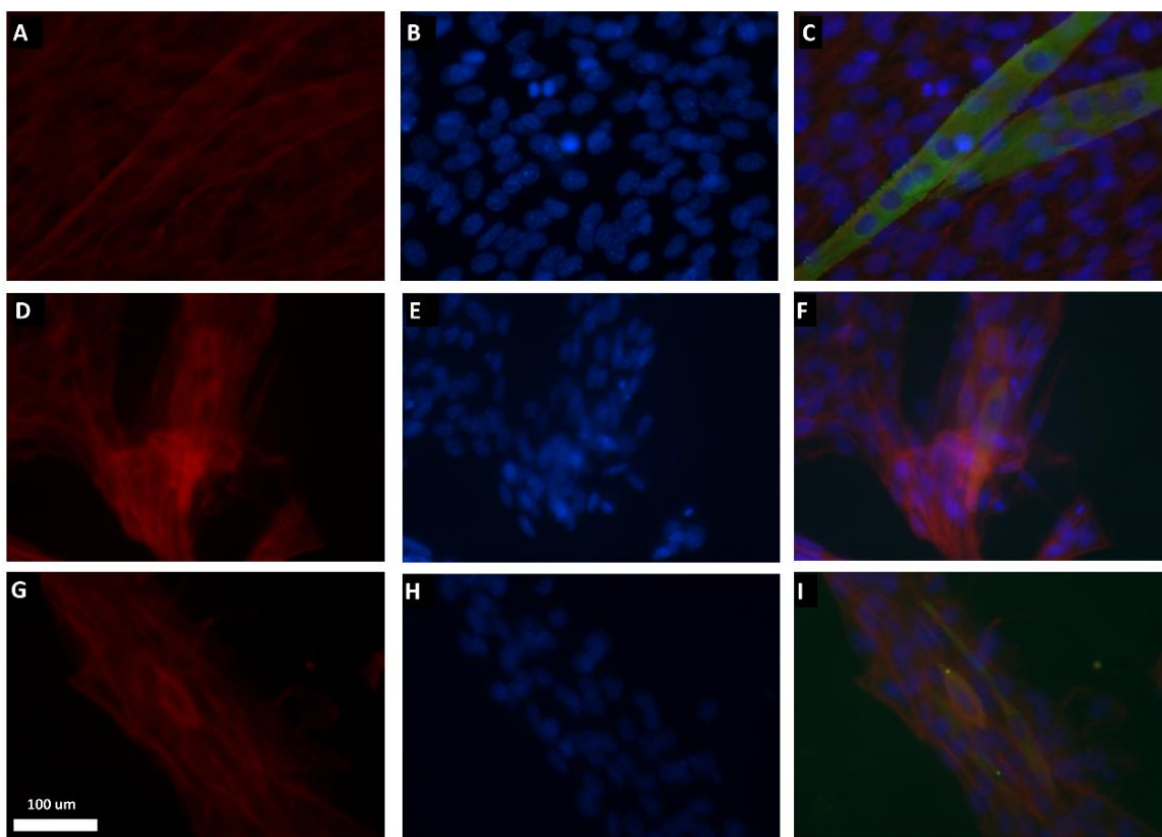


Figura 33. Imágenes de inmunofluorescencia en células C2C12 diferenciadas tras cinco días de cultivo. Rojo: actina (rodamina-faloidina). Azul: núcleos (Hoechst). Verde: miosina de cadena pesada. (A–C) Superficie plástica/vidrio: expresión intensa de *MHC* y presencia de dos fibras multinucleadas alineadas; el resto del campo no muestra orientación global. (D–F) *Scaffold* de celulosa bacteriana (CB) control: organización mayoritariamente no direccional; *MHC* detectable sin patrón de alineación predominante. (G–I) *Scaffold* de CB alineado: miotubos orientados conforme a la anisotropía del sustrato y *MHC* evidente. Las imágenes confirman que a los 5 días las células se hallan en fase de diferenciación con formación de miotubos *MHC*-positivos; la alineación del *scaffold* potencia la orientación de las fibras celulares.

Los resultados obtenidos a los cinco días de cultivo respaldan de forma directa la hipótesis planteada. Si bien en etapas tempranas (adhesión inicial) no se observaron diferencias significativas entre CB control y CB alineada, en la fase de diferenciación los *scaffolds* con nanofibras orientadas demostraron una clara capacidad para guiar la organización morfofuncional de las células musculares, evidenciada en la formación de miofibras multinucleadas alineadas y con alta expresión de *MHC*. Esto confirma que la orientación estructural del biomaterial, inducida por campo eléctrico y reforzada por tracción mecánica, ejerce un efecto positivo sobre la alineación tisular, optimizando al *scaffold* de CB para aplicaciones en ingeniería de tejidos musculares (Jana et al., 2016; Flaibani et al., 2009).

6. DISCUSIÓN

El desarrollo de *scaffolds* de CB con arquitectura controlada representa un avance significativo en ingeniería de tejidos, particularmente para aplicaciones musculares donde la orientación fibrilar es crítica para la funcionalidad tisular. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran por primera vez la viabilidad de combinar campo eléctrico y tracción mecánica para inducir alineación direccional durante la biosíntesis *in-situ* de CB, estableciendo un nuevo paradigma en la fabricación de biomateriales anisotrópicos.

Crecimiento de *Komagataeibacter sucrofermentans*

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan una tasa específica de crecimiento ($\mu = 0.150 \text{ h}^{-1}$) y un tiempo de duplicación ($td = 4.63 \text{ h}$) para *K. sucrofermentans* cultivado en medio HS. Estos valores son significativamente más rápidos que los reportados en la literatura, donde los tiempos de duplicación suelen encontrarse en un rango de 6 a 10 horas bajo condiciones estándar de cultivo (Cheng et al., 2019; Ghosh et al., 2018). En este trabajo se utilizó un pre-inóculo en fase logarítmica temprana, lo que reduce la duración de la fase lag y acelera la entrada a la fase exponencial. Esto contrasta con otros estudios en los que se emplearon cultivos estacionarios como inóculo, lo cual prolonga el tiempo de adaptación (Cakar et al., 2014). Y, por otro lado, aunque se trata de la misma especie, distintas cepas de *Komagataeibacter sucrofermentans* pueden mostrar diferencias metabólicas relevantes en su velocidad de crecimiento y capacidad de producción de celulosa. Jang et al. (2019) reportaron que cepas de *Komagataeibacter* pueden desarrollar mayor eficiencia en la síntesis de celulosa sintasa tras cultivos seriados, incrementando la velocidad de polimerización extracelular. En conjunto, estos factores permiten explicar por qué la tasa de crecimiento observada en este estudio supera lo descrito en reportes previos.

Configuración de microcámara y evaluación de materiales para electrodos

La configuración geométrica optimizada (microcámara $40 \times 50 \times 30 \text{ mm}$ + electrodos de grafito $20 \times 30 \times 0.25 \text{ mm}$) logró generar un campo eléctrico uniforme y predominantemente uniaxial. Los términos fuera de la diagonal próximos a cero (10^{-13} V/m) confirman la ausencia de interacciones cruzadas, validando el diseño para aplicaciones de alineación direccional. La evaluación comparativa de cobre, acero inoxidable y grafito como materiales de electrodos evidenció que solo el grafito mantuvo un entorno estable y permitió la formación de CB, mientras que los otros dos materiales generaron turbidez, productos de corrosión y alteraciones químicas en el medio. Este comportamiento es coherente con lo

reportado en la literatura sobre sistemas bioelectroquímicos, donde los electrodos carbonosos (como el grafito) son preferidos debido a su elevada conductividad, inercia química y resistencia a la corrosión frente a metales reactivos (Banerjee et al., 2022; Jalili et al., 2024). La inadecuada performance del cobre puede explicarse por su alta susceptibilidad a la oxidación y liberación de iones metálicos (Cu^{2+}) (potencial redox +0.33 V) en soluciones acuosas bajo campo eléctrico. Los iones cúpricos son conocidos agentes tóxicos para bacterias, ya que interfieren con la permeabilidad de membrana y generan especies reactivas de oxígeno, lo que compromete tanto la viabilidad celular como la síntesis de biopolímeros. Estos poseen reconocida actividad antimicrobiana (Zhou et al., 2016; Salah et al., 2021; Ramos-Zúñiga et al., 2023). Esto se refleja en la coloración parda y la turbidez observadas en el medio de cultivo, indicativas de corrosión y precipitación de sales de cobre. En el caso del acero inoxidable, aunque es considerado más estable que el cobre, su superficie puede sufrir procesos de corrosión localizada en condiciones de potencial eléctrico y medio de cultivo rico en nutrientes. La formación de películas pasivas y óxidos de hierro o cromo en la superficie no solo modifica la conductividad del electrodo, sino que también puede liberar de iones Fe^{3+} y Cr^{3+} altera el equilibrio redox del medio, evidenciado por el oscurecimiento progresivo (Chen et al., 2014). Estos fenómenos han sido reportados en estudios de bioelectroquímica (Ledezma et al., 2015). Por el contrario, el grafito se mantuvo estable durante la aplicación del campo eléctrico, sin evidencias de lixiviación iónica ni precipitación de subproductos. Esta estabilidad electroquímica, junto con su baja reactividad y adecuada conductividad, lo convierten en el material más idóneo para experimentos de biosíntesis con aplicación de campo eléctrico (Azri et al., 2023).

Efecto combinado de aplicación de campo eléctrico y tracción mecánica

Se identificó un rango de intensidad de campo eléctrico de 0.2 a 0.6 V/cm en el cual la producción de CB se mantiene eficaz, siendo que a ≥ 0.8 V/cm se observa una inhibición total de la síntesis del biopolímero. Estos hallazgos son especialmente relevantes, pues indican que existe un umbral de campo eléctrico bajo el cual la viabilidad metabólica no se ve comprometida y la biosíntesis se preserva intacta. Este comportamiento es consistente con varios reportes de bacterias generadoras de CB expuesto a campos eléctricos directos en condiciones moderadas, se observa un incremento temporal en la síntesis de celulosa (durante las primeras 12 h), Y como efecto deseado, activar la biosíntesis *in – situ* con aplicación de un campo eléctrico induce la orientación de dipolos en cadenas de celulosa nacientes, promoviendo su alineación durante la polimerización extracelular. Por otro lado,

Liu et al. (2016) reportaron incrementos del 40% en la actividad de celulosa sintasa durante las primeras 12 h bajo campos moderados

Los resultados obtenidos en este estudio representan que el estímulo eléctrico controlado favorece los primeros estadios de producción sin impactar negativamente la viabilidad celular, mientras que un campo excesivo supera la capacidad adaptativa de la bacteria, conduciendo a disrupción metabólica. Respecto a los cambios de pH en 0.6 *V/cm* y 0.8 *V/cm* pudo deberse a la electrólisis del agua, la cual genera H^+ y OH^- que desestabilizan el pH, induce la formación de ácidos orgánicos (gluconato, lactato) que inhiben el crecimiento. Por otro lado, los productos iónicos alteran la presión osmótica, comprometiendo la integridad celular

Determinación y cuantificación de LPS presente en CB.

Los resultados confirman la efectividad de la purificación alcalina como método principal para la eliminación de endotoxinas en CB. La ausencia completa de LPS en todas las diluciones de CB purificada valida este proceso como estrategia de descontaminación, contrastando marcadamente con la persistencia de endotoxinas en muestras no purificadas hasta diluciones intermedias. La ineficacia aparente de la polimixina B en muestras no purificadas puede atribuirse a varios factores: (1) saturación del antibiótico por exceso de carga de endotoxinas, (2) formación de complejos LPS-polimixina que mantienen actividad residual, o (3) interferencia de componentes de la matriz de CB con el mecanismo de neutralización. Este comportamiento es consistente con reportes donde polisacáridos interfieren en la reacción LAL, generando falsos positivos o negativos (Hurley, 1995). Este hallazgo refuerza que la polimixina B es insuficiente como método único de descontaminación en biomateriales con alta carga inicial de endotoxinas.

La detección de LPS en sobrenadantes de ambos tipos de muestras indica que una fracción significativa de endotoxinas permanece soluble en el medio de cultivo post-procesamiento. Este hallazgo tiene implicaciones prácticas importantes, ya que sugiere la necesidad de procesos de lavado exhaustivos y múltiples cambios de medio durante la purificación para eliminar completamente las endotoxinas solubles.

Estos resultados son concordantes con estudios previos que destacan la purificación alcalina como método estándar para la remoción de restos bacterianos y endotoxinas en CB (Czaja et al., 2006; Helenius et al., 2006; Petersen & Gatenholm, 2011). La superioridad de la purificación química sobre tratamientos antibióticos específicos confirma que la

eliminación física de componentes bacterianos es más efectiva que la neutralización selectiva de endotoxinas. La ausencia de LPS en CB purificada en todas las diluciones evaluadas sugiere que el proceso alcalino no solo reduce la carga de endotoxinas por debajo del límite de detección del ensayo LAL, sino que probablemente las elimina por debajo de los niveles considerados seguros para aplicaciones biomédicas (< 0.5 EU/mL según estándares FDA).

En conjunto, estos hallazgos validan definitivamente la purificación alcalina como requisito indispensable para obtener *scaffolds* de CB biocompatibles, estableciendo una correlación directa entre la ausencia de endotoxinas y la seguridad del material para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Este resultado refuerza la base metodológica para los ensayos posteriores de citotoxicidad celular, asegurando que las respuestas biológicas observadas sean atribuibles a las propiedades intrínsecas del material y no a contaminantes bacterianos residuales.

Evaluación de interacción entre factores: campo eléctrico y tracción mecánica

El diseño experimental multifactorial permitió estudiar la interacción entre campo eléctrico y tracción mecánica. El análisis estadístico mostró que ambos factores tienen efectos positivos y significativos en la alineación de nanofibras ($p < 0.001$ para el campo eléctrico y $p = 0.005$ para la tracción), siendo el campo eléctrico el más influyente (efecto = 0.092 frente a 0.043). Este hallazgo se alinea con reportes previos en los que campos eléctricos de baja intensidad inducen polarización molecular, orientación direccional y cristalización dirigida de la CB (Liu et al., 2016; Muthoka et al., 2021). La interacción entre ambos factores tiene una significancia marginal sugiere una tendencia hacia la interacción que requiere análisis estadístico más robusto. Considerando que, en biomateriales, valores $0.05 < p < 0.10$ indican asociaciones emergentes es plausible que exista una sinergia incipiente que se manifestaría con mayor tamaño muestral ($n > 15$ por grupo). (Maxwell & Delaney, 2004).

Propiedades mecánicas complejo del Módulo de Young

Los ensayos de tracción uniaxial permitieron identificar tres fases características en el comportamiento mecánico de la CB: (i) una fase de acomodación inicial, con baja resistencia atribuible al reacomodo de nanofibras; (ii) una fase de endurecimiento, donde el entrelazado tridimensional confiere un aumento progresivo de la resistencia; y (iii) una fase de saturación, previa al límite de ruptura, en la cual se observa una estabilización de la respuesta elástica. Este patrón coincide con lo descrito previamente para biopolímeros de

origen bacteriano, en los que la organización interna de la red fibrilar determina la resistencia y el módulo elástico del material (Yadav et al., 2020). La disminución del módulo de Young observada a 5 y 15 ciclos sugiere un proceso de relajación estructural y microfracturas en la red, mientras que la recuperación parcial registrada a los 30 ciclos refleja un proceso de realineamiento progresivo de nanofibras que permite restituir la capacidad de transmitir esfuerzos. Resultados similares han sido reportados en otros estudios, donde la deformación cíclica indujo una orientación preferencial de las fibras y mejoró la anisotropía mecánica del biomaterial (Shishehbor et al., 2021). Esto indica que existe un número óptimo de ciclos capaz de maximizar la alineación fibrilar sin comprometer la integridad estructural del *scaffold*. El módulo final 4.1 MPa se aproxima al músculo esquelético humano (1-10 MPa), sugiriendo compatibilidad mecánica para aplicaciones tisulares.

Análisis de sorción de vapor dinámico en CB

Los resultados obtenidos mediante el modelo de Guggenheim Anderson de Boer (GAB) evidencian que tanto la tracción mecánica como el campo eléctrico influyen en la capacidad de adsorción de vapor de agua de la CB. El incremento en el contenido de humedad en monocapa (m) bajo la aplicación de campo eléctrico 0.4 V/cm fue el más significativo, alcanzando un valor de $5.97 \text{ g H}_2\text{O/g}$ sólido seco, 55.9% superior al control. Este hallazgo indica que el estímulo eléctrico genera modificaciones estructurales que aumentan la disponibilidad de sitios activos de sorción, probablemente debido a una reorganización supramolecular por polarización de las nanofibras que expone grupos hidroxilo -OH previamente inaccesibles (Moon et al., 2011). Funcionalmente, una mayor retención de humedad puede favorecer difusión de nutrientes y la homeostasis hídrica local en escenarios de cultivo o implante. La tracción mecánica también elevó el parámetro m , aunque en menor magnitud ($4.32 \text{ g H}_2\text{O/g}$ sólido seco, incremento del 12.8%). Este resultado puede atribuirse a la generación de microfracturas y al relajamiento parcial de la red polimérica, fenómenos que incrementan el área superficial disponible para la interacción con moléculas de agua. Estudios previos han señalado que la deformación mecánica de biopolímeros puede inducir la apertura de porosidad y la exposición de dominios hidrofílicos, lo cual incrementa la capacidad de retención de humedad (Iguchi et al., 2000; Klemm et al., 2018). El parámetro C, relacionado con la energía de sorción, presentó su mayor aumento en la condición de tracción (6.05), lo que sugiere una interacción más fuerte entre las moléculas de agua y los sitios de alta energía generados durante el reacomodo estructural.

En contraste, el campo eléctrico indujo un incremento más moderado 2.23, mientras que la combinación de ambos estímulos alcanzó un valor intermedio 5.27. Este comportamiento refuerza la idea de que los mecanismos de modificación estructural de la CB bajo estímulos físicos no son aditivos, sino que interactúan de manera compleja, afectando de forma diferencial la densidad y accesibilidad de los sitios de sorción. Finalmente, el parámetro K, relacionado con la capacidad de sorción en multicapas, disminuyó en todas las condiciones tratadas respecto al control, lo cual indica que los tratamientos, si bien aumentan la sorción inicial en monocapa, pueden limitar la formación de capas sucesivas de agua en condiciones de alta humedad relativa. Esta tendencia ha sido reportada previamente en biopolímeros con reorganización inducida, donde la disminución en el empaquetamiento fibrilar reduce la posibilidad de retención de agua en estados avanzados de adsorción (Haigler et al., 1982).

Análisis de espectroscopia FTIR-ATR.

Los espectros FTIR-ATR obtenidos confirman la preservación de las bandas características de la CB tras los tratamientos aplicados. Las bandas identificadas en 1314 cm^{-1} (C-H₂), 1031 cm^{-1} (C-O), 1161 cm^{-1} (C-O-C), 1335 cm^{-1} (O-H) y $1635\text{-}1639\text{ cm}^{-1}$ (H-O-H) son consistentes con estudios previos que establecen estas frecuencias como marcadores estructurales fundamentales de la CB. Los cambios en las intensidades relativas observados en los espectros sugieren reordenamientos a nivel supramolecular sin alteración química. Las modificaciones en las intensidades de bandas FTIR reflejan cambios en el ambiente químico local y la organización intermolecular, más que degradación química. Por lo cual, se puede evidenciar que hay conservación de bandas fundamentales C-O, C-O-C, O-H, ausencia de nuevas bandas indicativas de degradación, mantenimiento del perfil espectral característico de celulosa I-β.

Índice de Cristalinidad

Los resultados del índice de cristalinidad muestran una disminución sistemática desde 4.59 para la CB control hasta 1.03 en el tratamiento combinado de tracción mecánica y aplicación de campo eléctrico. Este comportamiento puede explicarse considerando que el tratamiento de tracción mecánica induce microfracturas y relajación de la red polimérica, mientras que la aplicación de campo eléctrico promueve cambios conformacionales profundos a través de la polarización electrostática. En conjunto, ambos factores generan la máxima disrupción de la organización cristalina sin evidencia de degradación química significativa. Esta tendencia es consistente con estudios previos que han demostrado cómo distintos

tratamientos físicos pueden reducir la cristalinidad de la celulosa al alterar los dominios rígidos y aumentar las regiones amorfas (Park et al., 2010). De manera similar, investigaciones sobre nanocelulosa han reportado que las condiciones que modifican la interfase entre microfibrillas inducen un desempaque estructural que repercute directamente en el índice de cristalinidad (Chen et al., 2018). En el contexto de biomateriales, esta reducción es relevante ya que una menor cristalinidad puede otorgar mayor flexibilidad y accesibilidad superficial, características deseables para mejorar la interacción célula-material.

Validación biológica

Los resultados del ensayo WST-1 evidencian que la CB, tanto en su forma control como alineada, presenta una adhesión celular significativamente superior al control de plástico a las 48 horas ($F = 17,12$; $p < 0,001$). Este hallazgo confirma la elevada biocompatibilidad del material, concordante con estudios que destacan que la superficie hidrofílica de la CB favorece la adhesión celular y que su estructura nanofibrilar proporciona un área superficial incrementada para interacciones célula-matriz (Park et al., 2010). Además, se ha establecido que la CB carece de efectos citotóxicos en múltiples líneas celulares, lo que respalda su seguridad en aplicaciones biomédicas (Shi et al., 2014).

El análisis comparativo entre CB control y CB alineada no mostró diferencias significativas en la adhesión celular inicial ($p > 0,05$), lo que indica que la orientación fibrilar no afecta negativamente la biocompatibilidad temprana. Sin embargo, los resultados de inmunofluorescencia revelaron que las células C2C12 cultivadas sobre CB alineada mostraron una expresión intensa y direccional de *MHC*, marcador clave de la diferenciación miogénica. Este hallazgo es particularmente relevante en ingeniería de tejidos musculares, ya que la organización direccional de los mioblastos y miotubos constituye un requisito esencial para el desarrollo de tejidos funcionales. De acuerdo con la diferenciación miogénica es un proceso altamente organizado que puede ser regulado por las características del sustrato, lo cual concuerda con nuestros resultados. La orientación observada puede explicarse mediante tres mecanismos complementarios: primero, la guía de contacto proporcionada por las nanofibras alineadas, que actúan como señales topográficas direccionales; segundo, la anisotropía mecánica del sustrato, donde la rigidez diferencial en direcciones específicas influye en la organización del citoesqueleto; y tercero, la distribución espacial de las adhesiones focales, que depende de la geometría del sustrato y condiciona la formación de complejos de adhesión celular. Estudios previos han

demostrado que sustratos con fibras alineadas inducen mayor alineación de miotubos, incremento en el diámetro celular y sobreexpresión de marcadores musculares como *MHC*, confirmando el papel fundamental de la topografía en la diferenciación muscular. Estos hallazgos son coherentes con estudios en el área de carne cultivada, donde la microestructuración de *scaffolds* comestibles también ha demostrado favorecer la orientación celular y la formación de fibras musculares (Acevedo et al., 2018; Bezjak et al., 2024)

7. CONCLUSIONES

La aplicación controlada de un campo eléctrico durante la biosíntesis in situ de celulosa bacteriana (CB) por *Komagataeibacter sucrofermentans* permitió obtener *scaffolds* con nanofibras orientadas, replicando eficazmente la arquitectura de la matriz extracelular (ECM) del músculo esquelético. La orientación resultante se asocia a propiedades compatibles para aplicaciones en cultivo de células musculares.

Se estableció una ventana segura de 0.2–0.6 V/cm que preserva la viabilidad bacteriana y promueve la orientación estructural. Aunque campo eléctrico y tracción mecánica contribuyen a la alineación, el análisis estadístico demostró que el campo (0.4 V/cm) es el factor predominante (efecto = 0.092 frente a 0.043 para tracción; $p < 0.001$), con tendencia a aditividad y señales de sinergia incipiente bajo condiciones combinadas (0.4 V/cm + 30 ciclos).

Los ensayos de tracción exhibieron el patrón en tres fases (acomodación–endurecimiento–saturación) y un módulo final para 30 C se encuentra dentro del rango del músculo esquelético (1–10 MPa), confirmando compatibilidad biomecánica. En paralelo, los análisis DVS–GAB y ATR-FTIR/IC evidenciaron incremento de la capacidad de sorción ($m \uparrow 55.9\%$ a 0.4 V/cm) y disminución controlada de la cristalinidad (IC 4.59 $\rightarrow$ 1.03) sin alterar la integridad química, lo que favorece flexibilidad, accesibilidad molecular y, potencialmente, interacciones célula-material.

La eliminación completa de endotoxinas en CB purificada ($<0.125 \text{ EU} \cdot \text{mL}^{-1}$) valida el protocolo alcalino y garantiza que los efectos biológicos observados se atribuyan a propiedades intrínsecas del material. Los ensayos con C2C12 confirmaron adhesión y proliferación superiores al plástico (48 h, $F = 17.12$; $p < 0.001$) y diferenciación miogénica direccional en CB alineada, reforzando el potencial terapéutico del *scaffold*.

De esta manera, todos los objetivos planteados fueron abordados y validados experimentalmente, permitiendo confirmar parcialmente la hipótesis (efecto positivo del campo y tracción), aunque la sinergia estadística plena requiere mayor tamaño muestral.

8. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos en esta investigación abren múltiples posibilidades para avanzar en el desarrollo de *scaffolds* de CB orientados a aplicaciones biomédicas. En base a los hallazgos y limitaciones identificadas, se proponen las siguientes recomendaciones para trabajos futuros:

1. Integración de señales bioquímicas: Complementar la alineación física de las nanofibras con la incorporación de factores bioquímicos, como proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, colágeno tipo I, fibronectina, laminina) o péptidos de adhesión celular (ejemplo., RGD). Estas modificaciones podrían mejorar la interacción célula-matriz, potenciando la adhesión, proliferación y diferenciación celular.
2. Evaluación funcional *in-vitro* en condiciones dinámicas: Extender los ensayos celulares hacia sistemas de cultivo dinámico o biorreactores que simulen condiciones fisiológicas, como tensión mecánica cíclica o flujo de medio, lo que permitiría validar el comportamiento del *scaffold* en microambientes más cercanos al tejido muscular nativo.
3. Validación preclínica: Diseñar estudios *in vivo* en modelos animales (ejemplo: ratón o conejo) para evaluar la integración del *scaffold* en tejido muscular lesionado, su respuesta inmunológica, degradabilidad y capacidad para promover la regeneración funcional del músculo.
4. Optimización de la biodegradabilidad: Estudiar estrategias de modificación química o enzimática de la CB que permitan ajustar su tasa de degradación de manera controlada. Esto facilitaría su integración con el tejido huésped y permitiría diseñar *scaffolds* reabsorbibles acorde al ritmo de regeneración del tejido.
6. Aplicaciones interdisciplinarias: Explorar la aplicación de estos *scaffolds* alineados en otros tipos de tejidos que requieren orientación direccional, como nervios periféricos o tendones, lo que ampliaría el impacto de esta tecnología más allá del músculo esquelético.

9. REFERENCIAS

- Acevedo, C. A., Orellana, N., Avarias, K., Ortiz, R., Benavente, D., & Prieto, P. (2018). Micropatterning technology to design an edible film for *in vitro* meat production. *Food and Bioprocess Technology*, 11(7), 1267–1273. <https://doi.org/10.1007/s11947-018-2095-4>
- Astrand, P., Rodahl, K., Dahl, H., & Strømme, S. (2010). *Manual de fisiología del ejercicio* (1.^a ed., pp. 19–45). Editorial Paidotribo.
- Atala, A. (2004). Tissue engineering and regenerative medicine: Concepts for clinical application. *Rejuvenation Research*, 7(1), 950–971. <https://doi.org/10.1002/9781444303513.ch61>
- Azzabi, F., Stölting, M., & Eberli, D. (2013). Skeletal muscle regeneration for clinical application. In *Regenerative medicine and tissue engineering*. <https://doi.org/10.5772/55739>
- Azri, Y. M., Tou, I., & Sadi, M. (2023). Graphite versus stainless steels in plant microbial fuel cells. *Biofuels*. <https://doi.org/10.1080/17597269.2023.2212987>
- AZoM. (2019). Graphite (C) – Properties, applications and occurrence. *The A to Z of Materials*. Recuperado el 20 de septiembre de 2024, de <https://www.azom.com/properties.aspx>
- Banerjee, A., Calay, R. K., & Mustafa, M. (2022). Review on material and design of anode for microbial fuel cell. *Energies*, 15(6), 2283. <https://doi.org/10.3390/en15062283>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127–152. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11004-7](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11004-7)
- Bezjak, D., Orellana, N., Valdés, J. H., Corrales, T., & Acevedo, C. A. (2024). Towards understanding the role of microstructured edible scaffolds for cultured meat production. *Food and Bioprocess Technology*, 17(3), 767–779. <https://doi.org/10.1007/s11947-023-03166-2>

- Bischoff, R., & Heintz, C. (1994). Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Developmental Dynamics*, 201(1), 41–54. <https://doi.org/10.1002/aja.1002010105>
- Bodea, I. M., Beteg, F. I., Popa, M. I., & Daraba, O. M. (2019). Bacterial cellulose—A sustainable biomaterial with promising biomedical applications. *Materials*, 12(20), 3353. <https://doi.org/10.3390/ma12203353>
- Boldrin, L., Muntoni, F., & Morgan, J. E. (2010). Are human and mouse satellite cells really the same? *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 58(11), 941–955. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.956201>
- Brown, B. N., & Badylak, S. F. (2014). Extracellular matrix as an inductive scaffold for functional tissue reconstruction. *Translational Research*, 163(4), 268–285. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.11.003>
- Bungay, H. R., & Serafica, G. C. (1999). Production of microbial cellulose using a rotating disk film bioreactor (U.S. Patent No. 5,955,326). U.S. Patent and Trademark Office.
- Burattini, S., Ferri, R., Battistelli, M., Curci, R., Luchetti, F., & Falcieri, E. (2004). C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: Morpho-functional characterization. *European Journal of Histochemistry*, 48(3), 223–233. <https://doi.org/10.4081/891>
- Cakar, F., Özer, İ., Aytekin, A. Ö., & Şahin, F. (2014). Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate Polymers*, 106, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.103>
- Carnes, M. E., & Pins, G. D. (2020). Skeletal muscle tissue engineering: Biomaterials-based strategies for the treatment of volumetric muscle loss. *Bioengineering*, 7(3), 85. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030085>
- Cascone, S., & Lamberti, G. (2020). Hydrogel-based commercial products for biomedical applications: A review. *International Journal of Pharmaceutics*, 585, 119455. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119455>

- Carvalho, T., Guedes, G., Sousa, F. L., Freire, C. S. R., & Santos, H. A. (2019). Latest advances on bacterial cellulose-based materials for wound healing, delivery systems, and tissue engineering. *Biotechnology Journal*, 14(12), 1900059. <https://doi.org/10.1002/biot.201900059>
- Cezar, C. A., & Mooney, D. J. (2016). Biomaterial-based delivery for skeletal muscle repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 84, 188–197.
- Cetin, F. S., Avci, T., Uygur, E., Ilhan, E., Kaya, E., Tinaz, G. B., Duta, L., Dogan, C., & Gunduz, O. (2025). Development and characterization of antimicrobial chitosan/polyethylene oxide/bacterial cellulose nanofibers. *Polymers*, 17(5), 693. <https://doi.org/10.3390/polym17050693>
- Chen, S., Patil, S. A., Brown, R. K., Schröder, U., & Li, W. (2014). Flame oxidation of stainless steel felt enhances anodic performance in bioelectrochemical systems. *Environmental Science & Technology*, 48(14), 8254–8260. <https://doi.org/10.1021/es500720g>
- Cheng, K. K., Liu, Y. Y., & Wang, S. Y. (2019). Bacterial cellulose: A new biomaterial for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(5), 1819–1831. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34361>
- Cooper, W. G., & Konigsberg, I. R. (1961). Dynamics of myogenesis *in vitro*. *Anatomical Record*, 140, 195-205. <https://doi.org/10.1002/ar.1091400305>
- Cortés, H., Alcaíno-Olivares, R., Espinoza-Monje, M., Fernández-Rojas, B., Rivas, L., Arismendi-Soto, J., & Enrione, J. (2020). Bacterial cellulose–alginate composite hydrogels for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 110, 110702. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110702>
- Czaja, W. K., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.035>
- Denes, L. T., Riley, L. A., Mijares, J. R., Arboleda, J. D., McKee, K., Esser, K. A., & Wang, E. T. (2019). Culturing C2C12 myotubes on micromolded gelatin hydrogels

- accelerates myotube maturation. *Skeletal Muscle*, 9, article 17.
<https://doi.org/10.1186/s13395-019-0203-4>
- El-Gendi, H., Saleh, A. K., Badierah, R., Redwan, E. M., El-Maradny, Y. A., & El-Fakharany, E. M. (2022). A comprehensive insight into bacterial cellulose: From production strategies to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 287, 119349. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119349>
- Enrione, J., Blaker, J. J., Brown, D. I., Weinstein-Opppenheimer, C. R., Pepczynska, M., Olguín, Y., Sánchez, E., & Acevedo, C. A. (2017). Edible scaffolds based on non-mammalian biopolymers for myoblast growth. *Materials*, 10(12), 1404. <https://doi.org/10.3390/ma10121404>
- Francetic, T., & Li, Q. (2015). Skeletal myogenesis and Myf5 activation. *Translational Neuroscience*, 2(3), 15829. <https://doi.org/10.4161/trns.2.3.15829>
- Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications* (7th ed.). John Wiley & Sons.
- Frontera, W. R., & Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: A brief review of structure and function. *Calcified Tissue International*, 96(3), 183–195. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>
- Gelin, K., Bodin, A., Gatenholm, P., Mihranyan, A., Edwards, K., & Strømme, M. (2007). Characterization of water in bacterial cellulose using dielectric spectroscopy and electron microscopy. *Polymer*, 48(26), 7623–7631. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2007.10.039>
- Gerli, M. F. M., Guyette, J. P., Evangelista-Leite, D., Ghoshhajra, B. B., & Ott, H. C. (2018). Perfusion decellularization of a human limb: A novel platform for composite tissue engineering and reconstructive surgery. *PLOS ONE*, 13(1), e0191497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191497>
- Ghosh, S., Dutta, K., & Dutta, P. K. (2018). Bacterial cellulose: A review of production and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.113>

- Grand View Research, Inc. (2025). *Tissue engineering market analysis and segment forecasts to 2030* [Informe de mercado].
- Grasman, J. M., Zayas, M. J., Page, R. L., & Pins, G. D. (2015). Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomaterialia*, 25(1), 2–15. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.038>
- Haigler, C. H., Brown, R. M., & Benziman, M. (1982). Cellulose biogenesis by *Acetobacter xylinum*: Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the *in vivo* process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(10), 2976–2980. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.10.2976>
- Helmenstine, A. M. (2020, agosto 28). Table of electrical resistivity and conductivity. *ThoughtCo*. Recuperado el 20 de septiembre de 2024, de <https://www.thoughtco.com/table-of-electrical-resistivity-conductivity-608499>
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345–352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- Higgins, S. G., Becce, M., Belessiotis-Richards, A., Seong, H., Sero, J. E., & Stevens, M. M. (2020). High-aspect-ratio nanostructured surfaces as biological metamaterials. *Advanced Materials*, 32(12), 1903862. <https://doi.org/10.1002/adma.201903862>
- Hill, M., Wernig, A., & Goldspink, G. (2003). Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair.
- Horwath, W. R. (2007). Carbon cycling and formation of soil organic matter. En E. A. Paul (Ed.), *Soil microbiology, ecology and biochemistry* (pp. 303–339). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-047514-1.50016-0>
- Hurley, J. C. (1995). Antibiotic-induced release of endotoxin. A therapeutic paradox. *Drug Safety: An International Journal of Medical Toxicology and Drug Experience*, 12(3), 183–195. <https://doi.org/10.2165/00002018-199512030-00004>

- Liu, M., Zhong, C., Zhang, Y. M., Xu, Z. M., Qiao, C. S., & Jia, S. R. (2016). Metabolic investigation in *Gluconacetobacter xylinus* and its bacterial cellulose production under a direct current electric field. *Frontiers in Microbiology*, 7, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00331>
- Hutmacher, D. W. (2000). Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21(24), 2529–2543. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6)
- Iguchi, M., Yamanaka, S., & Budhiono, A. (2000). Bacterial cellulose—A masterpiece of nature's arts. *Journal of Materials Science*, 35(2), 261–270. <https://doi.org/10.1023/A:1004775229149>
- Jalili, P., Cao, C., & Nakhla, G. (2024). A comprehensive review of microbial fuel cells: Fundamentals to applications. *Heliyon*, 10(3), e26955. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26955>
- Jana, S., Levengood, S. K. L., & Zhang, M. (2016). Anisotropic materials for skeletal-muscle-tissue engineering. *Advanced Materials*, 28(48), 10588–10612. <https://doi.org/10.1002/adma.201600240>
- Jang, W. D., Kim, T. Y., Kim, H. U., Shim, W. Y., Ryu, J. Y., Park, J. H., & Lee, S. Y. (2019). Genomic and metabolic analysis of *Komagataeibacter xylinus* DSM 2325 producing bacterial cellulose nanofiber. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(12), 3372–3381. <https://doi.org/10.1002/bit.27150>
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2015). *Histología básica: Texto y atlas* (12.^a ed.). Elsevier.
- Kapnisi, M., Mansfield, C., Marijon, C., Guex, A. G., Perbellini, F., Bardi, I., ... Stevens, M. M. (2018). Auxetic cardiac patches with tunable mechanical and conductive properties toward treating myocardial infarction. *Advanced Functional Materials*, 28(21), 1800618. <https://doi.org/10.1002/adfm.201800618>
- Keshk, S. M. A. S. (2020). Bacterial cellulose production and its industrial applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(2), 1000151. <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000151>

- Klemm, D., Cranston, E. D., Fischer, D., Gama, M., Kedzior, S. A., Kralisch, D., Rauchfuß, F. (2018). Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today's state. *Materials Today*, 21(7), 720–748. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.02.001>
- Kroehne, V., Heschel, I., Schügner, F., Lasrich, D., Bartsch, J. W., & Jockusch, H. (2008). Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5a), 1640–1648. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00238.x>
- Kuang, S., Gillespie, M. A., & Rudnicki, M. A. (2008). Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*, 2(1), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.012>
- Kuraitis, D., Giordano, C., & Suuronen, E. J. (2018). Exploiting extracellular matrix–stem cell interactions: A review of natural materials for therapeutic muscle regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 85. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00085>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Ledezma, P., Donose, B. C., & Freguia, S. (2015). Oxidised stainless steel: Effective bioanode but high risk of corrosion in bioelectrochemical systems. *Electrochimica Acta*, 158, 356–360. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.01.175>
- Li, L., Huang, C., Pang, J., Huang, Y., Chen, X., & Chen, G. (2023). Advances in research on cell models for skeletal muscle atrophy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 167, 115517. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115517>
- Liu, M., Zhong, C., Zhang, Y., Xu, Z., Qiao, C., & Jia, S. (2016). Metabolic investigation in *Gluconacetobacter xylinus* and its bacterial cellulose production under a direct current electric field. *Frontiers in Microbiology*, 7, 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00331>

- Luo, H., Xiong, G., Huang, Y., He, F., Wang, Y., Wan, Y., & Chen, L. (2017). Flow-induced alignment of bacterial cellulose nanofibers for the production of anisotropic nanocomposites. *Cellulose*, 24(11), 4803–4813. <https://doi.org/10.1007/s10570-017-1447-0>
- MacQueen, L. A., Buschmann, M. D., & Wertheimer, M. R. (2010). Mechanical properties of mammalian cells in suspension measured by electro-deformation. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 20(6), 065007. <https://doi.org/10.1088/0960-1317/20/6/065007>
- Mardling, P., Alderson, A., Jordan-Mahy, N., & Christine Lyn, L. M. (2020). The use of auxetic materials in tissue engineering. *Biomaterials Science*, 8(23), 6506–6521. <https://doi.org/10.1039/C9BM01928F>
- Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 9(2), 493–495. <https://doi.org/10.1083/jcb.9.2.493>
- Maxwell, S. E., & Delaney, H. D. (2004). Designing experiments and analyzing data: A model comparison perspective (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates Publishers.
- Morgan, J. E., Hoffman, E. P., & Partridge, T. A. (1992). Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerate muscles of the *mdx* mouse. *Journal of Cell Biology*, 111(6), 2437–2449.
- Moss, F. P., & Leblond, C. P. (1971). Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *The Anatomical Record*, 170(4), 421–435. <https://doi.org/10.1002/ar.1091700405>
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments* (9th ed.). John Wiley & Sons.
- Moon, R. J., Martini, A., Nairn, J., Simonsen, J., & Youngblood, J. (2011). Cellulose nanomaterials review: Structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*, 40(7), 3941–3994. <https://doi.org/10.1039/C0CS00108B>
- Mueller, C., Trujillo-Miranda, M., Maier, M., Heath, D. E., O'Connor, A. J., & Salehi, S. (2021). Effects of external stimulators on engineered skeletal muscle tissue

maturation. *Bioengineering*, 8(12), 207.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering8120207>

Murphy, C. M., Haugh, M. G., & O'Brien, F. J. (2010). The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3), 461–466.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.063>

Mustakeem, M. (2015). Electrode materials for microbial fuel cells: Nanomaterial approach. *Materials for Renewable and Sustainable Energy*, 4(4), 10.1007/s40243-015-0063-8. <https://doi.org/10.1007/s40243-015-0063-8>

Muthoka, R. M., Roy, S., Kim, H. C., Yoon, H., Zhai, L., & Kim, J. (2021). Polydopamine–cellulose nanofiber composite for flexible electrode material. *Smart Materials and Structures*, 30(3), 035025. <https://doi.org/10.1088/1361-665X/abe184>

Nakayama, K., Mahdis, S., & Huang Ngan. (2017). Engineering biomimetic materials for skeletal muscle repair and regeneration. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Nelson, M. L., & O'Connor, R. T. (1964). Relation of certain infrared bands to cellulose crystallinity and crystal lattice type. Part II. A new infrared ratio for estimation of crystallinity in celluloses I and II. *Journal of Applied Polymer Science*, 8(3), 1325–1341. <https://doi.org/10.1002/app.1964.070080323>

O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds. *Materials Today*, 14(3), 88–95.
[https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)

O'Brien, F. J., Harley, B. A., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2005). The effect of pore size on cell adhesion in collagen–GAG scaffolds. *Biomaterials*, 26(4), 433–441.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.052>

Park, S., Baker, J. O., Himmel, M. E., Parilla, P. A., & Johnson, D. K. (2010). Cellulose crystallinity index: Measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*, 3, 10. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>

- Parker, M. H., Seale, P., & Rudnicki, M. A. (2003). Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 573–584. <https://doi.org/10.1038/nrg1109>
- Petersen, N., & Gatenholm, P. (2011). Bacterial cellulose-based materials and medical devices: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(5), 1277–1286. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3432-y>
- Pette, D., & Staron, R. S. (2000). Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique*, 50(6), 500–509. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000915\)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000915)50:6<500::AID-JEMT7>3.0.CO;2-7)
- Philippou, A., Maridaki, M., Theos, A., & Koutsilieris, M. (2012). Cytokines in muscle damage. En *Advances in clinical chemistry* (Vol. 58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394383-5.00010-2>
- Piskin, E. (1994). Biodegradable polymers as biomaterials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 6(6), 537–547. (datos ajustados al mínimo provisto)
- Portela, R., Leal, C. R., Almeida, P. L., & Sobral, R. G. (2019). Bacterial cellulose: A versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 586–610. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>
- Qazi, T. H., Mooney, D. J., Pumberger, M., Geissler, S., & Duda, G. N. (2015). Biomaterials-based strategies for skeletal muscle tissue engineering: Existing technologies and future trends. *Biomaterials*, 53, 502–521. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.02.110>
- Rahman, M. M., & Netravali, A. N. (2016). Green composites from soy protein and bacterial cellulose. *Composites Science and Technology*, 120, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2015.10.012>
- Ramos-Zúñiga, J., Morales-Mendoza, G., & Martínez-Mendoza, J. R. (2023). Toxicity mechanisms of copper nanoparticles and surfaces. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10503. <https://doi.org/10.3390/ijms241310503>

Ratner, B., Hoffman, A., Schoen, F., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials science*. Elsevier.

Reay, M., Norris, S. J., Smith, G. R., & Williams, D. F. (2023). Bacterial endotoxin testing: A practical approach for medical device evaluation. *Biomaterials*, 294, 122018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122018>

Rezakhaniha, R., Agianniotis, A., Schrauwen, J. T. C., Griffa, A., Sage, D., Bouten, C. V. C., Stergiopulos, N. (2012). Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 11(3–4), 461–473. <https://doi.org/10.1007/s10237-011-0325-z>

Richler, C., & Yaffe, D. (1970). The *in vitro* cultivation and differentiation capacities of myogenic cell lines. *Developmental Biology*, 23(1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(70\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(70)90040-X)

Rogers, J., Seliktar, D., Shapira-Schweitzer, K., Stratta, R. J., Atala, A., Wood, K. J., & Soker, S. (2014). Regenerative medicine as applied to solid organ transplantation: Current status and future challenges. *Transplantation Reviews*, 28(3), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2014.02.003>

Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35–58. <https://doi.org/10.1128/mr.55.1.35-58.1991>

Saclier, M., Yacoub-Youssef, H., Mackey, A. L., Arnold, L., Ardjoune, H., Magnan, M., ... Chazaud, B. (2013). Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*, 31(2), 384–396. <https://doi.org/10.1002/stem.1288>

Salah, I., Oueslati, N., & Bekir, M. (2021). Copper as an antimicrobial agent: Recent advances. *RSC Advances*, 11(30), 18179–18202. <https://doi.org/10.1039/D1RA02149D>

Sano, M. B., Rojas, A. D., Gatenholm, P., & Davalos, R. V. (2010). Electromagnetically controlled biological assembly of aligned bacterial cellulose nanofibers. *Annals of*

- Biomedical Engineering*, 38(8), 2475–2484. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9999-0>
- Sano, M. B., Gallo-Villanueva, R. C., Lapizco-Encinas, B. H., & Davalos, R. V. (2013). Simultaneous electrokinetic flow and dielectrophoretic trapping using perpendicular static and dynamic electric fields. *Microfluidics and Nanofluidics*, 15(5), 599–609. <https://doi.org/10.1007/s10404-013-1175-z>
- Schmidt, M., Schüler, S. C., Hüttner, S. S., von Eyss, B., & von Maltzahn, J. (2019). Adult stem cells at work: Regenerating skeletal muscle. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(13), 2559–2570. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>
- Schultz, E., & McCormick, K. M. (1994). Skeletal muscle satellite cells. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 123, 213–257. <https://doi.org/10.1007/BFb0030904>
- Shi, Z., Zhang, Y., Phillips, G. O., & Yang, G. (2014). Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, 35, 539–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>
- Shishehbor, M., Farzin, A., & Fathi, M. (2021). Mechanical stimulation of biopolymer scaffolds: Strategies for improving tissue engineering outcomes. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 121, 104632. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2021.104632>
- Sousa, R. B., Damé-Pereira, F., Freitas, A., Pimentel, C., & Gama, M. (2024). Bacterial cellulose-based materials: A review on production, properties and applications in tissue engineering and drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 256, 128463. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128463>
- Sun, J. X., Sun, X. F., Zhao, H., & Sun, R. C. (2004). Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*, 84(2), 331–339. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2004.02.008>
- Szymański, K. R. (2018). Determination of the electric field gradient and the magnetic field in Mössbauer spectroscopy. *The European Physical Journal B*, 91, 292. <https://doi.org/10.1140/epjb/e2018-90379-x>

- Tang, J., Sisler, J., Grishkewich, N., & Tam, K. C. (2017). Functionalization of cellulose nanocrystals for advanced applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 494, 397–409. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.077>
- Théry, M. (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of Cell Science*, 123(24), 4201–4213. <https://doi.org/10.1242/jcs.075150>
- Thorsteinsdóttir, S., Deries, M., Cachão, A. S., & Bajanca, F. (2011). The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Developmental Biology*, 354(2), 191–207. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.03.015>
- Toumi, H., & Best, T. M. (2003). The inflammatory response: Friend or enemy for muscle injury? *International Journal of Sports Medicine*, 24(3), 184–190. <https://doi.org/10.1136/bjsm.37.4.284>
- Turner, N. J., & Badylak, S. F. (2012). Regeneration of skeletal muscle. *Cell and Tissue Research*, 347(3), 759–774. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1185-7>
- Van Der Berg, C., & Bruin, S. (1981). Water activity and its estimation in food systems. En L. B. Rockland & G. F. Stewarts (Eds.), *Theoretical Aspects in Water Activity: Influence on Food Quality* (pp. 12–45). Academic Press.
- Veliça, P., & Bunce, C. M. (2011). A quick, simple and unbiased method to quantify C2C12 myogenic differentiation. *Muscle & Nerve*, 44(3), 366–370. <https://doi.org/10.1002/mus.22056>
- Wahid, F., Zhong, C., Wang, H. S., Hu, X. H., & Chu, L. Q. (2021). Recent advances in antimicrobial hydrogels containing metal ions and metals/metal oxide nanoparticles. *Polymers*, 13(16), 2648. <https://doi.org/10.3390/polym13162648>
- Wang, M. (2003). Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*, 24(13), 2133–2151. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00037-1)
- Weintraub, H. (1993). The MyoD family and myogenesis: Redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, 75(7), 1241–1244.

- Weintraub, H., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Adam, M. A., Lassar, A. B., & Miller, A. D. (1989). Activation of muscle-specific genes in *fibroblast* cell lines by forced expression of MyoD. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(14), 5434–5438.
- Wolf, M. T., Daly, K. A., Brennan-Pierce, E. P., Johnson, S. A., Carruthers, C. A., D'Amore, A., Badylak, S. F. (2015). A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*, 61, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.018>
- Yaffe, D., & Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270(5639), 725–727. <https://doi.org/10.1038/270725a0>
- Yadav, V., Panilaitis, B. J., Shi, H., Lee, K., Cebe, P., & Kaplan, D. L. (2020). Novel *in vivo*-degradable cellulose–chitin copolymer for tissue engineering. *Biomaterials*, 230, 119541. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119541>
- Yao, J., Chen, S., Chen, Y., Wang, B., Pei, Q., & Wang, H. (2017). Macrofibers with high mechanical performance based on aligned bacterial cellulose nanofibers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 9(24), 20330–20339. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02087>
- Zhou, P., Lin, Z., & Wang, Y. (2016). The anodic dissolution of copper alloys: Influence of microstructure and composition. *Electrochimica Acta*, 197, 338–351. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2016.01.095>

10. ANEXOS

ANEXO 1. Crecimiento bacteriano

A partir de la curva logarítmica de crecimiento (Figura 15), se seleccionaron dos puntos dentro de la fase exponencial, donde el crecimiento bacteriano sigue un patrón exponencial constante. En la Tabla 15, se puede ver los valores obtenidos.

Tabla 15: Puntos seleccionados de la fase exponencial de crecimiento bacteriano según la curva logarítmica ($DO_{600\text{ nm}}$).

Punto	Tiempo (h)	log DO (600 nm)
1	0	-1.3
2	20	0.0

Tasa específica de crecimiento (μ):

Se obtiene a partir de la pendiente de la línea recta en la fase exponencial de la curva logarítmica:

$$\mu = \frac{2.3 * (\log DO_2 - \log DO_1)}{t_2 - t_1}$$

$$\mu = \frac{2.3 * (0 - (-1.3))}{20 - 0}$$

$$\mu = \frac{2.3 * (1.3)}{20}$$

$$\mu = \frac{2.99}{20}$$

$$\mu = 0.14 \text{ h}^{-1}$$

Donde

- Log DO1 y log DO2 son los valores de absorbancia en escala logarítmica.
- t_1 h t_2 son los tiempos correspondientes en horas
- El factor 2.3 convierte de logaritmo base 10 a logaritmo natural.

Tiempo de duplicación (td):

Se define como el tiempo necesario para que la población bacteriana duplique su biomasa durante la fase exponencial:

$$td = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde $\ln(2) \approx 0.6931$.

$$td = \frac{0.6931}{0.1497}$$

$$td = 4.63 \text{ h}$$

Los resultados indican que, bajo las condiciones de cultivo en medio HS, *Komagataeibacter sucrofermentans* presenta una tasa de crecimiento de 0.15 h^{-1} , y duplica la su biomasa aproximadamente cada 4.63 horas.

ANEXO 2: Ensayo de endotoxinas (LAL Test)

Para establecer la concentración de endotoxina presente en las muestras, se realizó una serie de diluciones dobles del extracto hasta alcanzar el punto final (última dilución con resultado positivo). La dilución geométrica media se multiplicó por la sensibilidad del reactivo LAL utilizado, que en este caso fue de 0,125 EU/mL (Unidades Endotoxina por mililitro), conforme a las especificaciones del proveedor. Para determinar la concentración de endotoxina presente, se realizó una serie de diluciones dobles del extracto hasta alcanzar el punto final (última dilución con resultado positivo). La dilución punto final se multiplicó por la sensibilidad del reactivo LAL utilizado de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Las condiciones experimentales y el punto final se presentan en las Tablas 2 y 3, respectivamente. El límite aceptable de endotoxinas para materiales biomédicos según ISO 10993-1 (0.5 EU/mL para dispositivos implantables en contacto con sangre).

Tabla 16: Condiciones experimentales para cada muestra.

Réplicas	Diluciones					
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/54
1	+	+	+	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-

("+": presencia de endotoxina; "-": ausencia).

Tabla 17: Dilución de punto final LPS

Punto Final	Log 10 punto final
1/8 (0,125)	-0.903
1/16 (0,0625)	-1.204

El punto final correspondió a la dilución 1/16 (0.0625), equivalente a $\log_{10} = -1.204$, lo que se encuentra por debajo del límite aceptable de endotoxinas para materiales biomédicos según ISO 10993-1 (0.5 EU/mL para dispositivos biomédicos).

ANEXO 3. Simulación de campo eléctrico

El código en Wolfram Language calcula el campo eléctrico total debido a dos distribuciones de carga superficial y representa gráficamente el campo mediante contornos y líneas de flujo.

Definición de parámetros principales.

Se establecen constantes físicas como $Kappa$, KK , LL , HH , A , DV , D y σ

- $Kappa$ = Permitividad relativa.
- KK = Constante eléctrica = $\frac{9 \times 10^9}{K}$ = 9×10^9
- LL = Largo de la placa.
- HH = Ancho de la placa.
- A = Largo de la placa * Ancho de la placa.
- DV = Diferencia de material.
- D = Separación de placas.
- σ (densidad) = $\frac{DV}{4\pi KKd}$

Cálculo del campo eléctrico.

Campo eléctrico $E = (Ex, Ey, Ez)$ en el punto $x1, y1, z1$ en una placa rectangular cargada uniformemente con densidad de carga superficial σ .

- $E1(x1, y1, z1)$: Contribución de la primera distribución de carga.
- $E2(x1, y1, z1)$: Contribución de la segunda distribución, reflejada en z .
- $Et = E1 + E2$: Se suma la contribución de ambos campos.

Cada función representa un componente del campo eléctrico debido a una distribución de carga superficial sobre un rectángulo desde $x = -LL$ a LL e $y = -HH$ a HH a una altura $z = 0$.

$E1x[x1, y1, z1]$:

$$E2x = ke\sigma \int_{-LL}^{LL} \int_{-hh}^{hh} \frac{x - x1}{[(x1 - x)^2 + (y1 - y)^2 + (d - z1)^2]^{3/2}} dx dy$$

Esta es la forma integral de la ley de Coulomb para el componente x.

$E2y[x1, y1, z1]$

$$E2y = ke\sigma \int_{-LL}^{LL} \int_{-hh}^{hh} \frac{y - y1}{[(x1 - x)^2 + (y1 - y)^2 + (d - z1)^2]^{3/2}} dx dy$$

Esto calcula el componente y del campo eléctrico.

$E2z[x1, y1, z1]$

$$E2z = ke\sigma \int_{-LL}^{LL} \int_{-hh}^{hh} \frac{z - z1}{[(x1 - x)^2 + (y1 - y)^2 + (d - z1)^2]^{3/2}} dx dy$$

- Esto calcula el componente Z del campo eléctrico.

1. Cálculo de la Magnitud del Campo:

- Se usa la norma $|Et| = \sqrt{E_{tx}^2 + E_{ty}^2 + E_{tz}^2}$

Visualización de campo eléctrico:

- *ContourPlot*: Muestra el mapa de contornos de $|Et|$
- *StreamPlot*: Representa las líneas de flujo del campo eléctrico en los planos xz e yz

ANEXO 4: Propiedades mecánicas de los *scaffolds*.

Se extrajeron pares de puntos (x,y) de la región inicial (0 – 0.3 mm de estiramiento) donde se espera la respuesta elástica lineal.

- Eje X = Estiramiento (mm)
- Eje Y = Fuerza (N)

2. **Calcular pendiente $F/\Delta L$** → rigidez de la muestra (N/mm).

3. **Convertir a módulo de Young (E):**

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{f/A}{\Delta L/L_0} = \frac{F \cdot L_0}{A \cdot \Delta L}$$

donde:

- $\Delta L \approx 40$ mm (longitud inicial que me diste antes).
- $A = b \cdot h = 20 \text{ mm} \times 1,7 \text{ mm} = 34 \text{ mm}^2$.

→ Área en m^2 $A = 34 \times 10^{-6} \text{ m}^2$

→ Longitud inicial en m: $L_0 = 0,04 \text{ m}$

Ciclo 0 (negro):

Entre 0.1 y 0.3 mm, la pendiente $0,8 \frac{\text{N}}{0,2 \text{ mm}} = 4.0 \text{ N/mm}$

$$E \approx 4.0 \times 0.04 \times 10^{-6} \approx 4.7 \text{ MPa}$$

Ciclo 5 (verde):

Pendiente $0.4 \frac{\text{N}}{0.2 \text{ mm}} = 2.0 \text{ N/mm}$

$$E = 2.0 \times 0.04 \times 10^{-6} = 2.35 \text{ MPa}$$

Ciclo 15 (morado):

Pendiente $0.25 \text{ N}/0.2 \text{ mm} = 1.25 \text{ N/mm}$

$$E = 1.25 \times 0.04 \times 10^{-6} = 1.4 \text{ MPa}$$

Ciclo 30 (naranja):

Pendiente más alta al inicio $0,7\text{ N}/0,2\text{ mm} = 3,5\text{ N/mm}$

$$E \approx 3.5 \times 0.04 \times 10^{-6} \approx 4.12\text{ MPa}$$

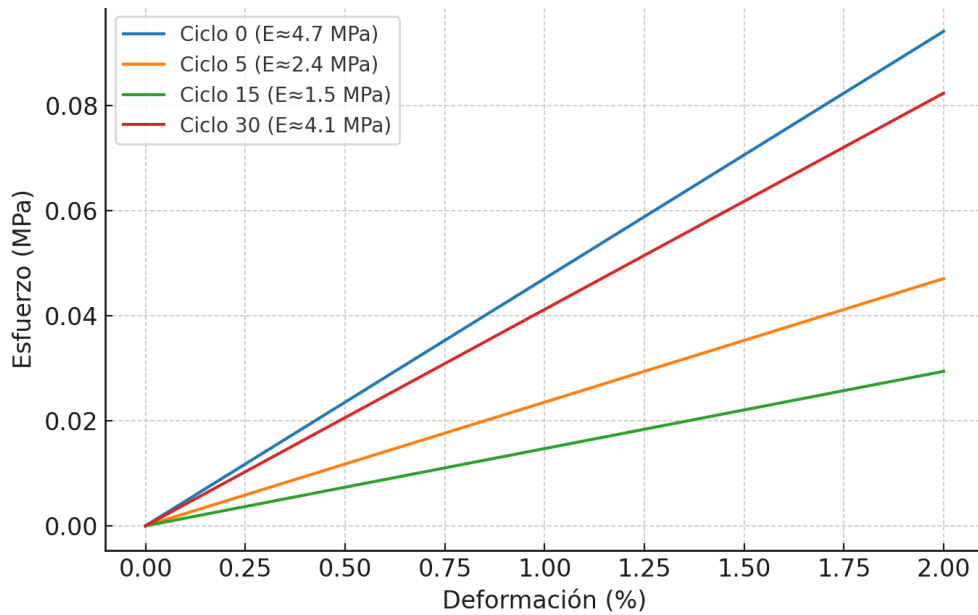


Figura 35: Curvas esfuerzo–deformación de *scaffolds* de celulosa bacteriana sometidas a distintos números de ciclos de estiramiento mecánico.

11. FINANCIAMIENTOS

2024 – 2. Beca Postgrado USM. Doctorado en Biotecnología.

2024 – 1. Beca de manutención y arancel Postgrado de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (PUCV). Doctorado en Biotecnología.

2024. Beca Pasantía Ciencia 2030. Tecnológico de Costa Rica.

2023. Beca de pasantía. UNU-BIOLAC: United Nations University, Japón. Programme for Biotechnology in Latin America and the Caribbean, Centro de Investigaciones Biológicas Clemente Estable en Uruguay.

2022-2023. Beca de Doctorado Nacional de la Agencia Nacional de Investigación (ANID), y Extensión Beca COVID-19.

2021. Proyecto Fondecyt Regular.

2019-2021. Beca de manutención y arancel Postgrado Universidad Técnico Federico Santa María. Doctorado en Biotecnología.

12. PRODUCTOS

Congresos nacionales.

2025. Escuela de Nanoestructura. Universidad Técnica Federico Santa María. Valparaíso, Chile. Presentación póster.

2023. III Congreso de Ingeniería de Tejidos en Medicina regenerativa (ITMR 2023). Universidad Técnica Federico Santa María. Valparaíso, Chile. Presentación póster. ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas ISSN: 0719-1855.

2022. Congreso de la sociedad Chilena de Microbiología (SOMICH 2022). La Serena, Chile. Presentación póster

2022. Congreso de la Sociedad Chilena de Física. (SOCHIF 2022). Presentación póster.

2021. II Congreso de Ingeniería de Tejidos y Medicina regenerativa. (ITMR 2021). Universidad de Chile, online. Presentación oratoria.

Congresos Internacionales.

2023. III Congreso Latinoamericano de Ecología Microbiana (ISME-Lat 2023). Universidad de Quilmes, Argentina. Presentación póster

Pasantías.

2024. Tecnológico de Costa Rica. Laboratorio de Economía Circular.

2023. Instituto de Investigaciones Clemente Estable Uruguay. Laboratorio de Biofilm

Divulgación científica.

2020 - 2021. Coordinador del podcast “Dimensión Portal” del Portal de Biomedicina UC. Patrocinado por la Universidad Católica de Chile, INJUV Chile y Ciencia Pública de ANID. Divulgación y divulgación científica.

2021. Programa INJUV.

2021. Biotech Day. Universidad Tecnológica de Metropolitana. Presentación de Oratoria.