



FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA BIOMÉDICA E INSTRUMENTACIÓN

**“GENERACIÓN DE PLATAFORMAS FOTOSINTÉTICAS BASADAS EN LA
INCORPORACIÓN DE SISTEMAS VEGETALES, COMO ESTRATEGIA PARA
PROMOVER LA OXIGENACIÓN LOCALIZADA, EN ENSAYOS *IN VITRO*”**

Proyecto final de graduación presentado como requisito para optar por el título de
Licenciatura en Ingeniería Biomédica e Instrumentación en la Universidad Latina
de Panamá

Getsie Jinelle Sayas De La Rosa
C.I.P.: 8-1001-2479

Director de Tesis:
Diego Alejandro Reginensi Espinoza, PhD.

Asesor Metodológico:
Alfredo Enrique Lescher Soto, Mgtr.

Panamá, República de Panamá
2026

Dedicado a mi madre, por ser mi apoyo incondicional, y a mi padre, por su cariño infinito. Este trabajo es, primero, fruto de sus esfuerzos.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme llegar y concluir esta etapa de mi vida, por guiarme y darme la sabiduría necesaria para atravesar este camino. A mi madre, Ernestina De La Rosa, por ser mi compañera de aventuras, por sus enseñanzas y cada consejo, por siempre ser mi guardiana. A mi padre, Osman A. Sayas, por sus palabras de aliento en mis días malos, por recordarme mi fortaleza, por todo su cariño. A mi sobrino mayor, Alessandro A. Ábrego, porque su natural curiosidad por el mundo me inspiró a no perder la mía.

Le agradezco a mi compañero de vida, Mario E. Méndez, por permitirme tener un lugar donde siempre pudiera sentirme escuchada, por no dejarme decepcionar a esa versión que me planteé ser, por acompañarme a pesar de su cansancio. Agradezco a mis compañeras de laboratorio, a quienes con mucho orgullo puedo llamar amistades, por darme un espacio de trabajo en armonía y con muchas risas, a pesar del estrés constante. Por escuchar los problemas, por su tiempo, por apoyarme a la medida de sus capacidades y hacer este proceso más llevadero.

A mi asesor, PhD. Diego A. Reginensi E., por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, por creer en mi potencial, por cada momento de crecimiento académico, por permitirme equivocarme y aprender de mis errores, por ayudarme a forjar mi carácter. Al PhD. Luis Luis, cuyos consejos me continúan guiando a crecer como profesional y como persona, le agradezco por todo el tiempo dedicado a ayudarme a sacar adelante mis actividades durante este proceso. También, al Mgtr. Alfredo Lescher por orientarme y brindarme su apoyo académico durante mi formación.

Finalmente, agradezco a mi institución académica, la Universidad Latina de Panamá, por proporcionarme las herramientas conceptuales que sentaron las bases que hicieron posible este trabajo. Asimismo, al Laboratorio de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa de la Facultad de Biociencias y Salud Pública de la Universidad Especializada de las Américas, por abrirme sus puertas y acogerme durante años en su espacio de trabajo, por brindarme los recursos para aprender y desarrollar mis actividades experimentales con libertad.

Resumen de la investigación

La hipoxia localizada constituye uno de los principales factores que limitan la regeneración tisular en heridas crónicas y defectos cutáneos extensos, al generar un microambiente con disponibilidad insuficiente de oxígeno capaz de afectar procesos fundamentales como la proliferación celular y la síntesis de matriz extracelular. Ante esta problemática, el desarrollo de sistemas capaces de generar oxígeno de forma localizada y controlada ha adquirido creciente interés en el ámbito de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa, impulsando el surgimiento de nuevas estrategias.

La presente investigación describe el desarrollo de plataformas fotosintéticas basadas en matrices de hojas descelularizadas, protectoras, de hidrogeles de *Chlorella vulgaris*, así como de sistemas que integran unidades fotosintéticas funcionales capaces de generar oxígeno *in vitro* bajo condiciones controladas de iluminación. Se obtuvieron andamios en los que hojas descelularizadas recubren por completo los hidrogeles fotosintéticos y son capaces de liberar oxígeno a altas concentraciones (>52.3) bajo luz constante durante un periodo prolongado. Paralelamente, se aislaron cloroplastos a partir de *Spinacia oleracea*, evaluando su estabilidad y capacidad fotosintética mediante mediciones de oxígeno disuelto. Los cloroplastos estabilizados con glutaraldehído mostraron mayor estabilidad funcional y niveles superiores de liberación de oxígeno (≈36%) en comparación con otras condiciones, no obstante, su comportamiento no llega a superar los resultados registrados para el sistema en base a microalgas suspendidas (40.41%). En conjunto, los resultados demuestran la viabilidad de ambos sistemas fotosintéticos como plataformas para la generación localizada de oxígeno, con potencial de aplicación en la ingeniería tisular y la biomedicina regenerativa.

Palabras clave – oxigenación, fotosíntesis, hidrogeles bioactivos, cloroplastos, descelularización, biomateriales a base de plantas.

Abstract

Localized hypoxia constitutes one of the main factors limiting tissue regeneration in chronic wounds and extensive cutaneous defects, as it creates a microenvironment with insufficient oxygen availability capable of affecting fundamental processes such as cell proliferation and extracellular matrix synthesis. In response to this challenge, the development of systems capable of generating oxygen in a localized and controlled manner has gained increasing interest in the fields of tissue engineering and regenerative medicine, driving the emergence of new strategies.

The present study describes the development of photosynthetic platforms based on protective decellularized leaf matrices and *Chlorella vulgaris* hydrogels, as well as systems integrating functional photosynthetic units capable of generating oxygen *in vitro* under controlled lighting conditions. Scaffolds were obtained by the integration of decellularized leaves that completely covered the photosynthetic hydrogels, which were able to release oxygen at high concentrations (>52.3) under constant light over a prolonged period. In parallel, chloroplasts were isolated from *Spinacia oleracea*, and their stability and photosynthetic capacity were evaluated through dissolved oxygen measurements. Chloroplasts stabilized with glutaraldehyde exhibited greater functional stability and higher oxygen release levels ($\approx 36\%$) compared to other conditions; however, their performance did not surpass the results recorded for the suspended microalgae-based system (40.41%). Overall, the results demonstrate the feasibility of both photosynthetic systems as platforms for localized oxygen generation, with potential applications in tissue engineering and regenerative biomedicine.

Keywords – oxygenation, photosynthesis, bioactive hydrogels, chloroplasts, decellularization, plant-based biomaterials.

Índice general

AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN DE LA INVESTIGACIÓN.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÍNDICE GENERAL.....	VI
ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
INTRODUCCIÓN	XII
1. CAPÍTULO 1: EL PROBLEMA.	14
1.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.	14
1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
1.3. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	28
1.4. OBJETIVOS	31
1.5. ALCANCE Y LÍMITES DE LA PROPUESTA.....	32
1.6. LÍNEA DE INVESTIGACIÓN	32
2. CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	34
2.1. ANTECEDENTES DE INVESTIGACIONES REALIZADAS EN EL TEMA	34
2.2. BASES TEÓRICAS QUE SUSTENTAN LA INVESTIGACIÓN	38
2.3. TECNOLOGÍAS DISPONIBLES EN EL MERCADO ASOCIADAS A LA INVESTIGACIÓN.....	60
2.4. TABLA DE PATENTES.....	62
2.5. VARIABLES	63
2.6. GLOSARIO DE TÉRMINOS	65

3. CAPÍTULO 3: MARCO METODOLÓGICO	68
3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	68
3.2. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	70
3.3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN POR RESOLVER	70
3.4. TÉCNICAS APLICADAS	71
3.5. MATERIALES Y HERRAMIENTAS UTILIZADAS.....	72
3.6. METODOLOGÍA	73
3.7. SEGUIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.....	92
3.8. RIESGOS	93
 4. CAPÍTULO 4: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	 96
4.1. RESULTADOS:	96
4.2. DISCUSIÓN	121
 CONCLUSIONES	 129
 RECOMENDACIONES Y PROYECCIÓN A FUTURO.....	 130
 REFERENCIAS.....	 133

Índice de cuadros y gráficas

Gráfica 1. Variación porcentual de la mortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) en Panamá en las últimas décadas.	22
Gráfica 2. Incidencias de comorbilidad por condiciones de la piel y tejidos subcutáneos, en la República de Panamá.	26
Gráfica 3. Distribución del desarrollo de la región en lesiones cutáneas en el periodo del 2018-2024.	29
Gráfica 4. Medición de oxígeno en el tiempo detectado en muestras de cloroplastos extraídos.....	97
Gráfica 5. Mediciones de liberación de oxígeno de cloroplastos estabilizados en suspensión A y suspensión B.	101
Gráfica 6. Mediciones de liberación de oxígeno de microalgas suspendidas.....	102
Gráfica 7. Crecimiento de microalgas de la especie <i>Chlorella vulgaris</i>	105
Gráfica 8. Variación en relación de hinchamiento a las 24 horas de los hidrogeles oxigenantes y control.	108
Gráfica 9. Representación de la liberación de oxígeno registrada en hidrogeles con microalgas.....	110
Gráfica 10. Valores máximos obtenidos en muestras de hojas tropicales a partir de ensayos de tracción.	115
Gráfica 11. Representación del comportamiento de las muestras durante un ensayo de tracción.....	115
Gráfica 12. Representación de los resultados dimensionales de las muestras nativas y descelularizadas.....	115
Gráfica 13. Descripción del comportamiento de plataformas de “Tamal oxigénico”	119

Índice de tablas

Tabla 1. Listado de enfermedades de la piel causadas o agravadas por hipoxia .	17
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos de vendaje de heridas, utilizados en Panamá.....	25
Tabla 3. Investigaciones científicas relacionadas al proyecto	35
Tabla 4. Estado del arte en estabilización de cloroplastos y tilacoides aislados ...	43
Tabla 5. Estado del arte en hidrogeles fotosintéticos	50
Tabla 6. Estado del arte en andamios vegetales descelularizados	57
Tabla 7. Estudios clínicos asociados a las tecnologías de oxigenación disponibles en el mercado para uso hospitalario en tratamientos cutáneos	61
Tabla 8. Patentes asociadas al proyecto.....	62
Tabla 9. Definición conceptual de variables de la investigación.....	63
Tabla 10. Indicadores de desempeño de variables.....	64
Tabla 11. Riesgos asociados a la investigación	93
Tabla 12. Valores registrados durante el ensayo de hinchamiento para hidrogeles con microalgas	156
Tabla 13. Valores registrados durante el ensayo de hinchamiento para hidrogeles control	157
Tabla 14. Cambio registrado en las dimensiones de los hidrogeles durante el ensayo de hinchamiento	158

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama representativo del transporte de oxígeno (O ₂) en el cuerpo humano. Creado con BioRender.	14
Figura 2. Diagrama representativo del efecto de la hipoxia. Creado con BioRender.	16
Figura 3. Diagrama representativo de un bajo flujo de oxígeno (O ₂) hacia las células de un tejido en cicatrización. Creado con BioRender.	16
Figura 4. Diagrama representativo de hidrogeles oxigenantes. Creado con BioRender.	20
Figura 5. Representación de la estructura de los cloroplastos. Creado con BioRender.	39
Figura 6. Proceso simplificado de la descelularización de hojas. Creado con BioRender.	52
Figura 7. Protocolo de extracción de cloroplastos a partir de hojas de espinaca. Creado con BioRender.	73
Figura 8. Diagrama general del uso del sistema PreSens SDR para la medición de la liberación de oxígeno en cloroplastos aislados. Creado con BioRender.	76
Figura 9. Diagrama general del uso del sistema PreSens SDR para la medición de la liberación de oxígeno en cloroplastos estabilizados. Creado con BioRender.	78
Figura 10. Diagrama general del uso del sistema PreSens SDR para la medición de la liberación de oxígeno en microalgas. Creado con BioRender.	79
Figura 11. Representación del protocolo de cultivo de <i>C. vulgaris</i> . Creado con BioRender.	80
Figura 12. Representación detallada del proceso de cuantificación manual. Creado con BioRender.	81
Figura 13. Proceso de elaboración de hidrogel con alginato de sodio y microalgas de <i>Chlorella vulgaris</i> , con gasa como estructura interna. Creado con BioRender.	82
Figura 14. Diagrama protocolar de ensayo de hinchamiento. Creado con BioRender.	83
Figura 15. Diagrama representativo del proceso de medición de oxígeno. Creado con BioRender.	84
Figura 16. Protocolo de descelularización de hojas de banana y bijao. Creado con BioRender.	85
Figura 17. Proceso de fijación de muestras de hoja para SEM. Creado con BioRender.	86
Figura 18. Protocolo de ensayo mecánico de tracción. Creado con BioRender.	87
Figura 19. Protocolo de análisis de espesor. Creado con BioRender.	87
Figura 20. Protocolo de amarre de tamal oxigénico. Creado con BioRender.	89
Figura 21. Protocolo de medición de oxígeno liberado por tamales oxigénicos. Creado con BioRender.	91
Figura 22. Proceso de extracción de cloroplastos a partir de hojas de espinaca.	96
Figura 23. Microscopía en campo claro de cloroplastos extraídos y estabilizados en suspensiones	98

Figura 24. Visualización microscópica de cloroplastos en suspensión libre por fluorescencia.	99
Figura 25. Visualización microscópica de cloroplastos en suspensión de estabilización por fluorescencia.....	99
Figura 26. Fotografía microscópica representativa del crecimiento de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i>	103
Figura 27. Fotografía microscópica representativa del crecimiento de un subcultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	103
Figura 28. Hidrogeles con alginato de sodio polimerizado.	107
Figura 29. Evolución en macrofotografía de muestras durante el proceso de descelularización en hojas	111
Figura 30. Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una hoja tropical nativa y descelularizada.....	113
Figura 31. Determinación manual de tamaño de estomas por ImageJ.	113
Figura 32. Proceso de elaboración de plataforma tipo “tamal oxigénico”.	117
Figura 33. Variación en anudados aplicados para el cierre de plataforma tipo “tamal oxigénico”	117
Figura 34. Registro de dimensiones en muestras previo y posterior al ensayo de hinchamiento	158
Figura 35. Etapas de montaje de muestras de tamal oxigénico para medición en sistema PreSens.	159
Figura 36. Diagrama de conexión de sistema de medición PreSens SDR y método utilizado para mediciones.	160

Introducción

La hipoxia localizada constituye una de las principales limitaciones en los procesos de regeneración de tejidos, particularmente en lesiones cutáneas extensas en pacientes con enfermedades crónicas, donde la reducida disponibilidad de oxígeno durante periodos prolongados compromete funciones celulares esenciales para la reparación tisular, convirtiéndose en un desafío persistente dentro de la medicina regenerativa. Ante esta problemática, el desarrollo de plataformas capaces de generar oxígeno de manera sostenida y localizada ha adquirido creciente relevancia. En este contexto, los sistemas fotosintéticos representan una aproximación innovadora debido a su capacidad natural de producir oxígeno bajo condiciones controladas de iluminación. No obstante, la implementación biomédica de estos sistemas enfrenta limitaciones relacionadas con la conservación de su funcionalidad biológica y estabilidad estructural durante periodos prolongados.

En función de lo anterior, el presente estudio sostiene como objetivo evaluar la funcionalidad de sistemas fotosintéticos para el desarrollo de plataformas capaces de generar oxígeno tras su integración en matrices vegetales descelularizadas, empleadas como estructuras de soporte y protección para favorecer su estabilidad sin comprometer su capacidad de generación de oxígeno. Para ello, se desarrollaron protocolos de aislamiento de cloroplastos de *Spinacia oleracea*, seleccionada como fuente de estos organelos debido a su abundancia en el tejido foliar y a la disponibilidad de protocolos para su extracción (Jang et al. 2024), y se evaluó su comportamiento en comparación con suspensiones de *Chlorella vulgaris*, una microalga con alta capacidad de generación de oxígeno y rápido crecimiento (Cui et al., 2025). Asimismo, se desarrollaron metodologías para la elaboración y caracterización de estas plataformas orientadas a preservar sus propiedades estructurales y funcionales, mediante mediciones de la presión parcial de oxígeno disuelto (pO_2), equivalentes al porcentaje de oxígeno presente en el medio. En conjunto, este estudio busca contribuir al desarrollo de plataformas fotosintéticas con potencial aplicación en ingeniería tisular y medicina regenerativa, resaltando la importancia de optimizar las metodologías de aislamiento y estabilización de sistemas fotosintéticos para futuras aplicaciones biomédicas.

CAPÍTULO 1

EL PROBLEMA

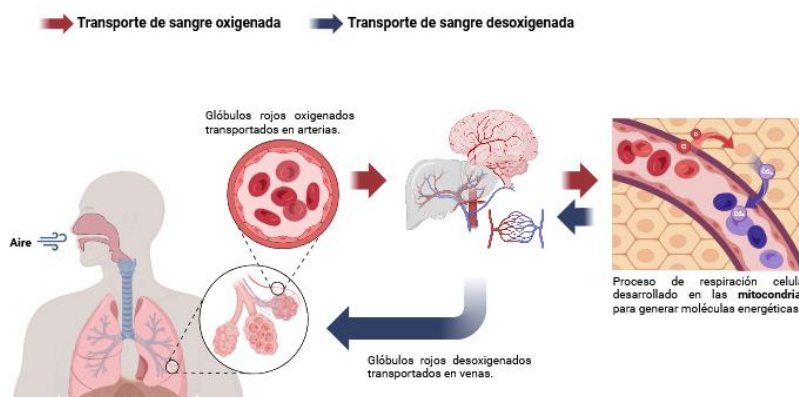
1. CAPÍTULO 1: EL PROBLEMA.

1.1. Antecedentes de la investigación.

1.1.1. Importancia fisiológica del oxígeno

La oxigenación, acción directa de las moléculas de oxígeno en la síntesis y degradación de compuestos orgánicos (Morales Cudello, 2003), se ha consolidado como un proceso indispensable para el funcionamiento de todos los organismos celulares complejos. Este mecanismo biológico, descrito gráficamente en la siguiente figura (**Figura 1**), es integrado a través de un sistema de transporte multipropósito dirigido hacia las unidades intracelulares generadoras de energía, denominadas mitocondrias (Gutierrez, 1988; Hilty & Jung, 2023; Krzywinska & Stockmann, 2018). De forma específica, las células desarrollan un proceso de respiración basado en una serie de reacciones que permiten la obtención de energía a través de la degradación de glucosa (Gyamfi & Danquah, 2016; Quesada Núñez, 2011). La complejidad del proceso requiere la integración de una variedad de sistemas (Van Sint Jan D et al., 2024), lo que implica múltiples factores que deben contribuir a la homeostasis propia de un cuerpo sano. No obstante, es conocido que este proceso puede verse comprometido ante condiciones fisiológicas a nivel sistemático (Quesada Núñez, 2011; Van Sint Jan D et al., 2024), cuyas consecuencias se ven reflejadas directamente en subniveles orgánicos, tisulares o celulares, resultando regularmente en la generación de condiciones hipoxémicas, hipóxicas e, inclusive, anóxicas en estos entornos, reflejándose en complicaciones fisiológicas (Hilty & Jung, 2023; Krzywinska & Stockmann, 2018).

Figura 1. Diagrama representativo del transporte de oxígeno (O₂) en el cuerpo humano. Creado con BioRender.



1.1.2. Efectos del déficit de oxígeno en el organismo

La disminución de la disponibilidad de oxígeno para las células de un organismo genera alteraciones en su funcionamiento. Dichas alteraciones pueden manifestarse como condiciones de hipoxemia e hipoxia, ambas capaces de comprometer el equilibrio fisiológico y limitar la respuesta de los tejidos ante procesos patológicos o de regeneración. En esta sección se abordan los principales efectos asociados al déficit de oxígeno en el cuerpo humano.

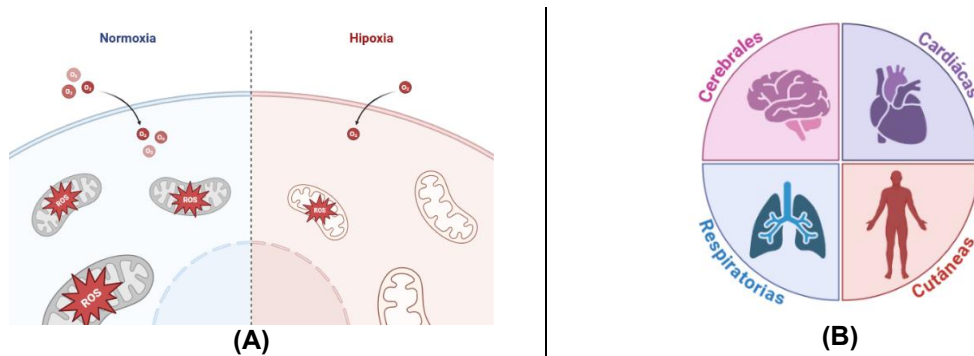
1.1.2.1. Hipoxemia

La hipoxemia se define como la disminución de la presión parcial de oxígeno presente en la sangre (Sarkar et al., 2017), generalmente a causa de problemas en el sistema respiratorio o en el flujo sanguíneo, encargado de distribuir la molécula hacia los tejidos del cuerpo (Mayo, 2023; Sarkar et al., 2017). Esta condición incrementa el gasto cardíaco, pero disminuye el consumo de oxígeno mitocondrial; ambos factores se han relacionado al aumento de pacientes internados por problemas respiratorios (de Jonge et al., 2008; Eastwood et al., 2012), así como con la aparición de otras condiciones (Hochberg et al., 2021; Schjørring et al., 2020).

1.1.2.2. Hipoxia

La hipoxia se define como una condición biológica caracterizada por un nivel de oxígeno insuficiente en los tejidos y células del cuerpo, lo que imposibilita la conservación del estado de homeostasis del organismo (**Figura 2 – A**) (Bhutta et al., 2025; Ratcliffe & Semenza, 2025). Comúnmente, se manifiesta a causa de problemáticas fisiológicas existentes a nivel sistemático (Bhutta et al., 2025; Gutierrez, 1988) como una respuesta ante una afección circulatoria o bajas concentraciones de oxígeno en sangre (Bhutta et al., 2025), resultando en un estado de inanición celular que imposibilita su proliferación (Hilty & Jung, 2023; Morales Cudello, 2003; Zoneff et al., 2024). Además, similar a otras condiciones de oxigenación, la hipoxia genera numerosas modificaciones fisiológicas y la redistribución del flujo sanguíneo hacia los órganos con necesidades metabólicas aumentadas (Somers et al., 1989), generando un entorno promotor de enfermedades. Con la finalidad de complementar este punto, a continuación, se describen algunas de las categorías de estas afecciones (**Figura 2 – B**).

Figura 2. Diagrama representativo del efecto de la hipoxia. Creado con BioRender

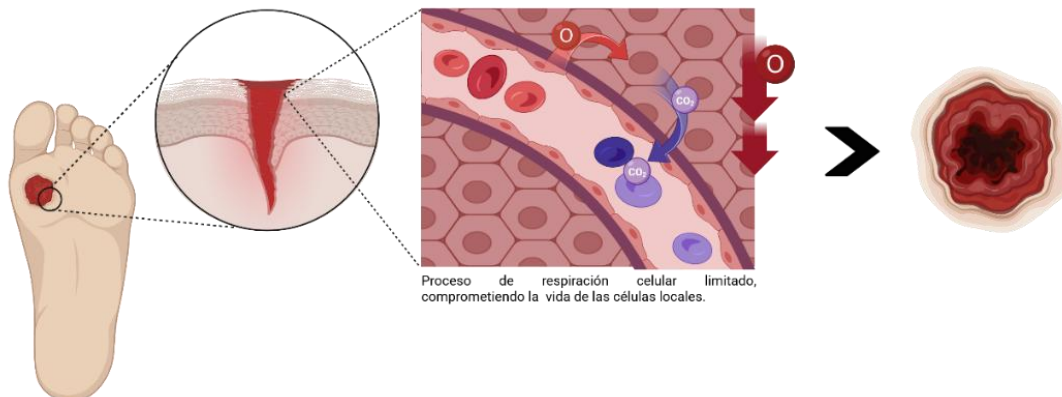


Nota: (A) diagrama de comparación de la absorción de oxígeno en células en estado de normoxia e hipoxia, (B) diagrama de categorías de enfermedades producidas como resultado de un estado de hipoxia.

1.1.2.3. Enfermedades cutáneas agravadas por hipoxia

La piel, órgano altamente vascularizado (Catrina & Zheng, 2021; Sen, 2009), se caracteriza por su constante necesidad de un suministro efectivo de oxígeno que permita conservar su integridad estructural, mantener sus cualidades inmunológicas y regulatorias (Sen, 2009), así como permitir su regeneración tisular en caso de lesiones (Bai et al., 2022). En términos de la cicatrización dérmica de pacientes con sistemas regulatorios clínicamente comprometidos, la hipoxia altera el funcionamiento de las células encargadas de limitar los efectos adversos que puedan surgir a partir de una lesión cutánea inicialmente considerada como insignificante (Catrina & Zheng, 2021; Gutierrez, 1988; Yun et al., 2010).

Figura 3. Diagrama representativo de un bajo flujo de oxígeno (O_2) hacia las células de un tejido en cicatrización. Creado con BioRender.



Durante las fases tempranas de la cicatrización, los niveles de oxígeno en el área de la herida suelen ser bajos, lo que puede ralentizar los procesos de proliferación celular y contribuir a una cicatrización ineficaz o retrasada (Jiang et al., 2024; Maharjan et al., 2022). Tomando esto en consideración, la presencia de hipoxia en heridas crónicas o de gran profundidad, como quemaduras o úlceras diabéticas, altera los mecanismos de perfusión sanguínea, lo que limita el suministro directo de nutrientes al área afectada (Bai et al., 2022; Jiang et al., 2024; Rahane et al., 2024). Como consecuencia, el tratamiento de lesiones en la piel tiende a resultar en cicatrices anormales, procesos de curación lentos, mayor propensión a infecciones bacterianas, muerte celular (**Figura 3**) o derivación a enfermedades que comprometen en gran medida la calidad de vida del paciente (Bai et al., 2022; Chávez et al., 2020; Li & Jackson, 2002; Maharjan et al., 2022). Asimismo, aun en pacientes clínicamente no comprometidos, las enfermedades cutáneas pueden surgir o ser agravadas ante la presencia de hipoxia; un resumen de las condiciones más comunes es descrito en la tabla (**Tabla 1**).

Tabla 1. Listado de enfermedades de la piel causadas o agravadas por hipoxia	
Condición	Descripción
Úlceras	Lesiones o heridas producidas por la disminución de la perfusión sanguínea, principalmente como consecuencia de un déficit de presión parcial de oxígeno en los tejidos distales (Serrano Moreno, 2023). Las escaras, un tipo de úlcera, son lesiones isquémicas tisulares por la aplicación prolongada de presión extrema resultante en la reducción crítica del flujo sanguíneo causando daño celular desde el interior hacia la superficie de la piel (Chaput et al., 2023; Serrano Moreno, 2023).
Livedo reticular	Manifestación cutánea que se presenta como una red reticulada de coloración violácea a causa de la vasoconstricción excesiva o que reduce la oxigenación local (Sajjan et al., 2015). En la mayoría de los casos se considera un desorden benigno, no obstante, posee una variante patológica que afecta la viabilidad de los anticuerpos (Usanma Koban & Coşgun Tahsildaroğlu, 2023).
Necrosis	La muerte celular descontrolada, resultante de un hinchamiento en los organelos intracelulares, ruptura plasmática o lisis, ante una lesión, infección o falta de oxigenación en la circulación (Khalid & Azimpouran, 2025). Por su parte, las gangrenas son un tipo extenso de necrosis asociado a infección, isquemia o trauma severo, comúnmente relacionado a patologías que comprometen el flujo sanguíneo (Chennamsetty et al., 2015; Leslie & Foreman, 2025)

1.1.3. Estrategias aplicadas para la oxigenación cutánea

Frente a las alteraciones asociadas con una insuficiente disponibilidad de oxígeno en los tejidos cutáneos, se han desarrollado diversas estrategias orientadas a favorecer la oxigenación y promover la reparación tisular. Estas alternativas comprenden desde métodos convencionales que incrementan el suministro sistémico de oxígeno hasta estrategias emergentes que buscan suministrar o generar oxígeno de manera localizada mediante el uso de hidrogeles. A continuación, se describen las principales características de estas estrategias.

1.1.3.1. Oxigenoterapia de alto flujo

Se reconoce como una medida de soporte vital indicada en todo paciente que se encuentre en estado crítico, sosteniendo el objetivo de garantizar las necesidades de oxígeno de los tejidos (Bugarín & Martínez, 2000) al revertir estados o el surgimiento de hipoxia tisular (Tarpy & Celli, 1995), a través de la administración del gas en concentraciones por encima de la ambiental (Regueira & Andresen, 2010) aumentando la proporción de oxígeno disponible en los alveolos (Tarpy & Celli, 1995). Esta estrategia se aplica posterior a la determinación de una presión parcial de oxígeno menor a 60 mmHg para prevenir la hipoxia (Pírez et al., 2020).

1.1.3.2. Oxigenoterapia por cámara hiperbárica

La ventilación por presión negativa, principio detrás de las cámaras hiperbáricas, crea una diferencia de presión entre la cavidad intratorácica y el ambiente, lo que permite la entrada de aire en los pulmones (López-Herce & Carrillo, 2008; Lucero Ortega & Ortega, 2022). La terapia de oxigenación hiperbárica moderna, si bien menos utilizada en la actualidad, consiste en respirar altas concentraciones de oxígeno presurizado a más de una atmósfera, con la finalidad de generar un ambiente de hiperoxia y aumentar la generación de especies reactivas de oxígeno (Gill & Bell, 2004; Teguh et al., 2021). Este tipo de gas hiperbático provee una respuesta fisiológica que genera, entre otras reacciones, un efecto antiinflamatorio, síntesis de colágeno, y contribuye a la cicatrización de heridas crónicas, por esto se considera una de las principales aplicaciones terapéuticas (Berner et al., 2014; Emilia & Jordá-Vargas, 2021; Lucero Ortega & Ortega, 2022; Teguh et al., 2021).

1.1.3.3. Oxigenación asistida por ozonoterapia

La ozonoterapia, a pesar de ser una técnica de tratamiento adjunta, es un método de oxigenación útil a nivel sistémico (Chirumbolo et al., 2023; Clavo et al., 2004). Se basa en la administración de ozono por auto hemoterapia, es decir, en la infusión de sangre alterada con una mezcla balanceada de oxígeno y ozono (Chirumbolo et al., 2023; Clavo et al., 2004; Yanchu et al., 2023). Si bien este tipo de gases tiende a ser asociado con la reducción de la saturación de oxígeno, artículos en la literatura resaltan su utilidad como técnica terapéutica (Clavo et al., 2004; Hua et al., 2025).

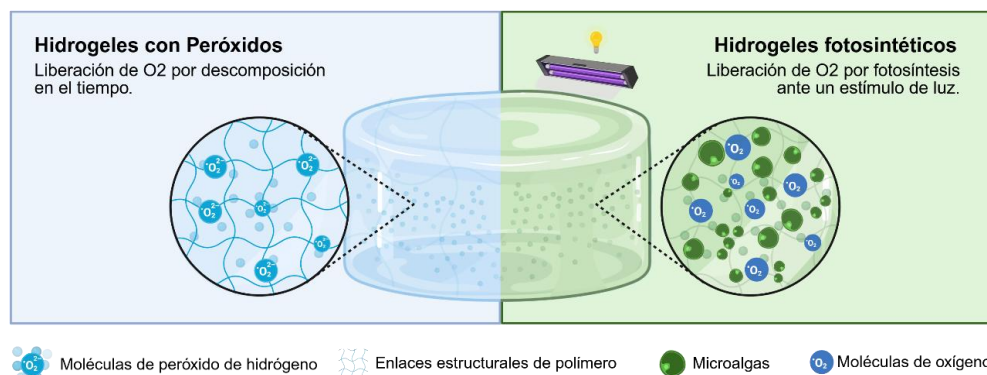
1.1.3.4. Hidrogeles transportadores de oxígeno

Los métodos de oxigenación localizada se basan principalmente en el uso de hidrogeles cargados con hemoglobina y perfluorocarbonos. La primera de estas estrategias aplica el transportador biológico de oxígeno en sangre, con el fin de aprovechar su capacidad para capturar la molécula en un entorno con alta concentración y transportarla hasta una región cercana al área de aplicación (L. Chen et al., 2023; Jiang et al., 2024). No obstante, la practicidad detrás de la implementación de la hemoglobina como un transportador de oxígeno se ha identificado como un reto dada su inestabilidad, grado de permeabilidad en biopolímeros comunes y los límites asociados a su adquisición de fuentes humanas, al existir un alto grado de toxicidad asociado al uso de hemoglobina derivada de otras especies (Grzegorzewski et al., 2025; Jiang et al., 2024).

Por otra parte, las moléculas inertes de perfluorocarbono han destacado en la oxigenación localizada dada su capacidad de dilución de gases, incluyendo dióxido de carbono y oxígeno, una vez tratadas por emulsificación con fosfolípidos y encapsuladas en hidrogeles que faciliten su interacción con el cuerpo humano (Jiang et al., 2024; Kim et al., 2024; M. Zhao et al., 2024). La liberación de oxígeno en estos sistemas se basa en la diferencia de concentraciones existentes en el medio, de manera que se busca un equilibrio proporcional a la presión parcial del gas a una temperatura específica, permitiendo que la rápida liberación se vea limitada a los medios donde sea necesario; pero su uso clínico no es generalizado dada la varianza identificada entre potenciales riesgos y beneficios, por paciente (L. Chen et al., 2023; Jiang et al., 2024).

1.1.3.5. Hidrogeles generadores de oxígeno.

Figura 4. Diagrama representativo de hidrogeles oxigenantes. Creado con BioRender.



La naturaleza y el funcionamiento de los peróxidos inorgánicos, capaces de liberar oxígeno en pequeñas o grandes cantidades de manera espontánea, han destacado como un método eficaz para la oxigenación del organismo (Camci-Unal et al., 2013; Maharjan et al., 2022). Comúnmente, los sistemas de este tipo incluyen materiales inorgánicos como el per-carbonato de sodio, peróxido de sodio o de magnesio que, a través de reacciones químicas, conlleva a la liberación de peróxido de hidrógeno, por lo que frecuentemente se ha utilizado directamente este compuesto como un método de liberación de oxígeno, integrado dentro de hidrogeles elaborados a base de biopolímeros (Camci-Unal et al., 2013; Jiang et al., 2024; Maharjan et al., 2022).

Otra alternativa para la generación de oxígeno en hidrogeles se basa en la asociación simbiótica entre organismos heterotróficos y fotosintéticos, lo que constituye un fundamento de innovación en andamios tisulares con la capacidad de mantener una fuente de oxígeno estable durante el proceso de cicatrización de heridas (Chávez et al., 2020; Jiang et al., 2024; Maharjan et al., 2022). Estudios recientes señalan que las aplicaciones potenciales de las tecnologías fotosintéticas en la ingeniería tisular constituyen una fuente de innovación en las técnicas de oxigenación celular, mediante el uso de fuentes de energía lumínica como agentes catalizadores de reacciones químicas que producen el gas como residuo respiratorio (Chávez et al., 2020; Cui et al., 2022; Gershlak et al., 2017). No obstante, cabe resaltar que el uso de este tipo de sistema de oxigenación tópica está limitado a entornos controlados.

1.2. Planteamiento del problema

1.2.1. Enfermedades crónicas no transmisibles en Panamá

La Organización Panamericana de la Salud ha clasificado las enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) como la principal causa de muerte y discapacidad en todo el mundo, con un promedio de 41 millones de muertes anuales, es decir, el 71% de los fallecimientos a nivel mundial. Esto se traduce en la muerte prematura de aproximadamente 15 millones de personas, de las cuales el 85% ocurre en países de ingresos medios o bajos (Dirección Nacional de Planificación en Salud, 2024; Organización Panamericana de la Salud, 2021). A nivel mundial, un 80% de estas muertes se relacionan con la coexistencia de ENT (Ministerio de Salud, 2023b), un perfil similar al evidenciado a nivel nacional, donde se les atribuye el 74.2% de los fallecimientos, en los últimos años (Ministerio de Salud, 2024).

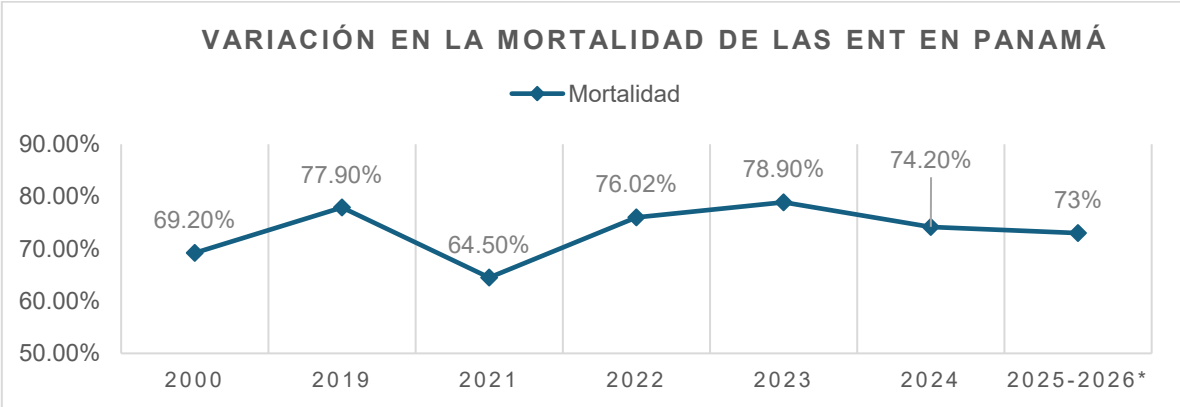
En Panamá se observa un perfil de salud de gran heterogeneidad, evidenciado por la incidencia simultánea de enfermedades infecciosas y no transmisibles entre las principales causas de morbilidad y mortalidad, acorde con lo estipulado por el Ministerio de Salud (MINSA)(Dirección Nacional de Planificación en Salud, 2024). Desde el 2022, los datos estadísticos nacionales han mostrado una consistencia temporal en la que las enfermedades no transmisibles (ENT) se destacan como la principal causa de mortalidad en la población (Dirección Nacional de Planificación en Salud, 2024; Ministerio de Salud, 2022). Asimismo, en el último año, se han identificado a las enfermedades crónicas degenerativas, desde las enfermedades cardiovasculares hasta la diabetes, como un problema de salud pública en crecimiento (Tello, 2025; Yovira, 2024), señalando su prevalencia en más del 50% de la población panameña y su esperado aumento del 35% en los próximos años, como consecuencia de una vida sedentaria acorde con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Ministerio de Salud, 2023c; Tello, 2025; Yovira, 2024).

En 2024, la población de la República de Panamá fue estimada por el Instituto Nacional de Estadística y Censo en 4.509.530 habitantes. Tomando en consideración el crecimiento de las tasas de natalidad y mortalidad nacionales, para el 2025-2026 se estima una elevación de la población nacional a aproximadamente 4.600.000 habitantes, lo cual se correlaciona con la tendencia observada en el resto

de los países de la región (Pan American Health Association, 2024). De esta población, en la última década la tasa de mortalidad bruta, por cada 1000 habitantes ha aumentado consistentemente desde una tasa de 4,6 muertes en 2015 hasta 5,7 muertes en 2021, a excepción de un aumento radical causado por la pandemia del año 2020 donde la tasa de mortalidad aumentó a un 22.9% (representativo de 5,9 muertes por 1000 habitantes). No obstante, para los próximos años, se estima el crecimiento exponencial sostenido por la tendencia al diagnóstico y tratamiento tardíos de enfermedades crónicas no transmisibles en el país (Dirección Nacional de Planificación en Salud, 2024), con reportes preliminares indicando que el 42% de la población panameña padece de hipertensión arterial y aproximadamente el 15% de las personas mayores de 15 años han desarrollado diabetes mellitus tipo 2 (Ministerio de Salud, 2026).

En el último semestre, Panamá se ha visto afectado por un alza, mayor al 3,0% de la población nacional, en ENT socialmente consideradas de “menor impacto” como es la obesidad (Tello, 2025). Se resalta que este tipo de condiciones, acorde con la Coordinación Nacional de Medicina Familiar, está directamente relacionado con el surgimiento de otras ENT y el estimado aumento en la mortalidad poblacional bruta de las próximas décadas (Ministerio de Salud, 2022, 2023c), como se describe en el gráfico (**Gráfica 1**), así como en las principales causas de morbilidad del país (Pan American Health Association, 2024).

Gráfica 1. Variación porcentual de la mortalidad por enfermedades crónicas no transmisibles (ENT) en Panamá en las últimas décadas.



Nota: información obtenida del Instituto de Estadística y Censo (Ibarra H, 2025). *porcentaje estimado a partir de la tasa de mortalidad registrada a nivel nacional hasta 2024.

1.2.2. Costos sanitarios

Los costos sanitarios se definen, de acuerdo con la OMS y sus subdivisiones, como los gastos totales incurridos en la provisión de servicios de salud, incluyendo las coberturas de los sistemas público y privado relacionadas con la atención médica (Organización Mundial de la Salud, 2024; Organización Panamericana de la Salud, 2023). Entre las condiciones involucradas, ENT generan costos financieros sustanciales para las personas y los hogares, provocando no solo pérdidas de productividad que retrasan el desarrollo interpersonal, sino, a nivel socioeconómico, como uno de los agravantes reconocidos para la pobreza en la actualidad. La OMS estipula, en su plan de desarrollo para la Agenda 2030, que, dentro del periodo abarcado, las ENT costarán a la economía mundial más de 30 billones de dólares (Organización Mundial de la Salud, 2021). Asimismo, MINSA indicó, en su reporte presupuestario bianual para el periodo 2024, que las enfermedades crónicas no transmisibles (ENT), entre las cuales se encuentran el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades renales y la diabetes (Yovira, 2024), representan una carga significativa para el sistema de salud nacional siendo responsables de una gran parte del presupuesto destinado a la atención médica (Dirección Nacional de Planificación en Salud, 2024).

En Panamá se ha registrado una pérdida de productividad económica a causa de muerte prematura desarrollada por una ENT que, en su mayor densidad de mortalidad, ha representado más de 10 millones de dólares en los últimos años (Herrera Ballesteros, 2024). No obstante, un presupuesto mayor es otorgado a nivel nacional para su tratamiento, alcanzando hasta más de 600 millones de dólares anuales, o aproximadamente 41 mil balboas anuales por paciente, en insumos, equipos y personal necesario para mejorar la calidad de vida de las personas que padecen de una ENT, acorde con la dirección general de la Caja de Seguro Social de Panamá (Sanchez, 2022).

1.2.3. Estado de los tratamientos de lesiones cutáneas hipóxicas aplicados en Panamá

En Panamá existen múltiples entornos de atención clínica de heridas, cuyo impacto es relevante tanto para pacientes agudos como para los crónicos. Entre las principales se identificaron 29.132 pacientes agudos y crónicos atendidos en estos centros especializados en 2021 (Sanchez, 2022), con una media de 326 pacientes atendidos semestralmente por institución regional (Ministerio de Salud, 2023a). Este promedio se mantiene en la actualidad, dado que diariamente son atendidos aproximadamente 55 pacientes a nivel público (Ministerio de Salud, 2023d; Tello, 2024), con instituciones llegando a reportar hasta 35,248 casos anuales, de los cuales un 75% corresponden a lesiones de pacientes con ENT (Sánchez, 2026).

A nivel público, estas instituciones especializadas atienden a pacientes con diagnósticos de pie diabético, úlceras venosas o arteriales, quemaduras de II grado, heridas infectadas o traumáticas de poca extensión con pérdida de sustancia, y abscesos drenados (Tello, 2024), así como curaciones de biopsias, sistemas de compresión de múltiples capas, terapias de presión tópica y heridas post operatorias (Sánchez, 2022); todos procesos generalmente realizados con intervenciones quirúrgicas mínimas, basadas en desinfección local, cobertura con gasas o apósito con espuma y prescripción de farmacéuticos antiinflamatorios y antibióticos (Sánchez, 2022; Tello, 2024). Este tipo de intervención es caracterizada por dejar la curación de la herida al ritmo del sistema fisiológico de cada paciente, ofreciendo protección de factores externos con dicha barrera física colocada por encima de las heridas abiertas (Britto et al., 2025) y, en el caso de heridas específicas que puedan ser acondicionadas para el uso de apósitos, se incorpora el uso de maltodextrina en polvo o el colágeno, generalmente en forma de hidrocoloides e hidrogeles; no obstante, el uso de estas innovaciones tienden a ser menos frecuentes por su alto costo en el mercado (Díaz, 2024). Por otro lado, a nivel de atención privada, los pacientes, de ser candidatos para procesos tópicos inmediatos, tienden a ser tratados localmente con apósitos sintéticos, antimicrobianos, hemostáticos, controladores de olor o en polvo, promovedores del proceso de cicatrización, permitiendo la obtención de un tratamiento rápido (Moreno & Arosemena, 2025).

Los tratamientos utilizados en las clínicas de heridas en Panamá han sido altamente estudiados, permitiendo reconocer las condiciones en las que su uso es recomendado, así como los beneficios y desventajas que ofrece cada uno (Britto et al., 2025; Pilehvar-Soltanahmadi et al., 2018). Este último punto, para los cobertores tópicos más utilizados en Panamá, se resume en la siguiente tabla (**Tabla 2**). Si bien los tratamientos de uso especializado expuestos previamente son considerados “de alta gama”, a nivel académico se han identificado áreas de mejora en su diseño, especialmente en cuanto a su grado de permeabilidad a gases como el oxígeno. Esta desventaja se ha relacionado con efectos hipóxicos y la acumulación de desechos en el área de tratamiento (Zoneff et al., 2024). Asimismo, existe la posibilidad de desarrollar alergias a reactivos cicatrizantes sintéticos presentes en parches comerciales (Fornes Pujalte et al., 2008).

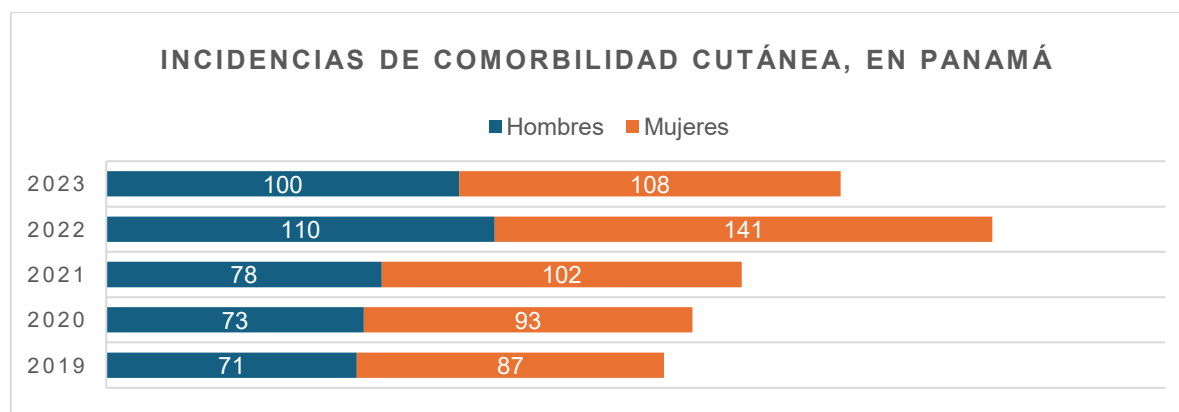
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos de vendaje de heridas, utilizados en Panamá				
Vendaje	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Gasas	Malla tejida de algodón sintético útil para la limpieza de lesiones en sus últimos estadios.	• Fácil de utilizar. • Bajo costo. • Alta disponibilidad.	• Inconveniente al retirar (dolor o desbridamiento) • Corta vida útil. • Sin intercambio gaseoso	(Fornes Pujalte et al., 2008).
Apósito de espuma	Esponjas en láminas cuadradas o en cinta con variabilidad en porosidad y densidad.	• Buenos absorbentes • Protección de trauma	• Seca rápidamente las heridas. • Sin adherencia directa.	(Britto et al., 2025; Fornes Pujalte et al., 2008).
Hidrogel es	Geles o mallas de polímeros compuestos principalmente por agua.	• Cómodos • Favorecen el alivio de dolor. • Rehidrata el área	• Corta vida útil. • Absorbancia limitada • No recomendables para heridas exudativas.	(Britto et al., 2025; Fornes Pujalte et al., 2008).
Hidrocoloides	Mallas impermeables a base de polímeros hidrofílicos enlazados con celulosa, que aumentan en volumen.	• Flexibles • Humedad y calor al área. • Buenos absorbentes.	• Habilita la adhesión a la herida expuesta. • Mal olor por oxidación • Poca visibilidad	(Fornes Pujalte et al., 2008).

Ante las problemáticas planteadas y tomando en consideración las limitaciones existentes en las estrategias convencionales de oxigenación tisular, aplicadas y en desarrollo, surge la siguiente interrogante de investigación: *¿en qué medida la incorporación de sistemas de origen vegetal en plataformas fotosintéticas contribuye a promover la oxigenación localizada en ensayos in vitro?*

1.2.4. Efectos de la hipoxia, en lesiones cutáneas, en Panamá

El índice de mortalidad que manejan las lesiones cutáneas, a nivel mundial, se relaciona estrechamente con la presencia de otras afecciones en el sistema, previas a la lesión o desarrolladas tras un tratamiento tardío de dichas heridas (Catrina & Zheng, 2021; Maharjan et al., 2022; Yun et al., 2010). En Panamá se mantiene esta tendencia (Dirección Nacional de Planificación en Salud, 2024), a pesar de sostener un índice de mortalidad general de 4.9 por cada 1000 habitantes en el 2023, la incidencia de muertes específicamente correlacionadas con complicaciones derivadas de una herida o lesión de la piel se ha mantenido constante en los últimos registros publicados por el Instituto Nacional de Estadística y Censo (Dirección Nacional de Planificación en Salud, 2024; Ibarra H, 2025; Sánchez-Cruz et al., 2016), como es indicado en el siguiente gráfico (**Gráfica 2**).

Gráfica 2. Incidencias de comorbilidad por condiciones de la piel y tejidos subcutáneos, en la República de Panamá.



Nota: información obtenida de los registros del periodo de 2019 al 2023 (Ibarra H, 2025)

Por otro lado, la presencia de una lesión cutánea en un paciente crónico puede tener un impacto significativo en su calidad de vida, no solo impulsando a una vida sedentaria que comprometa su salud (Yovira, 2024) o limite sus capacidades sociales, sino aumentando su vulnerabilidad ante otras condiciones potencialmente mortales y generando una carga económica sobre los sistemas de salud (Organización Mundial de la Salud, 2021; Pan American Health Association, 2024; Tello, 2025). De forma específica, el posible desarrollo de infecciones o las amputaciones de extremidades por complicaciones derivadas de una lesión son de

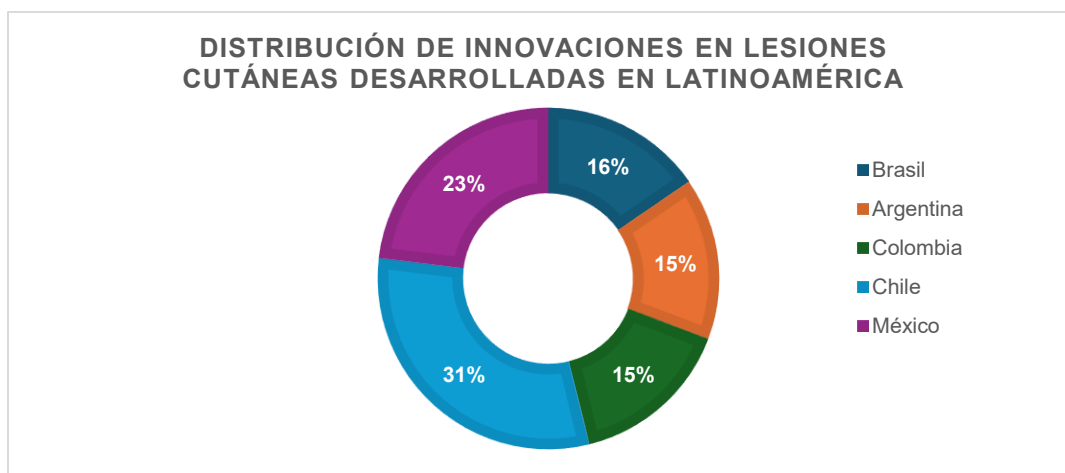
los puntos de mayor impacto psicológico y físico en el desarrollo de la vida del paciente (Sánchez-Cruz et al., 2016). No obstante, en la mayoría de los casos, el asentamiento causado por este tipo de lesiones conllevan a un aumento en su acumulación de grasas y, por consiguiente, el desarrollo de una posible obesidad crónica que limita al paciente en sus actividades diarias e inclusive puede ser una fuente alternativa de dolores musculares e inconformidades en general (Herrera Ballesteros, 2024; Yovira, 2024); además de aumentar significativamente el riesgo de desarrollar otras enfermedades, como la hipertensión arterial, la enfermedad renal crónica o la diabetes mellitus tipo I y II, lo que implica mayores costos en tratamientos y cuidados de salud (Herrera Ballesteros, 2024).

1.3. Justificación de la investigación

Las disrupciones epidérmicas son de las afecciones más comunes en los seres humanos (Fornes Pujalte et al., 2008), y la población panameña no es la excepción a esta generalidad. La República de Panamá cuenta con más de 30 clínicas de heridas a nivel nacional (Ministerio de Salud, 2023d; Tello, 2024). Estas instituciones especializadas atienden a pacientes con diagnósticos de disrupciones dérmicas de mayor o menor gravedad; brindando tratamientos rápidos basados en la desinfección local, cobertura y prescripción de farmacéuticos (Díaz, 2024). Este proceso ofrece protección frente a factores externos, mas no considera la necesidad de un suministro de factores de crecimiento que aceleren la cicatrización (Ministerio de Salud, 2023b) o detengan el proceso de apoptosis celular causada por la falta de oxígeno localizado en el área de la lesión (Zoneff et al., 2024), un efecto comúnmente relacionado a la baja permeabilidad gaseosa de apósitos convencionales en pacientes con enfermedades crónicas no transmisibles (Sánchez-Cruz et al., 2016; Zoneff et al., 2024) . En este ámbito, los avances tecnológicos en biomedicina tisular han adquirido una especial inclinación por la integración de sistemas vegetales (Barrón González et al., 2023), dado que estos ofrecen una alternativa prometedora ante condiciones hipóxicas utilizando mecanismos biológicamente estudiados (Wang et al., 2022; Zhang et al., 2024).

Analizando el avance regional en esta área, se han registrado una gran cantidad de avances médicos globales enfocados en mejorar las terapias aplicadas para lesiones cutáneas de mayor o menor gravedad, profundidad e, inclusive, grado de liberación de líquidos con bases en apósitos pasivos o bioactivos (Camci-Unal et al., 2013; Jiang et al., 2024; Zoneff et al., 2024). Sin embargo, en Panamá persiste una notoria escasez de innovación enfocada en este campo, donde los tratamientos de heridas complejas dependen principalmente de tecnologías y productos importados (Martínez et al., 2021; Sánchez, 2022; Tello, 2024), lo que nos diferencia de otros países de la región, donde el desarrollo local está más potenciado (**Gráfica 3**).

Gráfica 3. Distribución del desarrollo de la región en lesiones cutáneas en el periodo del 2018-2024.



Nota: distribución del desarrollo de la región en lesiones cutáneas incluyendo: Chile con 4, México con 3, Argentina, Colombia y Brasil con 2 innovaciones desarrolladas, cada uno. (Escobar Chávez, 2022; Lima-Junior et al., 2019; Neuman, 2023; UNAL, 2018; UNC, 2023)

Tomando en consideración lo planteado hasta este punto, la presente propuesta se orienta a generar aportes significativos en los ámbitos científico, metodológico e institucional, al abordar una problemática relevante mediante el uso de sistemas biológicos no convencionales. Este enfoque interdisciplinario busca ampliar las alternativas actuales para la producción controlada de oxígeno en entornos *in vitro*, con proyección hacia aplicaciones en ingeniería tisular y el tratamiento de lesiones cutáneas en hipoxia.

En el plano científico, se espera obtener resultados experimentales originales que evidencien el comportamiento fotosintético de sistemas vegetales integrados en biopelículas funcionales dentro de matrices descelularizadas, evaluando su capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo bajo condiciones controladas. Estos resultados constituirán una línea base para estudios posteriores en ingeniería tisular, bioingeniería y áreas afines, contribuyendo a la comprensión del desempeño oxigénico sostenido tanto de sistemas celulares complejos como de organelos simples, cumpliendo con el análisis comparativo entre distintas estrategias de oxigenación biológica.

Desde el punto de vista metodológico, el desarrollo y adaptación de protocolos de descelularización de hojas tropicales representan una contribución directa al diseño de andamios vegetales funcionales. Las modificaciones introducidas, orientadas a preservar la arquitectura del soporte y favorecer su integración con biopelículas fotosintéticas, establecen una referencia replicable para futuros estudios que busquen emplear matrices vegetales no convencionales. Con esto, se da lugar al impacto en el ámbito regional, donde se espera generar una ampliación en los posibles usos científicos de hojas tropicales como materia prima, en especial en países con alta biodiversidad vegetal como Panamá; de manera que, con esta propuesta, se promueve el aprovechamiento de materiales locales accesibles, fomentando líneas de investigación adaptadas a las condiciones ambientales y económicas de la región. Asimismo, la integración de agentes fotosintéticos en biopelículas funcionales dentro de una capa de matriz descelularizada con la finalidad de proporcionarle estabilidad y contención al medio inmediato, sin limitar su permeabilidad ante el intercambio de gases y recepción de luz, representa una técnica metodológica innovadora dentro del campo de biomateriales fotosintéticos.

Los resultados y metodologías derivados de este proyecto de investigación establecen una línea base para el diseño, evaluación y optimización de plataformas oxigénicas fotosintéticas, facilitando el desarrollo de investigaciones posteriores orientadas a mejorar la estabilidad, eficiencia y aceptación de sistemas biológicos híbridos, diseñados a partir de una matriz vegetal descelularizada y un componente bioactivo fotosintético, aplicados a la oxigenación dirigida.

1.4. Objetivos

Objetivo General:

Generar plataformas fotosintéticas basadas en la incorporación de sistemas vegetales, como estrategia para promover la oxigenación localizada, en ensayos *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- Etapa 1. Analizar la viabilidad de integración de cloroplastos aislados en andamios, a partir de su capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo.
- Etapa 2. Desarrollar un hidrogel de alginato fotosintético en una plataforma estructural tipo tamal descelularizado, como estrategia innovadora mediante técnicas de bioingeniería.

1.5. Alcance y límites de la propuesta

La presente investigación propone un enfoque no convencional para la oxigenación localizada en ensayos *in vitro*, basado en la incorporación funcional de sistemas vegetales fotosintéticos. A diferencia de las aproximaciones tradicionales, dependientes de mecanismos físicos de difusión o de la aplicación de agentes inorgánicos para el suministro de oxígeno, esta propuesta explora el uso de la fotosíntesis como proceso activo integrado al microambiente experimental, ampliando las posibilidades de diseño en ingeniería tisular. Además, este proyecto se distingue por la integración de hojas tropicales como estructuras descelularizadas de soporte, las cuales, pese a su amplia disponibilidad en regiones tropicales como Panamá, no han sido reportadas de manera sistemática como matrices funcionales para plataformas fotosintéticas orientadas a la oxigenación biológica.

Esta propuesta define una estrategia de oxigenación biológica claramente delimitada en su alcance experimental. La primera etapa se centra en la evaluación de cloroplastos extraídos de hojas comunes, como fuentes individuales de oxígeno, con el objetivo de analizar su estabilidad y funcionalidad en condiciones *in vitro*, en comparación con la actividad de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*. De manera complementaria, la segunda etapa plantea el desarrollo de una plataforma fotosintética híbrida, conformada por hidrogeles de microalgas incorporados en un soporte vegetal descelularizado, concebida como un sistema activo y localizado de producción de oxígeno. Cabe resaltar que el presente estudio se limita a la evaluación de la actividad de los sistemas fotosintéticos de forma aislada, sin incluir la integración de células animales ni ensayos interespecie o de interacción directa.

1.6. Línea de Investigación

El presente proyecto de investigación pertenece a la línea de investigación en ciencias de la salud de la Universidad Latina de Panamá, específicamente al área de investigación de Ingeniería de tejidos, biomateriales y biomecánica, de la carrera de Ingeniería Biomédica e Instrumentación.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2. CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de investigaciones realizadas en el tema

Diversas investigaciones recientes han explorado el uso de plataformas fotosintéticas como alternativas para mejorar la disponibilidad de oxígeno en entornos relacionados con la regeneración tisular. La literatura comprende estudios centrados en el desarrollo de andamios descelularizados a partir de tejidos vegetales, así como en la incorporación de microalgas y componentes fotosintéticos aislados, como cloroplastos y tilacoides, en diferentes matrices y biomateriales. Mientras los andamios vegetales aportan estructuras de soporte para aplicaciones de ingeniería tisular, la incorporación de sistemas fotosintéticos permite aprovechar su capacidad de generación de oxígeno bajo condiciones de iluminación. En conjunto, estos enfoques abordan de manera complementaria los componentes estructurales y funcionales necesarios para el desarrollo de plataformas fotosintéticas, brindando un panorama respecto a su biocompatibilidad y potencial aplicación en procesos de reparación cutánea.

En este contexto, la siguiente tabla (**Tabla 3**) presenta un resumen de los antecedentes más relevantes relacionados con el desarrollo de andamios vegetales descelularizados y plataformas fotosintéticas basadas en microalgas, cloroplastos y tilacoides. Los estudios se presentan de manera cronológica e incluyen información sobre sus autores, la revista científica en la que fueron publicados y una síntesis de sus principales aportes. Esta organización permite observar la evolución de los diferentes enfoques empleados para el desarrollo de estas plataformas, así como establecer relaciones entre las estrategias estructurales y fotosintéticas abordadas en la literatura. A partir de esta comparación, se identifican los principales avances y aspectos aún poco explorados que sirven como referencia para el desarrollo de la presente investigación.

Tabla 3. Investigaciones científicas relacionadas al proyecto		
Investigaciones en el desarrollo de andamios descelularizados a partir de plantas		
Nombre del artículo – Autor et al., año	Revista científica	Resumen
“Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds” – Gershlak et al., 2017	Biomaterials	Revisión en la utilidad de tejidos vegetales descelularizados como andamios tridimensionales en ingeniería tisular. Los resultados indican que estos andamios pueden soportar el crecimiento celular, proponiéndose como una alternativa biomaterial sostenible para aplicaciones en regeneración de tejidos. (Gershlak et al., 2017)
“Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture” – Fontana et al., 2017	Advanced Healthcare Materials	Evaluación de tejidos vegetales descelularizados como andamios para ingeniería tisular, permiten la adhesión, proliferación y organización de células humanas siguiendo la microarquitectura natural de la planta. Sus propiedades hidrofílicas y capacidad de transporte de agua favorecen el mantenimiento celular, posicionándolos como una alternativa versátil y accesible a los biomateriales convencionales (Fontana et al., 2017).
“The Emerging Role of Decellularized Plant-Based Scaffolds as a New Biomaterial.” – Harris et al., 2021	International Journal of Molecular Sciences	Análisis del potencial de los andamios vegetales descelularizados derivados de tallos y hojas rígidas, como biomaterial emergente en ingeniería tisular. Incluye la evaluación de métodos de descelularización, así como sus ventajas como bajo costo, sostenibilidad y diversidad estructural, además de los principales retos para su aplicación biomédica futura (Harris et al., 2021).
“Decellularized banana leaves: eco-friendly scaffolds for cell-based seafood” – Banavar et al., 2024	Frontiers in Sustainable Food Systems	Primer estudio experimental en la evaluación de hojas de banana descelularizadas como andamios sostenibles para alimentos cultivados. Tras confirmar la eliminación celular, se analizaron recubrimientos y estrategias de siembra para determinar adhesión, viabilidad y crecimiento celular, además de su estabilidad frente a procesamiento térmico. Los resultados demuestran que estas hojas pueden actuar como plataformas ecológicas y efectivas para soportar proliferación celular (Banavar et al., 2024).
“Plant-Based Scaffolds for Tissue Engineering: A Review” – Vargas-Ovalle et al., 2025	Polymers	Revisión en el uso de andamios vegetales descelularizados como alternativas económicas y éticas, para ingeniería de tejidos, expandiendo su aplicación a modelos de tejido, ensayos de fármacos, biosensores y carne cultivada. Analiza la frecuencia de diferentes matrices vegetales, las principales técnicas de descelularización y métodos para favorecer la adhesión de células de mamíferos. Concluyendo en la necesidad estandarizar métodos y caracterizar mejor el desempeño de andamios derivados de plantas, en estudios <i>in vivo</i> (Vargas-Ovalle et al., 2025)

Investigaciones en el desarrollo de andamios fotosintéticos con microalgas		
Nombre del artículo – Autor et al., año	Revista científica	Resumen
“Photosymbiosis for Biomedical Applications” – Chávez et al., 2020	Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	Revisión de estrategias fotosintéticas para tratar la hipoxia tisular, utilizando microorganismos fotosintéticos como fuente local de oxígeno. Analiza sus aplicaciones en ingeniería de tejidos y mantenimiento de órganos, así como los principales desafíos para su futura implementación clínica. (Chávez et al., 2020).
“A bioinspired scaffold for rapid oxygenation of cell encapsulation systems” – Wang et al., 2021	Nature Communications	Presenta el diseño de un andamio bio-mimético con canales internos de aire que mejora la difusión de oxígeno en sistemas de encapsulación celular. Este demostró su eficacia terapéutica al corregir la diabetes en un modelo murino durante más de seis meses (Wang et al., 2021).
“In Situ 3D Bioprinting Living Photosynthetic Scaffolds for Autotrophic Wound Healing” – Wang et al., 2022	Research	Desarrollo de andamios fotosintéticos desarrollados mediante bio impresión incorporando microalgas como fuente sostenida para la generación de oxígeno bajo iluminación. En un modelo de heridas diabéticas, este tipo de impresión directa de los andamios aceleró significativamente el cierre de heridas, destacando su potencial como innovación (Wang et al., 2022).
“Living microecological hydrogels for wound healing” – Chen et al., 2023	Science Advances	Generación de un hidrogel vivo que combina microalgas (<i>Chlorella</i>) y bacterias (<i>Bacillus subtilis</i>) para enfrentar hipoxia e infección en heridas. Este sistema está basado en un material termosensible y adhesivo que permite una aplicación líquida que se solidifica rápidamente y se adhiere al lecho de la herida (G. Chen et al., 2023).
“Oxygenated Wound Dressings for Hypoxia Mitigation and Enhanced Wound Healing” - Han et al., 2023	Molecular Pharmaceutics	Revisión del papel del oxígeno en la cicatrización y el efecto de la hipoxia en la regeneración tisular. Además, se da el análisis de estrategias para mejorar la oxigenación localizada, incluyendo materiales generadores o transportadores de oxígeno desde nano enzimas hasta la integración de bacterias fotosintéticas, y evaluando sus mecanismos, eficacia probada y limitaciones que permitan optimizar su diseño (Han et al., 2023).
“Bioactive Algae in Wound Healing: Natural Solutions for Modern Medicine” – Aher et al., 2025	Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences	Análisis del potencial de las algas marinas como fuente sostenible de compuestos bioactivos para el tratamiento de heridas. Destaca sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, hidratantes y biocompatibles, que favorecen la regeneración tisular sin cicatrices excesivas. Además, explora su aplicación en formulaciones como hidrogeles y productos tópicos. Su aplicación en formulaciones como hidrogeles y productos tópicos (Aher et al., 2025).

"Therapeutic potential of microalgae-derived natural compounds in diabetic wound healing: A comprehensive review" – Pei et al., 2025	Heliyon	Revisión del potencial de microalgas en el tratamiento de heridas, especialmente en el contexto de cicatrización de heridas diabéticas. Se analiza su rol en los procesos fisiológicos, se describen algunos compuestos bioactivos que pueden ser derivados de algas y potencialmente favorecen la regeneración; además de examinar el uso de hidrogeles fotosintéticos en la liberación de oxígeno y fármacos in situ y sus desafíos actuales (Pei et al., 2025).
"3D-printable reinforced photosynthetic living hydrogel patches for accelerated wound healing" – Zhang et al., 2026	Chemical Engineering Journal	Desarrolla parches de hidrogel fotosintético reforzado que incorporan microalgas para generar oxígeno, así como metabolitos bioactivos, reduciendo el riesgo de fuga microbiana. Estos apósitos, probados en modelos de heridas agudas, abarcan un sistema basado en materiales termosensibles y fotopolimerizables, que se adaptan a la geometría de las heridas y ofrecen alta estabilidad mecánica, resultando en una oxigenación localizada efectiva, aceleración en la regeneración epitelial y promoción de la angiogénesis (S. Zhang et al., 2026).
Investigaciones en el desarrollo de andamios con integración de cloroplastos/tilacoides		
Nombre del artículo – Autor et al., año	Revista científica	Resumen
"A plant-derived natural photosynthetic system for improving cell anabolism" – Chen et al., 2022	Nature	Abarca el desarrollo de un sistema fotosintético basado en unidades de nano tilacoides ("NTUs") encapsuladas en una membrana de condrocitos, para mejorar el anabolismo celular al proporcionar una fuente independiente y controlable de ATP y NADPH (Chen et al., 2022).
"Chloroplast–boosted photodynamic therapy for effective drug-resistant bacteria killing and biofilm ablation" – He et al., 2023	Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	Evaluación de un sistema fotodinámico que integra cloroplastos funcionales con un fotosensibilizador para mejorar la terapia antimicrobiana. En ensayos <i>in vitro</i> , el sistema mostró mayor eficacia bactericida, que el fotosensibilizador solo (He et al., 2023).
"Oxygenating respiratoid biosystem for therapeutic cell transplantation" – Jang et al., 2024	Nature Communications	Biosistema " <i>respiratoid</i> " diseñado para mejorar la oxigenación de células trasplantadas mediante la estabilización de cloroplastos con un péptido de tránsito conjugado a alginato. El sistema permite la generación espontánea de oxígeno, incluso en condiciones hipóxicas, y mantiene la funcionalidad de islotes pancreáticos trasplantados en ratones diabéticos durante 100 días sin inmunosupresión (Jang et al., 2024).
"Incorporation of photosynthetically active algal chloroplasts in cultured mammalian cells towards photosynthesis in animals" – Aoki et al., 2024	Physical and biological sciences	Emplea cloroplastos aislados de alga roja incorporados en cultivos compartidos con células animales, donde aún integrados en el citoplasma de las células mamíferas, mantuvieron su estructura y funcionalidad en términos de actividad de transporte electrónico del fotosistema II durante al menos dos días (Aoki et al., 2024)

2.2. Bases teóricas que sustentan la investigación

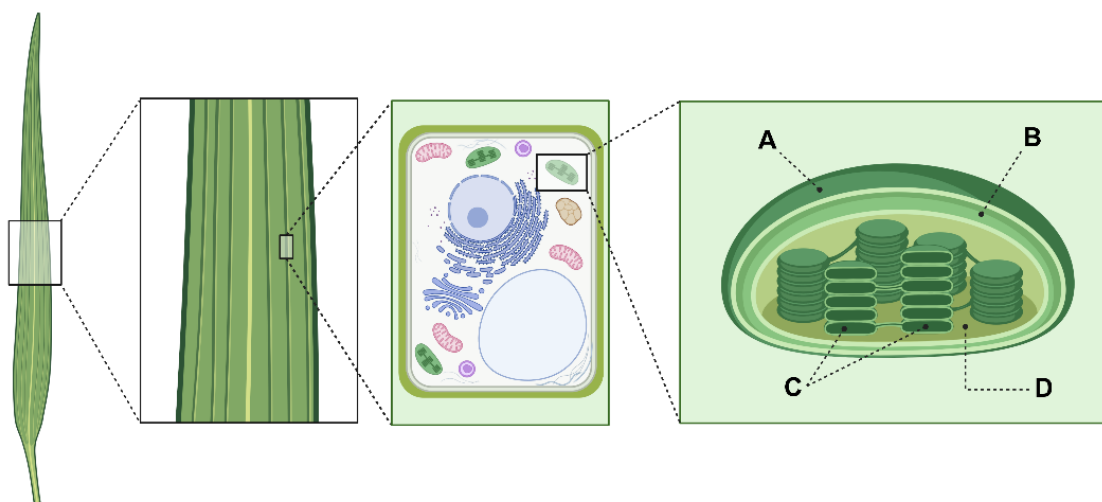
El desarrollo de sistemas fotosintéticos capaces de generar oxígeno de manera localizada requiere considerar tanto la capacidad de sus componentes biológicos para generar y liberar oxígeno como las estrategias empleadas para su incorporación y estabilización. En esta sección se presentan los fundamentos asociados con la capacidad de liberación de oxígeno de cloroplastos y tilacoides, así como los métodos empleados para su aislamiento y estabilización. Posteriormente, se abordan los principios relacionados con el desarrollo de hidrogeles fotosintéticos formulados a partir de diversos polímeros que incorporan microalgas y componentes fotosintéticos aislados. Finalmente, se consideran las propiedades de las estructuras descelularizadas de origen vegetal y su función como elementos de soporte para la integración de estos sistemas en plataformas fotosintéticas. En conjunto, estos fundamentos permiten establecer un marco conceptual para comprender el diseño y funcionamiento de la plataforma propuesta en el presente estudio.

2.2.1. Análisis de la capacidad de liberación de oxígeno de sistemas fotosintéticos.

Los cloroplastos son organelos que albergan las reacciones metabólicas necesarias para la fotosíntesis (Cartaxana & Cruz, 2020; Hill, 1939; Olejniczak et al., 2016). Estructuralmente, estos se componen de membranas externa e interna, siendo esta última el punto de alojamiento de sistemas interconectados denominados tilacoides, que, a su vez, están conformados por granas apiladas (Espinosa-Barrera & Chávez-Sahagún, 2019); una representación de lo anterior vista desde una célula vegetal, se muestra en la siguiente figura (**Figura 5**). Estos organelos se reconocen por ser capaces de generar oxígeno aún fuera de células completas, dado un ambiente adecuado, desde hace poco menos de un siglo, con Robert Hill como el principal autor de estos descubrimientos (Hill, 1939); no obstante, su producción es reconocida por abarcar una ventana de tiempo corta, con los primeros registros desarrollados en términos de minutos (Hill, 1937, 1939) y horas, especialmente tras su almacenamiento a temperaturas bajo cero (Droppa et al., 1981). Aún en la actualidad, esta problemática se mantiene relevante, con estudios recientes como

los de Adamiec et al. y Wang et al., resaltando la inestabilidad orgánica en el tiempo de sistemas pese a la aplicación, sin desestimar su alto potencial como un agente oxigenante efectivo para la biomedicina (Adamiec et al., 2024; S. Wang et al., 2025).

Figura 5. Representación de la estructura de los cloroplastos. Creado con BioRender.



(Adaptado de Fromme et. al, 2006)

Nota: (a) membrana externa, (b) membrana interna, (c) tilacoides y (d) estroma, obtenida desde una célula vegetal de una hoja genérica. Basado en (Fromme et al., 2006).

Considerando lo expuesto, a lo largo de los años múltiples investigadores han estudiado métodos de estabilización temporal de cloroplastos o tilacoides aislados a partir de hojas. En este ámbito, una primera investigación fue publicada en 1950 por los autores Gorham y Clendenning, quienes definieron un método de estabilización de cloroplastos, efectivo para reducir la pérdida de actividad fotosintética, evaluada mediante exposición a la luz durante dos horas tras su almacenamiento prolongado con sacarosa a bajas temperaturas, lo que dio una mejor preservación en comparación con la liofilización (Gorham & Clendenning, 1950). Por su parte, el autor Thomas Punnet estudió la reproducción y estabilización de la reacción de Hill en cloroplastos completos y rotos a partir de la modificación de los tampones de extracción utilizados en el aislamiento. Obtuvo cambios en el pH de la suspensión en el tiempo de almacenamiento con la adición de glucosa y cloruro, que resultaron en el registro de actividad fotosintética alta y relativamente estable por hasta cinco horas posteriores a almacenamiento (Punnett, 1959).

Una alternativa de estabilización surge con el autor R. B. Park, quien introduce el concepto de fijación de estos organelos mediante aldehídos, dada su capacidad de establecer enlaces intramoleculares, realizando pruebas con formaldehído y glutaraldehído como agentes principales, con lo que se logró identificar una preferencia por el glutaraldehído como un agente capaz de mantener la actividad máxima por hora en los fotosistemas I y II por cada miligramo de clorofila extraído (Park, 1970). Este último factor continuó en estudio por los siguientes años, con investigaciones como la de los autores Hardt y Kok donde la implementación de glutaraldehído aumentó el tiempo de vida útil de cloroplastos en almacenamiento por 5 días (Hardt & Kok, 1976) o la de Zilinskas y Govindjee quienes definieron una relación entre la concentración ideas de glutaraldehído y la pérdida de funcionalidad de la cadena de transporte de electrones consiguiendo una concentración ideal para la protección de cambios de pH del medio sin inhibir la reacción de Hill (Zilinskas & Govindjee, 1976).

Otros métodos explorados para la estabilización a largo plazo son las estudiadas por Kulandaivelu y Hall cuya inclusión de albúmina de suero bovino en almacenamiento a -5°C extiende la capacidad de fosforilación de cloroplastos extraídos por 10 días (Kulandaivelu & Hall, 1976), los métodos aplicados por Morris et al. donde se logra identificar la utilidad de albúmina de suero bovino a bajas concentración como el mejor resultado para el almacenamiento por hasta 6 días, haciendo especial énfasis en el uso de albúmina de suero bovina libre de ácidos para estos ensayos (Morris et al., 1982). Los autores Farkas y Malkin, por su parte, estudiaron métodos de conservación de las funciones de fosforilación y transporte de electrones a temperaturas bajas (-100°C), donde la inclusión de crio preservantes permite la conservación total de estas actividades por hasta 10 meses, resaltando que una varianza en la temperatura de almacenamiento menor (-75°C) causa la inhibición de la fosforilación a pocas horas de almacenamiento (Farkas & Malkin, 1979). Por otra parte, la microencapsulación como método de estabilización en el tiempo se ha aplicado desde 1975, con el estudio de Kitajima y Butler, quienes desarrollaron microesferas de membrana artificial con grupos amino capaces de permitir la interacción limitada de las partículas del fotosistema I con el medio, lo

que resultó en una reducción de la actividad oxigenante inicial (Kitajima & Butler, 1976). Otro método de encapsulación es descrito en el estudio de Kierstan y Bucke, quienes utilizan esferas de alginato polimerizadas con cloruro de calcio para inmovilizar los cloroplastos extraídos sin inhibir el desarrollo de la reacción de Hill en el tiempo (Kierstan & Bucke, 1977).

Entre otro de los métodos de preservación estudiados, la inmovilización de cloroplastos aislados en geles de poliacrilamida es definida en ensayos como el de Ochiai et al., donde se determina la posibilidad de retener la actividad de los fotosistemas I y II aún a temperaturas de 50°C gracias al uso del método de polimerización redox, puesto que la elaboración de un gel de poliacrilamida convencional elimina la actividad de los cloroplastos durante la reacción de polimerización (Ochiai et al., 1977). Este método fue optimizado en un artículo posterior de Ochiai, en el que se destaca un incremento en la capacidad de reducción de dióxido de carbono al ajustar los tiempos de gelación y al emplear reactivos menos abrasivos (Ochiai et al., 1983). Otra técnica de inmovilización es descrita por Karube et al., donde se implementa un gel de agar suplementado con transportadores de electrones, en este estudio se describe una reducción de moléculas de NADP entre 25 y 30°C, con una evolución de hidrógeno estable por las primeras 6 horas de medición (Karube et al., 1981).

Por su parte, Meunier et al. describe el uso de un gel de sílice para la inmovilización y conservación de la funcionalidad de tilacoides, incluyendo agentes protectores como glicerol y seroalbúmina bovina, pero destaca como en esta combinación el uso de glicerol no sostiene efectos favorables para la prolongación de actividad fotosintética, así como que la seroalbúmina bovina representa un buen agente de protección por hasta 6 días (Meunier et al., 2009). A partir de este último estudio, surge la variante descrita por Vaca-Oviedo et al., para inmovilización en gel de sílice con copolímero y ciclohexano posterior a una fase de emulsificación, dando como resultado un valor estable de concentración de clorofilas a y b medida a partir de espectroscopía UV-Vis, aun a temperaturas de 38 °C (Vaca-Oviedo et al., 2020).

Cabe resaltar que, autores como Cocquempot et al., han evaluado múltiples de los métodos descritos anteriormente en condiciones distintas a las originales, siendo un ejemplo de esto su estudio de 1981. En este estudio son aplicadas distintas condiciones de inmovilización de tilacoides extraídos de hojas de lechuga utilizando la producción comparativa de oxígeno a 20 °C bajo luz constante para determinar su efectividad funcional, resultando en la identificación de polímeros de albúmina de suero bovino (20%) y glutaraldehído (0,3% v/v) como el mejor protector de los tilacoides ante la foto inactivación por 50 minutos (Cocquempot et al., 1981). En estudios posteriores de este autor, esta condición se estudia nuevamente, incluyendo la inmovilización en gel de alginato, lo que permite identificar que el uso de glutaraldehído disminuye el grado de actividad del transporte de electrones, pero contribuye significativamente a la estabilización de las funciones fotosintéticas durante hasta 12 horas (Cocquempot & Thomas, 1984; Cocquempot et al., 1982). La influencia de este autor en métodos de preservación estableció las bases para otros estudios, como el de Apostolova et al., donde la incorporación de estos dos agentes protectores en una solución impregnada en un filtro de nitrocelulosa permitió su estabilización a 4°C en oscuridad por hasta 50 días, considerando que a los 5 días de almacenamiento se ve una pérdida del 50% de la actividad fotosintética inicial, aumentando en un 10% aún 50 días después (Apostolova et al., 2011); asimismo, Brouers et al. estudió ambas condiciones de inmovilización, matriz de seroalbúmina bovina-glutaraldehído y matriz de alginato, con el objetivo de generar una optimización en la metodología para otras hojas y evaluar su efectividad en la estabilización de la generación de oxígeno (O₂), resultando en una preservación de actividad fotosintética I y II en más del 80% aún después de cuatro días de exposición, más el reducir el grado de difusión con el medio trae consigo cofactores y la pérdida de actividad únicamente por aislamiento (Brouers et al., 1984). Tomando en cuenta consideraciones similares, en el estudio de Carpentier se describe la inmovilización de membranas fotosintéticas en una matriz reticulada a base de seroalbúmina y glutaraldehído más concentrado, lo que demuestra la capacidad de mantener la actividad de los fotosistemas en frío y en oscuridad durante hasta 9 días (Carpentier, 2008).

Finalmente, otras alternativas más novedosas han surgido con estudios como el de Chen et al., donde se desarrolló un sistema fotosintético artificial basado en unidades de tilacoides aisladas de cloroplastos vegetales, las cuales fueron transformadas en unidades de nano tilacoides y posteriormente recubiertas con membranas plasmáticas derivadas de condrocitos. En este estudio se demostró que los componentes fotosintéticos derivados de cloroplastos pueden mantenerse funcionales mediante estrategias de estabilización bio-miméticas, lo que abre la posibilidad de emplear sistemas fotosintéticos aislados como herramientas para la generación localizada de energía metabólica o moléculas derivadas de la fotosíntesis en sistemas celulares animales (Chen et al., 2022). Por otra parte, el estudio desarrollado por Jang et al. abarca un sistema diseñado para generar oxígeno mediante cloroplastos aislados y estabilizados en un péptido de tránsito derivado de una de sus proteínas, que puede anclarse en su membrana externa e incorporarse dentro de una cápsula de alginato para su integración al medio de aplicación. Los análisis de este sistema demostraron mayor estabilidad estructural, menor liberación de clorofila por degradación y mayor capacidad de generación de oxígeno en condiciones hipóxicas (Jang et al., 2024).

Un resumen de las bases teóricas mencionadas a este punto es presentado a través de la siguiente tabla (**Tabla 4**).

Tabla 4. Estado del arte en estabilización de cloroplastos y tilacoides aislados			
Nombre del artículo	Método de estabilización	Evaluación	Referencia
Storage of isolated chloroplasts without loss of photochemical activity	Sacarosa en solución de almacenamiento (0.5 M, p/v)	Actividad posterior a un año en almacenamiento.	(Gorham & Clendenning, 1950)
Stability of isolated chloroplast preparations and its effect on hill reaction measurements	Glucosa y cloruro en solución de almacenamiento	Estabilización de reacción de Hill.	(Punnett, 1959)
The stabilization of chloroplast function	Albúmina de suero bovino y glicerol en solución de almacenamiento (9 mg/mL o 1% p/v; 10% v/v, respectivamente)	Estabilidad posterior a ciclos de congelado a 0° y atemperado a 4°.	(Wasserman & Fleischer, 1968)

Chloroplast (and Grana): Photosynthetic Electron Transport in Aldehyde Fixed Material	Glutaraldehído en solución de extracción (5% v/v) + Metilamina	Actividad de fotosistemas I y II en el tiempo, posterior a extracción.	(Park, 1970)
Stabilization by glutaraldehyde of high-rate electron transport in isolated chloroplasts	Glutaraldehído en solución de extracción (2.5%, v/v)	Actividad posterior a 5 días de almacenamiento.	(Hardt & Kok, 1976)
Stabilization by glutaraldehyde fixation of chloroplast membranes against inhibitors of oxygen evolution	Glutaraldehído en solución (0.5% v/v, por cada 150ug de clorofila)	Porcentaje de inhibición de evolución de oxígeno y reacción de Hill.	(Zilinskas & Govindjee, 1976)
Stabilization of the photosynthetic activities of isolated spinach chloroplast during prolonged ageing	Albúmina de suero bovino en solución de almacenamiento (1%, p/v)	Actividad de fosforilación posterior a almacenamiento.	(Kulandaivelu & Hall, 1976)
Microencapsulation of Chloroplast Particles	Microencapsulación con gelatina y protamina (10% p/v; 40% p/v) por cada 5 mg/mL de clorofila.	Actividad oxigenante relativa	(Kitajima & Butler, 1976)
The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels	Microencapsulación con alginato de sodio y cloruro de calcio (1% p/v, 0.05 M) por cada 0.2 mg/mL de clorofila.	Evaluación de reacción de Hill por reducción de tinción de DCPIP	(Kierstan & Bucke, 1977)
Immobilization of Chloroplast Photosystems	Inmovilización en gel de poli(acrilamida) con polimerización redox (acrilamida 15%, BIS 2%, Persulfato de amonio 0.02%)	Actividad de fotosistema I y II por estabilización térmica.	(Ochiai et al., 1977)
Cold storage of isolated class C Chloroplasts	Etilenglicol en suspensión de almacenamiento (30% v/v)	Actividad de fosforilación y transporte de electrones	(Farkas & Malkin, 1979)
Hydrogen evolution by co-immobilized chloroplast and C. Butyri.	Inmovilización en gel de agar, (2%).	Evolución de hidrógeno.	(Karube et al., 1981)
Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures	Inmovilización proteica (albúmina y gelatina), en polisacáridos (alginato y carragenina) y polímeros sintéticos (poliuretanos y resinas)	Actividad de liberación de oxígeno y estabilidad en almacenamiento	(Cocquempot et al., 1981)
The stability of electron transport <i>in vitro</i> chloroplast membranes	Albúmina de suero bovino en solución de almacenamiento.	Actividad y estabilidad del transporte de electrones	(Morris et al., 1982)
Co-immobilization effect on H ₂ production by a chloroplast membranes-hydrogenase system	Inmovilización por entrecruzamiento (glutaraldehído y albúmina de suero bovino) y encapsulación en gel de alginato.	Actividad de hidrogenasa y producción de hidrogeno	(Cocquempot et al., 1982)

Immobilized Organelles	Inmovilización en gel de poliacrilamida con polimerización redox (acrilamida 15%, BIS 0.8%, persulfato de potasio 0.02%) por cada 1 mg/mL de clorofila.	Porcentaje de fijación de dióxido de carbono ante exposición de luz	(Ochiai et al., 1983)
Immobilization of chloroplasts, chloroplast membrane fractions and plant cells, and stabilization of the photosynthetic activities for the photoproduction of hydrogen	Inmovilización en matrices de seroalbúmina y glutaraldehído (20% p/v, 0.35% v/v y matrices de alginato (2% p/v)	Actividad de fotosistemas, emisión de fluorescencia, evolución de oxígeno y producción de hidrógeno	(Brouers et al., 1984)
Immobilization of Photosynthetic Membranes in an Albumin-Glutaraldehyde Crosslinked Matrix	Albumina de suero bovino y glutaraldehído en matriz reticulada (20% p/v; 1.5% v/v)	Actividad de fotosistemas y cuantificación de clorofilas	(Carpentier, 2008)
Thylakoids entrapped within porous silica gel: Towards living matter able to convert energy	Inmovilización en gel de sílice utilizando tetraetoxisilano y seroalbúmina (1 M v/v; 15 mg/mL)	Producción y difusión de oxígeno relativa y estabilidad enzimática	(Meunier et al., 2009)
Prolonged sensitivity of immobilized thylakoid membranes in cross-linked matrix to atrazine	Inmovilización impregnada en un filtro de nitrocelulosa, con seroalbúmina y glutaraldehído (20% p/v; 0.33% v/v)	Fluorescencia de clorofila y evolución de oxígeno	(Apostolova et al., 2011)
A plant-derived natural photosynthetic system for improving cell anabolism	Preservación en DMSO y encapsulación en membrana proteica celular	Evaluación de producción de ATP y NADPH.	(Chen et al., 2022)
Oxygenating respiratoid biosystem for therapeutic cell transplantation	Recubrimiento con péptido de tránsito de cloroplastos derivado de proteínas y encapsulamiento en alginato (1.8% p/v).	Medición de oxígeno en condiciones hipóxicas	(Jang et al., 2024)

2.2.2. Desarrollo de hidrogel de alginato fotosintético en una plataforma estructural tipo tamal descelularizado

2.2.2.1. Elaboración de hidrogeles fotosintéticos

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales, caracterizadas por su alto contenido de agua y por una red interna reticulada, elaborados a partir de cadenas de polímeros biocompatibles. Estas plataformas han sido estudiadas y modificadas con el fin de integrar métodos de generación local de oxígeno (Ho et al., 2022; Jiang et al., 2024; J. Zhao et al., 2024). Estos sistemas pueden contar con la integración de un componente fotosintético, como es expresado en la literatura de Maharjan et al. (Maharjan et al., 2022), así como en la revisión académica *“Oxygen-Releasing Hydrogels for Tissue Regeneration”*, donde es analizada su viabilidad en tratamientos en términos de biocompatibilidad, tolerancia mecánica e índice de absorción máximo en el tiempo (Chen et al., 2022; Jiang et al., 2024).

Actualmente, existe una gran cantidad de organismos utilizados en parches de oxigenación fotosintética destinados a aplicaciones médicas. Si bien sus características fisiológicas y necesidades lumínicas para procesos bioquímicos influyen en su grado de versatilidad biomédica (Chávez et al., 2020), las reacciones metabólicas necesarias para su subsistencia en sus unidades fotosintéticas se llevan a cabo de manera similar (Olejniczak et al., 2016). Cabe resaltar que, a pesar de contener microorganismos vivos ajenos al cuerpo, estos parches presentan un alto nivel de biocompatibilidad y biodegradabilidad en el tejido, como indica Maharjan et al., cuya investigación resalta la integración de microalgas en matrices encapsuladas capaces de preservar su viabilidad y permitir una liberación controlada de oxígeno en ambientes hipóxicos (Maharjan et al., 2022; Wang et al., 2022). Complementariamente, gracias a su liberación sostenida de oxígeno, se consideran un método eficaz para la proliferación, migración y diferenciación celulares, además de actuar como un sistema promotor de la angiogénesis y proporcionar una base que facilita la síntesis de matrices extracelulares (Chávez et al., 2020; Maharjan et al., 2022; Wang et al., 2022).

Estudios como el de Hopfner et al. incorporan las microalgas en un biomaterial poroso, lo que permite su viabilidad sin comprometer la capacidad de liberación de oxígeno a lo largo del tiempo (Hopfner et al., 2014). De forma similar, Chávez et al. incorporan sus microalgas en biomateriales destinados a ser implantados, permitiendo evidenciar que los organismos fotosintéticos pueden mantenerse funcionales (Chávez et al., 2016); un punto relevante en la literatura actual es descrito inicialmente por Corrales-Orovio et al., donde se abarca el diseño de hidrogeles bioactivos capaces de generar oxígeno y, de igual forma, promover la viabilidad celular bajo iluminación en un material biocompatible, al que, además, se le realizan modificaciones para cargar moléculas bioactivas o antibióticos y ampliar su potencial terapéutico en el tratamiento de heridas (Corrales-Orovio et al., 2023). Por su parte, los autores Wang et al. y Chen et al. desarrollaron un sistema de biomaterial fotosintético basado en la encapsulación de microalgas y potenciaron este tipo de plataformas terapéuticas en ambientes hipóxicos, incluyendo variantes que permitieran controlar respuestas biológicas adversas al ser aplicadas en el futuro (Chen et al., 2022; Wang et al., 2022). Dado el rápido desarrollo de este tipo de hidrogeles, se han establecido las bases mediante ensayos preclínicos y clínicos, como el de Obaid et al., en el que se emplea una variable de dichos andamios cargados con microalgas directamente en heridas superficiales, lo que arroja resultados clínicos positivos, lo que demuestra que la implantación de estos sistemas es segura y bien tolerada por los pacientes (Obaid et al., 2021).

En el estudio liderado por Chen et al., se definieron sistemas bio-híbridos basados en tilacoides para internalización, capaces de generar ATP y NADPH bajo iluminación (Chen et al., 2022). De forma similar, Zhang et al. desarrolló plataformas nanométricas fotosintéticas diseñados para suministrar oxígeno de manera localizada y mejorar terapias antitumorales limitadas por la hipoxia del microambiente tumoral, resultando en la modulación del microambiente tisular y mejorar en la viabilidad celular en condiciones de responsabilidad de oxígeno (Zhang et al., 2024), mientras que Jang et al. diseñó modelos bio-híbridos, también a través de nano encapsulaciones, totalmente funcionales al evaluar la estabilidad del sistema y generar oxígeno aún en condiciones hipóxicas (Jang et al., 2024). Por

otra parte, una aplicación alternativa interesante de este tipo de hidrogeles ha sido presentada por Liu et al., donde se detalla la creación y aplicación de un sistema bio-híbrido basado en nano cápsulas de cianobacterias diseñadas para modular el microambiente hipóxico en el tratamiento del infarto de miocardio, lo que demuestra el dinamismo en el campo que estas tecnologías generan (Liu et al., 2022).

Si bien el campo de hidrogeles fotosintéticos se mantiene en desarrollo, los artículos más recientes coinciden en la búsqueda por un método de modulación de microambiente tisular prolongada. El estudio de Xing et al. reportó el desarrollo de un hidrogel fotosintético compuesto a base de carboximetil quitosano (CMCS) y microalgas, diseñado como biomaterial de apósito para promover la cicatrización de heridas mediante la liberación localizada de oxígeno. A diferencia de otros sistemas en los que la formación del hidrogel requiere temperaturas elevadas o largos tiempos de gelificación, los autores implementaron un mecanismo de reticulación foto inducida, lo que permitió encapsular las microalgas en condiciones suaves y preservar su viabilidad metabólica, manteniendo una estructura porosa estable que favorece el intercambio de gases y nutrientes (Xing et al., 2025). Por su parte, Lv et al. desarrolló un sistema terapéutico compuesto por un hidrogel derivado de plantas combinado con nano-unidades provenientes de cloroplastos (NCU) de hojas, con el objetivo de tratar lesiones por infarto de miocardio mediante la reducción de hipoxia tisular, demostrando a través de modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* que la combinación de hidrogel y NCU mostró los mejores resultados terapéuticos, reduciendo el daño tisular y mejorando la recuperación cardíaca, a través del soporte metabólico prolongado de los tejidos involucrados (Lv et al., 2025). Por su parte, Zhang et al. presenta en su estudio más reciente el desarrollo de hidrogel fotosintético vivo reforzado, termosensible y fabricado mediante impresión 3D, diseñado como parche adaptable para promover la cicatrización de heridas mediante oxigenación localizada, cuya estructura fue optimizada para mejorar la retención microbiana, resistencia mecánica y adaptación a la superficie de la herida, superando limitaciones comunes de los biomateriales fotosintéticos como la posible fuga microbiana o la activación inmunológica (H. Zhang et al., 2026).

Por su parte, la integración de sistemas fotosintéticos específica de las microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* ha mantenido su relevancia en el área de bioingeniería de tejidos en las últimas décadas. En el estudio de Cui et al. se describe la elaboración de un hidrogel de microalgas en una matriz de gelatina y carrageninas, que presentó propiedades antimicrobianas y de liberación sostenida de oxígeno, además de buenas propiedades mecánicas, adhesivas y homeostáticas, así como alta compatibilidad con células animales y la capacidad de acelerar la curación de heridas en ensayos *in vivo* (Cui et al., 2025). De forma similar, Tarsitano et al. desarrolla un hidrogel con microalgas incorporadas en una matriz de gelatina y alginato como método para evaluar su grado de citotoxicidad en esferoides cardíacos, variando las concentraciones del agente fotosintético, en condiciones de normoxia e hipoxia, de manera que para la segunda condición se observa como la presencia de la microalga reduce la sensibilidad celular gracias a la producción de oxígeno, siempre que la concentración de microalgas no aumentase por encima de los diez millones de células (Tarsitano et al., 2025). Además, regionalmente destaca el estudio de Adams Quintana, donde se describe la integración y proliferación de esta especie en andamios descelularizados de origen animal, específicamente tejido submucoso intestinal porcino, obteniendo una matriz biocompatible capaz de generar oxígeno de forma sostenida por hasta 7 horas, bajo condiciones de luz y temperatura constante, y presenta indicios de biocompatibilidad a través de ensayos *in vivo* (Adams Quintana, 2025). Finalmente, el ensayo de Zhang et al. describe la elaboración de una matriz de hidrogel enriquecida para promover la supervivencia y el crecimiento, principalmente, de las microalgas incorporadas, con resultados positivos en su capacidad de producción de oxígeno y en el incremento estable del contenido de clorofila durante 7 días. Adicionalmente, en este estudio se describe un aumento de la proliferación celular, migración y angiogénesis atribuido a las capacidades de oxigenación del hidrogel en ensayos *in vitro*, así como la promoción de la vascularización y la regeneración tisular de heridas diabéticas en ensayos *in vivo*.

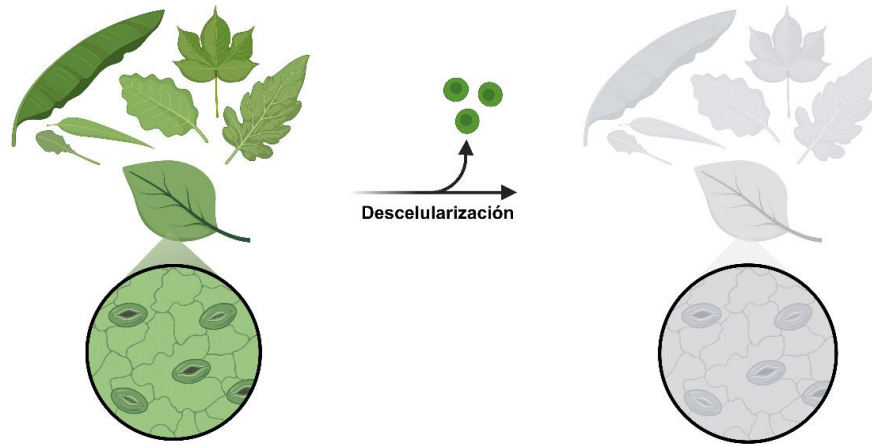
Un resumen de las bases teóricas relacionadas a la temática, previamente mencionadas, es presentado a través de la siguiente tabla (**Tabla 5**).

Tabla 5. Estado del arte en hidrogeles fotosintéticos			
Nombre del artículo	Componentes	Resumen	Referencia
Development of photosynthetic biomaterials for <i>in vitro</i> tissue engineering	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> en matriz de fibrina y colágeno en andamio poroso.	- Integración viable de microalgas en cultivos compartidos con fibroblastos. - Mejora en la supervivencia celular en cultivos 3D hipóxicos. - Demostración de capacidad de andamios fotosintéticos como fuentes de oxígeno.	(Hopfner et al., 2014)
Towards autotrophic tissue engineering: Photosynthetic gene therapy for regeneration	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> modificada en andamio de colágeno dérmico.	- Introducción del concepto de ingeniería tisular autotrófica. - Modificación genética de andamios <i>in vivo</i> para liberar moléculas <i>in situ</i>. - Mejora en la oxigenación en tejidos con baja vascularización, tras implante.	(Chávez et al., 2016)
A First in Human Trial Implanting Microalgae Shows Safety of Photosynthetic Therapy for the Effective Treatment of Full Thickness Skin Wounds	Matrices de alginato, gelatina, polietilenglicol, alojadoras de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	- Primer ensayo clínico en humanos de terapia fotosintética. - Aplicación de andamios con microalgas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>, evidenciando su capacidad oxigenante - Demostración de baja respuesta inmunológica 90 días post implante.	(Obaid et al., 2021)
A plant-derived natural photosynthetic system for improving cell anabolism	Tilacoides / cloroplastos incorporados en hidrogeles sintético de polietilenglicol	- Generación de nano unidades fotosintéticas para la obtención de ATP y NADPH. - Evaluación de la internalización del sistema y transferencia funcional de fotosíntesis a terceros.	(Chen et al., 2022)
In Situ 3D Bioprinting Living Photosynthetic Scaffolds for Autotrophic Wound Healing	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> estabilizadas con un hidrogel de alginato.	- Mantenimiento de actividad fotosintética de microalgas dentro de un hidrogel impreso <i>in situ</i>. - Aplicación de la liberación sostenida de oxígeno en heridas diabéticas.	(Wang et al., 2022)
Photoresponsive Hydrogel-Coated Up conversion Cyanobacteria Nano capsules for Myocardial Infarction Prevention and Treatment	Cianobacterias en capsulas con hidrogel foto sensible de metacrilato de gelatina y nanopartículas de conversión ascendente.	- Sistema bio-híbrido de cianobacterias en nano cápsulas recubiertas con hidrogel. - Desarrollo de un sistema de control para la producción de oxígeno mediante estimulación lumínica.	(Liu et al., 2022)
Living microecological hydrogels for wound healing	<i>Chlorella</i> y <i>Bacillus subtilis</i> estabilizadas en un hidrogel termosensible con F127 y poli dopamina	- Ensayo con un sistema generador de oxígeno y reductor de colonias bacterianas patogénicas. - Mejora en el microambiente celular hipóxico de heridas diabéticas	(G. Chen et al., 2023)
Development of a photosynthetic hydrogel as potential wound dressing for the local delivery of oxygen and bioactive molecules	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> integrada en hidrogeles de alginato	- Biomaterial pionero en el estudio de actividad fotosintética sostenida. - Demostración de alta biocompatibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, cubriendo las necesidades metabólicas de oxígeno.	(Corrales-Orovio et al., 2023)

Oxygenating respiratoid biosystem for therapeutic cell transplantation	Tilacoides / cloroplastos incorporados en esferas de alginato con células.	- Desarrollo de sistema híbrido con alta estabilidad en entornos biológicos. - Limitación en la cantidad de oxígeno producida, proporcional a la iluminación disponible.	(Jang et al., 2024)
Preparation of photo-crosslinked microalgae-carboxymethyl chitosan composite hydrogels for enhanced wound healing	Hidrogel de carboximetil quitosano con <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	- Ensayo con foto reticulación para formar el hidrogel bajo condiciones suaves que preservan la viabilidad de las microalgas. - Evaluación de la producción de oxígeno sostenida en el tiempo	(Xing et al., 2025)
Plant-derived hydrogel and photosynthetic nano-units for myocardial infarction therapy.	Unidades cloroplásticas derivadas de hojas vegetales en una matriz de ácido glicirrónico y un polisacárido natural extraído de <i>glycyrrhiza</i> .	- Compensación del déficit energético asociado a la hipoxia, modulando los procesos celulares con el suplemento de ATP y NADPH. - Desarrollo de un hidrogel vegetal basado en ácido glicirrónico combinado con unidades derivadas de cloroplastos.	(Lv et al., 2025)
Chlorella-encapsulated living hydrogel based on gelatin and carrageenan with oxygen production, hemostatic and antibacterial capacity for promoting wound healing	Hidrogel de gelatina, carragenina k y carragenina I, cargados con microalgas <i>Chlorella vulgaris</i>	- Elaboración de hidrogel antimicrobiano y con la capacidad de liberar oxígeno, capaz de acelerar el proceso de curación de heridas. - Obtención de un hidrogel con gran habilidad homeostática y compatibilidad con células y sangre.	(Cui et al., 2025)
Chlorella-enriched hydrogels protect against myocardial damage and reactive oxygen species production in an <i>in vitro</i> ischemia/reperfusion model using cardiac spheroids	Matriz de alginato y gelatina con microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> a distintas concentraciones.	- Obtención de hidrogel con propiedades mecánicas estables, sin alteración en su porosidad a concentraciones menores de los diez millones de microalgas. - Reducción en la sensibilidad de células anexas ante ambientes hipóxicos, bajo una fuente de luz.	(Tarsitano et al., 2025)
Desarrollo de un apósito de submucosa intestinal descelularizada y microalgas como tratamiento para lesiones cutáneas crónicas	Matriz de submucosa descelularizada enriquecida con microalgas <i>Chlorella vulgaris</i>	- Obtención de andamio biocompatible derivado de tejido porcino, capaz de promover el crecimiento celular. - Producción de oxígeno sostenida, bajo iluminación, por hasta 7 horas.	(Adams Quintana, 2025)
3D-printable reinforced photosynthetic living hydrogel patches for accelerated wound healing	Hidrogel de diacrilato de Pluronic F127/diacrilato de polietilenglicol, encapsulador de microalgas y cianobacterias	- Encapsulación estable de organismos fotosintéticos en una matriz termosensible. - Producción de oxígeno bajo iluminación para la promoción de la angiogénesis y deposición de colágeno, acelerando la cicatrización de heridas.	(S. Zhang et al., 2026)
Nutrient Matrix-Supplying Hydrogel for <i>Chlorella vulgaris</i> Promotes Diabetic Wound Healing	Hidrogel de <i>Chlorella vulgaris</i> con ácido hialurónico, ceramida, urea, extracto de <i>Portulaca oleracea</i> , niacinamida y PGP.	- Incorporación de microalgas en hidrogel complejo como método para promover su supervivencia y crecimiento dentro de la matriz por más de 7 días en luz constante. - Demostración de compatibilidad en ensayo <i>in vivo</i> obteniendo reducciones en las respuestas inflamatorias de heridas diabéticas, con el suministro de oxígeno	(H. Zhang et al., 2026)

2.2.2.2. Desarrollo de andamios descelularizados a partir de hojas

Figura 6. Proceso simplificado de la descelularización de hojas. Creado con BioRender.



Los andamios descelularizados de origen vegetal representan una alternativa prometedora frente a matrices de origen animal o sintético, principalmente debido a su bajo costo, amplia disponibilidad y arquitectura inherente, así como su versatilidad. Los procesos de descelularización vegetal buscan eliminar de forma eficiente el contenido celular, preservando la estructura tridimensional de la pared celular y, en algunas aplicaciones, su red vascular (Adamski et al., 2018; Gershlak et al., 2017; Harris et al., 2021; Shang et al., 2024) y ciertos protocolos han mostrado aplicabilidad en múltiples sistemas vegetales, a pesar de sus diferencias en composición estructural (Toker et al., 2020) (**Figura 6**). Autores como Gershlak et al. describen el potencial de estos andamios vegetales para asimilar estructuras vascularizadas, dada la complejidad orgánica de múltiples especies de plantas desde hace poco menos de una década. Su publicación *“Crossing kingdoms: using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds”* demuestra firmemente la viabilidad del uso de plantas descelularizadas como un método sostenible para la elaboración de andamios de ingeniería tisular, sin haber realizado ensayos clínicamente relevantes (Gershlak et al., 2025; Gershlak et al., 2017). A partir de estos estudios, otros autores han enfocado su investigación en el desarrollo de andamios vegetales a través de la implementación de metodologías derivadas, en las que se resaltan enfoques dedicados a la preservación estructural para su uso como bases de crecimiento celular con objetivos de regeneración celular (Fontana et al., 2017) y de implementación en la industria (Jones et al., 2021). Asimismo, se

destacan los estudios enfocados en la descelularización de tejidos vegetales con un alto grado de rigidez, que aplican métodos con y sin la integración de agentes detergentes, con el fin de disminuir la toxicidad de la superficie en los andamios resultantes (Adamski et al., 2018).

En el estudio realizado por Dikici et al. se evalúa el potencial de las hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*) como andamios biomateriales para aplicaciones en ingeniería de tejidos y en estudios de angiogénesis, mediante un proceso de descelularización y posterior recubrimiento para permitir la adhesión de fibroblastos. Este artículo demuestra una colonización celular alta a nivel superficial de la hoja, concluyendo en su potencial como plataforma tridimensional útil para ingeniería de tejidos (Dikici et al., 2019). Mientras Dikici evalúa el potencial de estas hojas en la angiogénesis fibroblástica, el ensayo de Salehi et al. evalúa su capacidad como estructuras tridimensionales para el cultivo y diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales, lo que resulta en la identificación de beneficios estructurales que favorecen la adhesión, proliferación y diferenciación celular en comparación con los controles (Salehi et al., 2020). De forma similar, Robbins et al. exploraron el uso de las hojas de espinaca descelularizadas como andamios para la regeneración de tejido cardíaco contráctil *in vitro*, aprovechando la arquitectura vascular natural de la hoja y su potencial como una red de perfusión de nutrientes, con resultados positivos aun sin la inclusión de recubrimientos proteicos superficiales (Robbins et al., 2020). Por su parte, Harris et al. investigaron las propiedades biomecánicas dinámicas de hojas de espinaca descelularizadas como biomateriales para ingeniería de tejidos; no obstante, a diferencia de trabajos previos que se enfocaron principalmente en biocompatibilidad y adhesión celular, este estudio analizó si los andamios vegetales pueden soportar deformaciones mecánicas cíclicas similares a las presentes en tejidos fisiológicos, particularmente en órganos sometidos a movimiento continuo. Este ensayo demostró que las hojas descelularizadas pueden soportar deformaciones cíclicas durante al menos 24 horas, manteniendo su arquitectura estructural y su capacidad de retención de agua (Harris et al., 2021). Similarmente, el estudio de Gorbenko et al. explora el desarrollo de injertos vasculares mediante hojas vegetales reforzadas con gelatina reticulada, como un

método para aumentar su durabilidad y mejorar su capacidad de soporte en condiciones similares a las de los vasos sanguíneos. Los resultados de esta investigación demostraron una estructura vascularizada capaz de redirigir el flujo de fluidos a través de los canales naturales del tejido vegetal, con una resistencia mecánica y compatibilidad celular mejoradas (Gorbenko et al., 2023).

La implementación de hoja de espinaca descelularizada en estudios más recientes ha cobrado un punto de interés similar desde su primera introducción a la biotecnología moderna, con estudios como el de Raundal et al. donde son utilizadas como matriz tridimensional para promover la diferenciación osteogénica de células madre gracias a la aplicación de un método de descelularización con menor grado de citotoxicidad resultante (Raundal et al., 2024), el estudio de Ksouri et al. donde se aplican bajas concentraciones de detergentes comunes para generar una matriz descelularizada antibacteriana y biocompatible con fibroblastos en ensayos *in vitro* para evaluación de procesos de cicatrización (Ksouri et al., 2024), la investigación del autor Serkan Dikici donde se utilizan como una plataforma tridimensional para la liberación controlada de ácido ascórbico como método para promover la síntesis de colágeno de fibroblastos en cicatrización (Dikici, 2024), y el artículo de Filiz et al. cuya implementación se basa en la generación de una plataforma vascularizada capaz de emular un ambiente controlado para distintas etapas de crecimiento de células cancerígenas (Filiz et al., 2024).

El concepto del autor Lacombe et al. introduce la descelularización de hojas de espinaca, tomate, entre otras, en la que la biocompatibilidad de las estructuras se evalúa en paralelo con la identificación de la señalización celular o mecano transducción en los cultivos (Lacombe et al., 2020). En este estudio se realizó un análisis en las capacidades de modificación del comportamiento celular en comparación con los modelos tradicionales de cultivo bidimensional, utilizando un sustrato como medio de adhesión en este ensayo se obtuvieron resultados positivos hacia la proliferación y formación de capas celulares, así como en la identificación de propiedades mecánicas blandas que alteran la mecano transducción celular útil

para emular entornos celulares fisiológicamente más realistas que los cultivos en plásticos rígidos (Harris et al., 2021; Lacombe et al., 2020).

Los autores Walawalkar y Almelkar desarrollan una perspectiva diferente, en la que se propone la implementación de hojas de col como andamios para la generación de constructos tisulares previamente vascularizados de gran tamaño, óptimos para el crecimiento de células endoteliales, lo que se traduce en la obtención de un medio de gran tamaño, en comparación con otros andamios descelularizados similares, con baja citotoxicidad y adecuada viabilidad celular (Walawalkar & Almelkar, 2021). De forma similar, el estudio desarrollado por Salehi et al. evalúa el potencial de los andamios descelularizados derivados de esta hoja, col o repollo, para promover la diferenciación de células osteogénicas a partir de células madre, y demuestra que la matriz tridimensional presenta propiedades estructurales favorables para la adhesión y proliferación celulares, con una mayor actividad indicadora de diferenciación en comparación con los cultivos en placa (Salehi et al., 2021). Otra variante en el ámbito de la descelularización de hojas surge con la implementación de hojas de tomate, como la estudiada por Ahmadian et al., en la que se resalta su utilidad como andamios tridimensionales naturales para el modelado de microambientes tumorales hepáticos *in vitro*, mediante la implementación de células de carcinoma hepatocelular en su superficie, lo que demuestra adhesión celular, crecimiento y mantenimiento de la viabilidad durante varios días (Ahmadian et al., 2023). Además, recientemente han aumentado la cantidad de autores que han optado por la aplicación de hojas de especies endémicas y abundantes de su región, como es el estudio de Kim Sun Woo, donde se evalúa el uso de hojas de canola descelularizadas como biomaterial vegetal para aplicaciones en reparación cardíaca tras infarto de miocardio, desarrollando un método de descelularización basado en detergentes para eliminar los componentes celulares del tejido vegetal, preservando la arquitectura estructural de la matriz vegetal compuesta por celulosa y lignina, resultando no solo en una plataforma capaz de soportar la viabilidad de fibroblastos cardíacos sino capaz de reducir la liberación de citocinas inflamatorias y evitar la transición génica asociados con fibrosis patológica (Kim, 2025).

Por su parte, la hoja de *Musa x paradisiaca L.*, comúnmente conocida como hoja de banana, ha sido incorporada en múltiples estudios analíticos por varias décadas (Jiang et al., 2022; Jumaidin et al., 2021; Leiva-Mora et al., 2010; Wahyudi et al., 2022), incluyendo detalles de la topografía y tensión con utilidad comparativa (Andrade-Martínez et al., 2026); no obstante, su potencial como andamio descelularizado no fue descrito hasta hace unos años bajo el estudio de Banavar et al., donde se establece el desarrollo de una plataforma que actuase como base estructural para el crecimiento celular. Este estudio estableció un punto de referencia para los protocolos de descelularización en hojas tropicales cuyas características de grosor e impermeabilidad las hacen un sistema no ideal para otros métodos previamente aplicados en otras especies, dando como resultado la clara identificación del rol que tienen en el comportamiento celular para siembras en esta estructura tridimensional y el favorecimiento que un andamio estable, además de biodegradable y de bajo costo, como la de esta hoja descelularizada puede tener en aplicaciones de ingeniería tisular (Banavar et al., 2024).

En contraste, en la literatura revisada no fue posible identificar investigaciones directamente relacionadas con la descelularización de las hojas de *Calathea lutea*, conocida como bijao. No obstante, sus características químicas, físicas, mecánicas y térmicas (Zulkarnain et al., 2025) expresan similitud con las de la hoja de *Musa x paradisiaca L.*, así como con las de otras hojas estudiadas en el estudio de Andrade-Martínez et al. (Andrade-Martínez et al., 2026), además de ser cultivados en ambientes tropicales similares, como se ha estudiado indirectamente por Schmitt et al. (Schmitt & Frank, 2013). De forma complementaria, el estudio de Hasan et al. resalta la generalidad funcional de protocolos refinados aplicados a sistemas vegetales similares, logrando una descelularización total y la conservación estructural, dentro de los límites mecánicos de cada una de las plantas en su estado nativo (Hasan et al., 2024).

A continuación, se presenta un resumen de las bases teóricas expuestas hasta este punto, las cuales abarcan los principales pilares e información actualizada en relación con el campo de descelularización vegetal, a manera de tabla (**Tabla 6**).

Tabla 6. Estado del arte en andamios vegetales descelularizados

Nombre del artículo	Materia prima	Resumen	Referencia
Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds	Hojas de <i>Spinacia oleracea</i> , <i>Petroselinum crispum</i> y <i>Artemisia annua</i>	- Primera demostración de viabilidad de plantas descelularizadas en ingeniería de tejidos. - Definición de límites en el método de perfusión para descelularización de hojas. - Andamios descelularizados obtenidos capaces de sostener la viabilidad de células adheridas por 21 días.	(Gershlak et al., 2017)
Biofunctionalized Plants as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture	Hojas de <i>Anthurium</i> , <i>Petroselinum crispum</i> , <i>Calathea zebrina</i> , <i>Solenostemon</i> y tallos de <i>Bambusoideae</i> , <i>Orchidaceae</i> y <i>Vanilla</i>	- Aplicación de andamios de tejido vegetal descelularizado como plataforma de cultivo. - Integración de técnica de funcionalización para promover la adhesión celular. - Definición de relación entre la expansión celular animal y las características hidrofílicas de los tejidos vegetales.	(Fontana et al., 2017)
Two Methods for Decellularization of Plant Tissues for Tissue Engineering Applications	Hoja de <i>Ficus hispida</i> , <i>Pachira aquatica</i>	- Aplicación de dos métodos de descelularización, con y sin la inclusión de detergentes. - Definición de mayor o menor grado de biocompatibilidad con propiedades mecánicas óptimas e impacto metabólico celular bajo.	(Adamski et al., 2018)
Decellularized baby spinach leaves and their potential use in tissue engineering applications: Studying and promoting neovascularization	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Ensayo de biocompatibilidad <i>in vitro</i> enfocado en neovascularización. - Obtención de baja toxicidad celular al realizar siembra fibroblástica con sustrato. - Determinación de actividad angiogénica positiva en células endoteliales.	(Dikici et al., 2019)
Efficient mineralization and osteogenic gene overexpression of mesenchymal stem cells on decellularized spinach leaf scaffold	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Obtención de andamio tridimensional adecuado para adhesión y crecimiento celular de células madre. - Ensayo de diferenciación osteogénica desarrollado sobre el andamio mostró mayor mineralización que aquellas cultivadas en placas.	(Salehi et al., 2020)
Creation of a contractile biomaterial from a decellularized spinach leaf without ECM protein coating: An <i>in vitro</i> study	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Definición de viabilidad de cultivos cardíacos contráctiles de hojas naturalmente vascularizadas. - Evalúa la capacidad de adhesión y organización celular sin recubrimientos superficiales de la matriz extracelular.	(Robbins et al., 2020)

Plant-Based Scaffolds Modify Cellular Response to Drug and Radiation Exposure Compared to Standard Cell Culture Models	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i> , <i>Solan. pycopersicum</i> , <i>Echino. grisebachii</i> , <i>Dracaena sanderiana</i> , <i>K. fedtschenkoi</i>	- Ejecución de protocolo funcional para múltiples especies de hoja, manteniendo su arquitectura vascularizada. - Determinación de relación entre las propiedades mecánicas blandas y la actividad de señalización de rigidez del entorno de las células.	(Lacombe et al., 2020)
Fabricating a pre-vascularized large-sized metabolically-supportive scaffold using Brassica oleracea leaf	Hoja de <i>Brassica oleracea</i>	- Definición de protocolo para descelularizaciones de gran tamaño, sin comprometer la integridad vascular del andamio. - Aplicación como andamio viable para la manutención de la actividad metabólica de células.	(Walawalkar & Almelkar, 2021)
Cabbage-derived three-dimensional cellulose scaffold-induced osteogenic differentiation of stem cells	Hoja de <i>Brassica oleracea</i>	- Desarrollo de protocolos de descelularización y caracterización de hojas de gran tamaño y rigidez. - Identificación de aumento en la actividad fosfatasa alcalina y mineralización de las células madre mesenquimales cultivadas.	(Salehi et al., 2021)
Decellularized Spinach Biomaterials Support Physiologically Relevant Mechanical Cyclic Strain and Prompt a Stretch-Induced Cellular Response	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Aplicación de fuerza para deformación mecánica cíclica dentro del rango fisiológico de la respiración pulmonar, sin perder su estructura ni porosidad. - Determinación de propiedades elásticas comparables con tejidos biológicos.	(Harris et al., 2022)
Small-Caliber Vascular Grafts Engineered from Decellularized Leaves and Cross-Linked Gelatin	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Implementación de recubrimiento con gelatina reticulada de hojas descelularizadas para mejorar las propiedades mecánicas y estabilidad de andamios pequeños. - Obtención de un material promotor de la adhesión celular y flujo a través de canales preservados.	(Gorbenko et al., 2023)
<i>In vitro</i> modeling of hepatocellular carcinoma niche on decellularized tomato thorny leaves: a novel natural three-dimensional (3D) scaffold for liver cancer therapeutics	Hoja de <i>Solanum lycopersicum</i>	- Desarrollo de microambientes tumorales hepáticos <i>in vitro</i> a partir de estructuras porosas de tejido vegetal y matriz de celulosa. - Implementación de pruebas de adhesión, proliferación y viabilidad sostenible tridimensional.	(Ahmadian et al., 2023)
Decellularized banana leaves: eco-friendly scaffolds for cell-based seafood	Hoja de <i>Musa paradisiaca</i> x <i>L</i>	- Definición de protocolo de obtención de matriz a partir de hojas tropicales. - Aplicación de recubrimientos para favorecer la adhesión y proliferación celular de líneas capaces de soportar menores o mayores temperaturas para cultivos en muestras.	(Banavar et al., 2024)

Decellularized leaf-based biomaterial supports osteogenic differentiation of dental pulp mesenchymal stem cells	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Definición de protocolo libre de detergentes para la obtención de una matriz libre de material genético. - Identificación de un nivel significativamente bajo de citotoxicidad promotor de adhesión, proliferación y diferenciación de células madre de origen dental.	(Raundal et al., 2024)
Biocompatible and Safe Decellularized Spinach With Antibacterial and Wound Healing Activity	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Aplicación de métodos de descelularización a bajas concentraciones de detergentes capaz de promover su capacidad antibacteriana. - Implementación como base óptima para ensayos de cicatrización con fibroblastos.	(Ksouri et al., 2024)
Decellularized plant-derived vasculature-on-a-chip interacting with breast cancer spheroids to evaluate a dual-drug therapy	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Aplicación de matriz para emular un ambiente vascularizado aplicable en ensayos de simulación tumoral para cáncer de mama. - Obtención de bio-mimética útil para identificar y reproducir etapas críticas en la progresión de células cancerígenas y evaluar la respuesta de tratamientos en cada una.	(Filiz et al., 2024)
Enhancing wound regeneration potential of fibroblasts using ascorbic acid-loaded decellularized baby spinach leaves	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Definición de matriz liberadora de ácido ascórbico para promover la cicatrización de heridas. - Identificación de aumento en la actividad metabólica de las células fibroblásticas después de 21 días.	(Dikici, 2024)
Biocompatibility of decellularized spinach leaves	Hoja de <i>Spinacia oleracea</i>	- Aplicación de método de descelularización con baja concentración de detergente, capaz de sostener redes vascularizadas aisladas. - Evaluación en modelo murino de biocompatibilidad resultando en una baja respuesta inmunológica cuatro semanas después de la integración.	(Gershlak et al., 2025)
Decellularized Canola Leaves as a Bio scaffold for Cardiac Repair	Hoja de <i>Brassica napus</i>	- Desarrollo de protocolo de descelularización basado en detergentes sin afectar la matriz de celulosa y lignina. - Identificación de viabilidad celular y expresión de respuestas moleculares comparables a las observadas con biomateriales de origen animal utilizados clínicamente - Obtención de análisis de expresión génica y secreción de citocinas indicativas de una disrupción en el crecimiento de las células.	(Kim, 2025)

2.3. Tecnologías disponibles en el mercado asociadas a la investigación

Las terapias tópicas de oxígeno surgen del aumento de las incidencias de laceraciones en el cuerpo humano, de gravedad variable, en comunidades donde la aplicación de potenciadores aeróbicos puede ser beneficiosa (Loh et al., 2021; Nagarsheth et al., 2024), así como en pacientes con condiciones que modulan el microambiente celular (Chang et al., 2019; Nagarsheth et al., 2024). En el mercado actual, el tipo de tecnologías incorporadas como parte de estas terapias están compuestas por una estructura que mima la matriz celular capaz de promover la angiogénesis, normalmente a través de un hidrogel, una parte protectora de contaminantes exteriores y la integración de un agente oxigenante capaz de promover la respiración en las células cercanas, consecuentemente acelerando el proceso de cicatrización (Oropallo & Andersen, 2023; Su et al., 2024). Un listado con las tecnologías tópicas disponibles en el mercado actual, que cuentan con las características previamente descritas, es presentado a continuación (**Tabla 7**):

- NATROX®: estructura promotora de la cicatrización mediante la generación de oxígeno a partir de la electrólisis del agua, administrada con un sistema de entrega colocado directamente sobre la herida (Sayadi et al., 2018).
- GRANULOX®: sistema de atomización para aplicación tópica, basado en hemoglobina, para mejorar la difusión de oxígeno en heridas crónicas. Este es un producto de grado médico para uso directo en el área de la herida, lo que permite la oxigenación tisular por difusión (Loh et al., 2021).
- KADAM™ / VELOX Care: dispositivo médico de terapia tópica capaz de liberar oxígeno puro, a temperaturas de 39 a 42°C, directamente en el área de la lesión cutánea (Maiya et al., 2022).
- TWO2® Therapy: terapia avanzada de suministro de oxígeno tópico con presión cíclica que combina un sistema de alta compresión para promover la cicatrización de heridas complejas (Frykberg, 2021; Garoufalidis, 2025).
- OxyBand™ Wound Dressing: apósito capaz de liberar oxígeno de alta pureza directamente en el lecho de la herida, al contener el gas de grado médico almacenado en una membrana especialmente diseñada para liberar el gas de forma controlada hacia el tejido, entre sus capas (Laird et al., 2014).

Tabla 7. Estudios clínicos asociados a las tecnologías de oxigenación disponibles en el mercado para uso hospitalario en tratamientos cutáneos			
Tecnología	Estudio asociado	Tipo	Resumen
NATROX®	"An Observational Clinical Trial Examining the Effect of Topical Oxygen Therapy (Natrox™) on the Rates of Healing of Chronic Diabetic Foot Ulcers (OTONAL Trial)" (Tang et al., 2024)	Ensayo clínico	Tratamiento en 20 pacientes con úlceras crónicas de pie diabético de 12 semanas, el 70% de los pacientes presentó una reducción del área de la úlcera superior al 75%, con una reducción media del 91.3% y un tiempo promedio de cierre completo de aproximadamente 78 días.
GRANULOX®	"Pilot study: hemoglobin spray in the treatment of chronic diabetic foot ulcers" (Chadwick, 2014)	Ensayo Piloto	Aplicación de hemoglobina en spray en cuatro pacientes con úlceras diabéticas crónicas con dificultad de curación, resultando en la cicatrización total de dos de las lesiones y una reducción significativa en tamaño posterior a dos semanas de tratamiento.
	"Clinical effectiveness of hemoglobin spray (Granulox®) as adjunctive therapy in the treatment of chronic diabetic foot ulcers" (Hunt & Elg, 2016)	Ensayo clínico	Estudio en 40 pacientes con úlceras diabéticas crónicas, donde la aplicación de hemoglobina en spray en conjunto con los tratamientos para heridas convencionales resultó en evidentes mejoras en el proceso de cicatrización, reducción de tamaño, dolor y exudación perceptible desde la primera semana.
KADAM™ / VELOX Care	"Topical Controlled Warm Oxygen Therapy Delivered Through a Novel Device (KADAM™) to Treat Diabetic Foot Ulcers: A Randomized controlled, Open, Pilot Trial" (Anirudh et al., 2021)	Ensayo piloto	Aplicación de dispositivo en un grupo de 20 pacientes con úlceras, donde se consiguió una reducción de tamaño en las lesiones a las 6 semanas de aplicación. No obstante, se identifican fallos en el sistema de alimentación del dispositivo e incomodidad en algunos pacientes.
	"KADAM topical warm oxygen therapy device for diabetic foot ulcer - a novel approach"(Maiya et al., 2022)	Ensayo clínico	Estudio en 40 pacientes diabéticos, con úlceras de pie diabético con dificultad de cicatrización. La aplicación del dispositivo demostró asistencia en el proceso de curación total, sin registrar efectos adversos severos en los participantes.
TWO2® Therapy	"Topical wound oxygen therapy in the treatment of severe diabetic foot ulcers: a prospective controlled study" (Blackman et al., 2010)	Ensayo clínico	Aplicación de terapia en 28 pacientes, donde el 80% de los sujetos tratados presentaron una cicatrización total a las 12 semanas, en comparación con el 35% obtenido de cicatrización sin asistencia.
	"Topical Wound Oxygen Therapy in the Treatment of Chronic Diabetic Foot Ulcers" (Frykberg, 2021).	Ensayo clínico	Estudio en 145 pacientes con úlceras diabéticas crónicas que demuestra un aumento significativo en el proceso de sanación del 73% de los pacientes, al ser administrada en conjunto con tratamientos convencionales para heridas.
OxyBand™ Wound Dressing	"Evaluation of an oxygen-diffusion dressing for accelerated healing of donor-site wounds" (Laird et al., 2014)	Ensayo clínico	Aplicación de apósito en 17 pacientes con dos heridas de quemadura, de manera que a una de estas heridas fue tratada con un injerto de piel acondicionado en el apósito, resultando en una reducción en el tiempo de curación y dolor, sin comprometer los resultados cosméticos.

2.4. Tabla de Patentes

Tabla 8. Patentes asociadas al proyecto.		
Número de patente, país asociado, fecha de publicación	Nombre de la patente – Autor de la patente	Descripción
GB2024012 Reino Unido, 09 de enero de 1980	“Oxygen-generating surgical dressing” – Johnson & Johnson	Apósito tópico almacenable que genera oxígeno gaseoso de forma sostenida al contacto con la herida, mediante un compuesto peróxido y un activador (Johnson & Johnson, 1980).
US5792090 Estados Unidos, 11 de agosto de 1998	“Oxygen generating wound dressing” - Ladin Daniel	Apósito generador de oxígeno mediante la descomposición controlada del peróxido de hidrógeno mediante un catalizador (Ladin, 1998).
US20170319394 Estados Unidos, 09 de noviembre de 2017	“Oxygen-generating wound dressing” - Yu-Hong Chen et al.	Vendaje para heridas y, en particular, se refiere a un vendaje para heridas que genera oxígeno y que mantiene la presión parcial de oxígeno en la herida para facilitar la cicatrización (Yu-Hong & Shih-Wei, 2017).
CN115607433 China, 17 de enero de 2023	“Portable oxygen generating device for wound oxygen therapy” – Lei Zhang et al.	Dispositivo portátil de oxigenación para terapia de heridas, basado en capas químicas que generan oxígeno, con válvula unidireccional y bandas de fijación (Zhang et al., 2023).
KR1020230013696 República de Corea, 27 de enero de 2023	“Sustained oxygen-generating wound dressing” – Minjeong J.	Apósito generador de oxígeno sostenido que combina un compuesto productor de peróxido de hidrógeno y una película polimérica hidrofóbica impregnada con ácido ascórbico (Minjeong et al., 2023).
MX2021015322 México, 12 de junio de 2023	“Biopelícula de alginato de sodio funcionalizada con extracto etanólico de <i>Prosopis laevigata</i> y su uso como agente cicatrizante de heridas” – Barrón et al.	Película de alginato de sodio con extracto etanólico de <i>Prosopis laevigata</i> , dicha biopelícula flexible, adaptable y de fácil manipulación para usarse como agente cicatrizante de heridas (Barrón González et al., 2023)
US12447060B2 / US20240285443A1 Estados Unidos, 21 de octubre de 2025	“Wound dressings and systems with remote oxygen generation for topical wound therapy and related methods” - Justin A. Long et al.	Incluye vendajes y sistemas con generación de oxígeno remota para la terapia tópica de heridas, incluyendo sistemas de liberación de oxígeno en tejidos específicos (Long et al., 2024).

2.5. Variables

2.5.1. Definición conceptual de variables

En la siguiente tabla (**Tabla 9**), se definen las variables establecidas para la investigación, según la naturaleza de los datos experimentales involucrados.

Tabla 9. Definición conceptual de variables de la investigación.		
Tipo variable	de Concepto	Definición
Entrada	Tipo de Sistema fotosintético aplicado	Corresponde a la configuración biológica empleada para la generación de oxígeno, incluyendo cloroplastos aislados, organelos responsables de las reacciones características de la fotosíntesis en plantas (Hill, 1939); microalgas en suspensión libre, microorganismos unicelulares eucariotas fotosintéticos que habitan en ambientes acuáticos (Hopfner et al., 2014); y microalgas integradas en biopelículas, es decir, hidrogeles de polímeros sintéticos con material biológico capaz de realizar fotosíntesis (Maharjan et al., 2022), recubiertas o no con matrices vegetales descelularizadas, refiriéndose a hojas sometidas a procedimientos para remover material genético resultado en estructuras extracelulares compuestas principalmente por celulosa (Gershlak et al., 2017).
Proceso	Condiciones de medición	Condiciones mantenidas constantes durante el desarrollo de los diferentes ensayos experimentales para evitar alteraciones externas en los resultados, a través de técnicas de incubación, entendido como el mantenimiento de muestras en condiciones ambientales controladas dentro de un sistema cerrado (O'leary, 2019).
Salida	Producción de oxígeno <i>in vitro</i>	Se refiere a la cantidad de oxígeno liberado por las plataformas fotosintéticas, es decir, materiales alterados por la integración de agentes vegetales funcionales capaces de realizar fotosíntesis ante un estímulo lumínico (Chávez et al., 2020, Chen et al., 2022).

2.5.2. Indicadores de desempeño de variables

Para cada una de las variables previamente mencionadas, son establecidos los siguientes indicadores de rendimiento (**Tabla 10**).

Tabla 10. Indicadores de desempeño de variables.		
Tipo de variable	Concepto	Definición
Entrada	Tipo de Sistema fotosintético aplicado	Se establecerán grupos experimentales: cloroplastos aislados extraídos y estabilizados, microalgas en suspensión libre, microalgas incorporadas en biopelículas de alginato, microalgas incorporadas en biopelículas recubiertas con matriz de hoja descelularizada (tamal oxigénico). Esta variable corresponde a la clasificación de los tratamientos experimentales evaluados y, dada su naturaleza categórica, no presenta indicadores de desempeño propios.
Proceso	Condiciones de medición	Condiciones controladas de temperatura. El desempeño será evaluado mediante la estabilidad de la temperatura de incubación bajo condiciones de iluminación constante.
Salida	Producción de oxígeno <i>in vitro</i>	Se determinará mediante la medición de la concentración de oxígeno disuelto en el medio de ensayo a lo largo del tiempo. El desempeño de esta variable se evaluará en función de la variación temporal de la concentración de oxígeno y del incremento porcentual alcanzado respecto al grupo control.

2.6. Glosario de términos

1. Andamio: estructura tridimensional que actúa como soporte físico para la adhesión celular y el desarrollo de tejidos funcionales (Chen et al., 2024).
2. Andamios fotosintéticos: biomateriales que aprovechan los procesos de fotosíntesis para generar oxígeno en ambientes hipóxicos. Estos andamios representan una solución innovadora para tratar tejidos con deficiencia de oxígeno (Maharjan et al., 2022).
3. Andamios funcionales: estructuras que han sido modificadas químicamente para incorporar propiedades específicas, como liberación controlada de fármacos o moléculas bioactivas (Kim et al., 2024).
4. Biocompatibilidad: propiedad de un material para interactuar con tejidos vivos sin causar efectos adversos. Es esencial en el diseño de biomateriales para aplicaciones médicas y regenerativas (Gershlak et al., 2025).
5. Biomateriales regenerativos: materiales diseñados para interactuar con tejidos dañados y promover su reparación mediante estímulos físicos, químicos o biológicos (Aoki et al., 2024).
6. Citotoxicidad: Capacidad de una sustancia o material para causar daño o muerte celular (Gershlak et al., 2025).
7. Ensayo *in vitro*: técnicas de laboratorio que permiten estudiar un comportamiento en un ambiente controlado (Jiang et al., 2024)
8. Ensayo *in vivo*: técnica experimental donde células, tejidos, organismos u otros sistemas de interés se estudian directamente dentro de un organismo vivo. Se utiliza para evaluar la eficacia de tratamientos en condiciones biológicas complejas y naturales (Jiang et al., 2024)
9. Descelularización: proceso mediante el cual se eliminan las células de una matriz biológica, dejando intacta su estructura extracelular. Este método permite el uso de matrices vegetales y animales como andamios en ingeniería tisular (Gershlak et al, 2017).
10. Difusión: Movimiento de moléculas desde una región de mayor concentración hacia otra de menor concentración (Gutiérrez, 1988).

11. Encapsulación celular: técnica utilizada para proteger células dentro de una matriz semipermeable, permitiendo el intercambio de nutrientes y oxígeno mientras se evita el rechazo inmunológico (Jang et al., 2024).
12. Estabilidad estructural: propiedad de un andamio o biomaterial que asegura su resistencia a deformaciones o degradación durante su uso en ambientes biológicos (Gershlak et al., 2017)
13. Fotosintético: propiedad o capacidad de un organismo, célula o biomaterial para llevar a cabo fotosíntesis, el proceso de conversión de luz en energía química. En biomateriales, se refiere a aquellos diseñados para liberar oxígeno utilizando energía lumínica, una estrategia clave en la regeneración de tejidos hipóxicos (Chávez et al., 2020)
14. Funcionalidad biológica: capacidad de un material o sistema para replicar y apoyar procesos biológicos específicos en aplicaciones regenerativas (Jiang et al., 2024)
15. Hidrogel: Material polimérico con alta capacidad de retención de agua utilizado en aplicaciones biomédicas (Chen et al., 2022)
16. Hipoxia: estado de deficiencia de oxígeno en los tejidos, que afecta procesos biológicos como la cicatrización. Los biomateriales oxigenantes han demostrado ser eficaces para mitigar sus efectos (Bhutta et al., 2025)
17. Matrices descelularizadas: estructuras biológicas que han sido despojadas de sus células originales, dejando una red de proteínas adecuada para actuar como plataformas para la regeneración tisular debido a su sistema vascular y propiedades mecánicas (Gershlak et al., 2017).
18. Oxigenación controlada: técnica aplicada en biomateriales para liberar oxígeno de manera sostenida y uniforme, mejorando la proliferación celular y reduciendo el tiempo de cicatrización (Bai et al., 2022).
19. Presión parcial de oxígeno (pO_2): medida de la cantidad de oxígeno disponible en un sistema gaseoso o líquido (O'leary, 2019).
20. Porosidad: propiedad de un andamio que permite el intercambio de nutrientes, oxígeno y desechos metabólicos, siendo clave para el crecimiento celular (Hopfner et al., 2014).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3. CAPÍTULO 3: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de la investigación

La propuesta corresponde a una investigación experimental de tipo mixto, que integra análisis cualitativos y cuantitativos de manera complementaria.

Primeramente, corresponde a una investigación experimental debido a que implica la manipulación de variadas configuraciones fotosintéticas empleadas como plataformas oxigenantes, con el propósito de analizar su comportamiento funcional. Además, se considera cuantitativa al evaluar las características de los andamios descelularizados, así como al centrarse en la medición objetiva de la liberación de oxígeno por fotosíntesis y en la estabilidad funcional en el tiempo de las plataformas, mediante instrumentos de medición, cuantificación y análisis comparativos. Paralelamente, el componente cualitativo comprende la caracterización estructural y morfológica del andamio vegetal descelularizado, del hidrogel de alginato, del sistema híbrido y de los cloroplastos aislados.

Asimismo, el estudio mantiene un diseño experimental de laboratorio, dividido en dos etapas, con características mixtas al integrar procedimientos controlados orientados a evaluar la capacidad oxigenante de distintas plataformas fotosintéticas mediante la modificación intencional de su composición y organización estructural. Durante el desarrollo experimental se compararon diferentes sistemas fotosintéticos, incluyendo cloroplastos aislados, microalgas en suspensión libre y microalgas integradas en biopelículas fotosintéticas, recubiertas o no con matrices vegetales descelularizadas; manteniendo condiciones de temperatura e iluminación constantes durante todos los ensayos experimentales, con la finalidad de minimizar la influencia de factores externos sobre los resultados obtenidos. En la primera etapa, la investigación se orientó al análisis de la viabilidad de integración de sistemas fotosintéticos en estructuras biomateriales. En esta fase, el componente cuantitativo comprendió la medición y análisis de variables funcionales relacionadas con la capacidad oxigenante de los distintos sistemas evaluados. Paralelamente, el componente cualitativo incluyó la observación de características colorimétricas, morfológicas, estructurales y de conservación presentes en las distintas configuraciones fotosintéticas estudiadas.

Por otro lado, en la segunda etapa, el estudio se enfocó en el desarrollo de una plataforma fotosintética estructural basada en biomateriales descelularizados, empleando estrategias de bioingeniería para favorecer la integración y organización de los componentes fotosintéticos. En esta etapa, el componente cuantitativo incluyó la evaluación funcional y dimensional de las plataformas desarrolladas, mientras que el componente cualitativo comprendió la caracterización de sus propiedades estructurales, morfológicas y de permeabilidad.

3.2. Hipótesis de la investigación

La incorporación de sistemas vegetales fotosintéticos, de distinta complejidad estructural, en plataformas biomateriales permite el intercambio gaseoso con el medio circundante, evidenciado por un incremento cuantificable en la liberación de oxígeno bajo condiciones de iluminación controlada.

3.3. Preguntas de investigación por resolver

Etapla 1. En lo concerniente al desarrollo de estrategias de estabilización de cloroplastos aislados como mecanismo potencial de liberación de oxígeno, se plantea la siguiente pregunta central: *¿Es posible preservar la funcionalidad fotosintética de los sistemas fotosintéticos aislados de manera que permitan una liberación sostenida de oxígeno en el tiempo?*

De esta interrogante se desprenden preguntas específicas tales como: *¿Qué condiciones de estabilización favorecen la conservación de su actividad fotosintética?* y *¿La oxigenación generada es cuantificable y reproducible bajo iluminación controlada a temperatura ambiente?*

Etapla 2. En el marco del desarrollo de un hidrogel de alginato fotosintético integrado en una plataforma estructural vegetal descelularizada, surge la siguiente interrogante: *¿Qué condiciones de diseño permiten la incorporación de un hidrogel sin comprometer la integridad estructural del andamio ni su estabilidad en el tiempo?*

A partir de esta pregunta, se derivan cuestionamientos específicos como: *¿La arquitectura del tejido vegetal descelularizado facilita la retención homogénea del hidrogel?* y *¿La plataforma resultante permite el intercambio gaseoso entre el hidrogel oxigenante y el medio, sin comprometer su estabilidad morfológica?*

3.4. Técnicas aplicadas

La propuesta se fundamenta en técnicas de bioingeniería vegetal y biotecnología orientadas al desarrollo de plataformas fotosintéticas para la oxigenación localizada en ensayos *in vitro*. Para la primera etapa, se implementarán técnicas de aislamiento mecánico y estabilización de cloroplastos, junto con herramientas de caracterización basadas en microscopía en campo claro y fluorescencia (Aoki et al., 2024; Jang et al., 2024; Pathan et al., 2010), además de ensayos de liberación de oxígeno en el tiempo para evaluar su desempeño funcional en comparación con el comportamiento de microalgas (Cao et al., 2025; Jang et al., 2024; Ren et al., 2024; Shang et al., 2024; H. Wang et al., 2025),. Para ello, se aplicaron técnicas de aislamiento y estabilización de cloroplastos enfocadas en evaluar la viabilidad de los organelos como fuentes independientes de oxígeno.

Para la segunda etapa, se emplearán técnicas de descelularización de tejidos vegetales para la obtención de estructuras de soporte (Gershlak et al., 2017; Harris et al., 2021; Hasan et al., 2024; Kumar et al., 2023; Vargas-Ovalle et al., 2025), integrando sistemas fotosintéticos complejos, con el fin de generar plataformas funcionales y estables (Chávez et al., 2020; Maharjan et al., 2022). Cada técnica cumple una función específica dentro del desarrollo experimental, permitiendo establecer la siguiente relación clara entre el enfoque metodológico adoptado y los resultados esperados de la investigación:

1. Las técnicas de descelularización y bioingeniería vegetal permiten generar andamios de origen vegetal como soporte para hidrogeles fotosintéticos.
2. Los métodos de cultivo y conservación de microalgas de agua dulce para su implementación en entornos de medición oxigénica continua bajo luz.
3. Las técnicas de formulación de hidrogeles permiten integrar sistemas fotosintéticos vivos en matrices estables, lo que contribuye a la creación de plataformas protectoras capaces de generar oxigenación localizada, en concordancia con el objetivo general.

3.5. Materiales y herramientas utilizadas

Para la primera etapa de la investigación, orientada al análisis de la viabilidad de integración de sistemas fotosintéticos en hidrogeles, se emplearon materiales biológicos y equipos de laboratorio destinados al aislamiento, manipulación y evaluación funcional de sistemas fotosintéticos. Entre los principales recursos utilizados se incluyeron hojas vegetales para procesos de aislamiento de cloroplastos, cultivos de microalgas genéricos, reactivos químicos para preparación de soluciones y medios experimentales, así como hidrogeles de alginato para la conformación de plataformas fotosintéticas. Asimismo, se utilizaron centrifugas y sistemas de filtrado para procesos de separación y aislamiento de organelos, agitadores orbitales y magnéticos para homogenización y mantenimiento de muestras, cabinas de flujo laminar, autoclave e instrumentos para la manipulación de medios líquidos como método para garantizar la esterilidad de los procesos, sistemas de iluminación controlada para estimulación fotosintética y el equipo de medición de partículas diluidas por sensor óptico, PreSens SDR, para la evaluación de la capacidad oxigenante de las plataformas desarrolladas. Además, se aplicó el uso de sistemas de microscopía invertida durante las etapas de caracterización.

Similarmemente, en la segunda etapa se emplearon hojas vegetales sometidas a procesos de descelularización, cultivos de microalgas, hidrogeles fotosintéticos de alginato y sistemas biológicos fotosintéticos evaluados previamente. Para ello, se utilizaron reactivos químicos destinados a los procesos de descelularización y conservación de las matrices vegetales, así como balanzas y equipos de agitación orbital, agitación magnética y sistemas de iluminación controlada para el mantenimiento experimental de las plataformas desarrolladas. De igual manera, se emplearon equipos de microscopía para caracterización morfológica y cuantificación celular, así como el sistema medición óptica de oxígeno, PreSens SDR, instrumentos para análisis dimensional, permitiendo evaluar las propiedades funcionales y estructurales de las plataformas fotosintéticas obtenidas y equipos para garantizar el trabajo en entorno de esterilidad controlada para las muestras biológicas disueltas como método para reducir su posibilidad de contaminación.

3.6. Metodología

3.6.1. Etapa 1:

3.6.1.1. Aislamiento de cloroplastos a partir de espinaca

Figura 7. Protocolo de extracción de cloroplastos a partir de hojas de espinaca. Creado con BioRender.



Observación: Todas las etapas del proceso deben realizarse a 4°C, evitando la exposición directa de la muestra a la luz.

Nota: (1) homogeneización de materia prima con buffer inicial, (2) separación del filtrado, (3) centrifugación del filtrado para separación de la membrana celular, (4) suspensión de pellet en buffer, (5) centrifugación, (6) integración de suspensión en gradiente de Percoll, (7) centrifugación, (8) recuperación de la fase de interés para cloroplastos intactos (Jang et al. 2024).

Las hojas de *Spinacia oleracea*, comercialmente conocida como espinaca, contienen una gran concentración de cloroplastos en comparación con otras especies (Santiago et al., 2019), por esto, tienden a ser utilizadas en los procesos de extracción de este subsistema. Para este procedimiento se inició con la preparación de la materia prima, etapa que incluyó el almacenaje de hojas de espinaca lavadas y sin tallos, en oscuridad, a 4 °C, hasta su uso (Miller et al., 2020). El proceso de extracción, tal como se describe en el diagrama (**Figura 7**), se basó en el estudio de Jang (Jang et al., 2024). El primer paso fue el uso de un buffer de extracción frío, compuesto por 0.33 M D-sorbitol, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl y 2 mM EDTA, al que se añadió BSA al 0.1% (m/v) como suspensión para el triturado de hojas de espinaca, en una proporción de 0.35 g por cada 100 mL de solución, durante 30 segundos en una licuadora. La solución homogeneizada fue filtrada a través de varias capas de una tela de muselina de algodón fina, y el filtrado fue colocado en tubos de centrifuga de 50 mL previamente

enfriados. Esta suspensión fue llevada a centrifugación a 1295 g por un minuto, recuperando el sobrenadante para ser llevado a una segunda centrifugación a 1295 g, por 7 minutos. El pellet resultante fue suspendido en la solución inicial y colocado cuidadosamente sobre un gradiente de Percoll (40% y 80%) en un tubo cónico, para su centrifugación a 3000 g durante 10 minutos. La fase por recuperada se ubica entre los gradientes de Percoll y fue ser suspendida en el buffer frío inicial sin BSA, lavada a través de una centrifugación de 10 minutos a 3315 g y, nuevamente, suspendida en el buffer frío inicial sin BSA hasta su uso, en oscuridad a -20°C.

3.6.1.2. Caracterización de cloroplastos por microscopía

3.6.1.2.1. Microscopía de campo claro

Para la visualización por microscopía en campo claro, se aplicó la metodología descrita por Aoki et al., que consiste en utilizar un microscopio invertido con cámara. Este proceso puede optimizarse mediante la fijación de los cubreobjetos con paraformaldehído concentrado al 4% (v/v) durante 15 minutos, seguida de su lavado con 1 mL de PBS (Aoki et al., 2024), antes de su visualización. Cabe resaltar que las muestras suspendidas deben mantenerse frías y con poca exposición a la luz blanca directa, con el fin de preservar la estructura de los cloroplastos extraídos.

3.6.1.2.2. Microscopía de fluorescencia

Para la visualización por fluorescencia, se aplicó la metodología descrita por Aoki et al., que consiste en utilizar un microscopio de inmunofluorescencia invertido, sin fijar las muestras. Dado que los cloroplastos son biológicamente fluorescentes, para su visualización no se requiere tinción, sino solo la excitación de la muestra con un rayo de luz a una longitud de onda de 500 nm (Aoki et al., 2024). La visualización de todas las muestras debe realizarse en un cuarto oscuro para limitar la interferencia de la luz externa en el sistema de microscopía, utilizando principalmente el canal rojo para detectar la presencia de clorofila.

3.6.1.3. Análisis de capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo de cloroplastos aislados

Figura 8. Diagrama general del uso del sistema PreSens SDR para la medición de la liberación de oxígeno en cloroplastos aislados. Creado con BioRender.



A partir de los cloroplastos aislados se desarrollaron ensayos de medición que permitieran identificar la liberación de oxígeno en el medio, utilizando el sistema de medición óptico PreSens SDR (**Figura 8**). Para llevar a cabo este ensayo se utilizó el protocolo establecido por la fábrica para mediciones sensibles a oxígeno en el ambiente, utilizando viales de 2 mL con sensores de oxígeno integrados en sus bases del mismo fabricante. Inicialmente, el sistema PreSens SDR se arma y se conecta a una computadora fija, de acuerdo con lo establecido en el manual de usuario del fabricante. Una vez conectado el sistema, se configuró el software SDR proporcionado con el equipo, siguiendo los pasos establecidos por la fábrica en el manual de usuario. Seguidamente, la placa con sensor y su soporte cobertor fueron colocados en un cuarto oscuro, frente a una única fuente de luz constante, dentro de un sistema de incubación a 25 °C, siguiendo la técnica de implementación propuesta por O'leary para compensar la posible difusión del gas y la formación de burbujas ante el aumento de la concentración dentro del sistema (O'Leary, 2019).

Las muestras de cloroplastos recién extraídas fueron colocadas en los viales de medición previamente enfriados, con un volumen aproximado de 2,8 mL para rellenarlos por completo, y se mantuvieron en la oscuridad hasta el momento de la medición. Dado el breve tiempo de estabilidad estructural que presentan estos organelos al ser expuestos a la luz, se estudió su vida útil mediante ensayos con mediciones cada 2 minutos y una exposición total de 12 horas, con el fin de identificar la extensión de su tiempo de actividad real y las diferencias entre las especies de hojas utilizadas para su extracción.

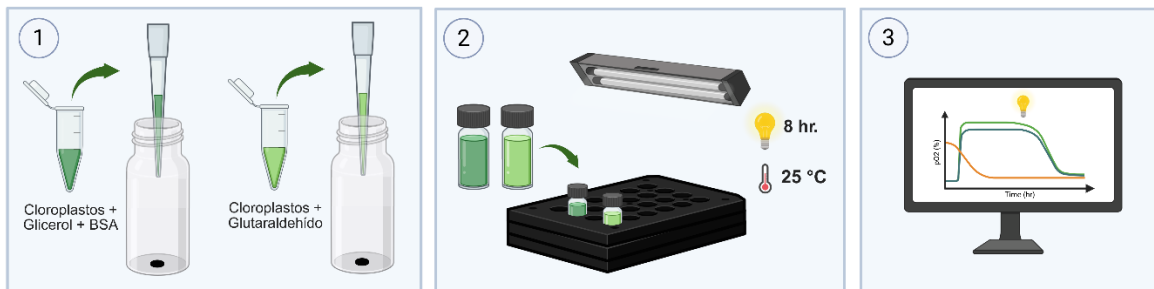
3.6.1.4. Estabilización de cloroplastos aislados en suspensión

El método de estabilización en suspensión se basó en la acción del glutaraldehído, que actúa como un agente enlazador de proteínas al reaccionar con los grupos amino, lo que permite la estabilización estructural de complejos proteicos y membranas (Hardt & Kok, 1976; Park, 1970; Zilinskas & Govindjee, 1976), y en la albúmina sérica bovina (BSA) como agente protector inicial de las proteínas funcionales. Para este proceso se implementó una combinación de los protocolos de Hardt & Kok (Hardt & Kok, 1976) y de estabilización en almacenamiento a -20 °C de Whatley (Whatley, 1995; Whatley & Arnon, 1963).

El primer protocolo de estabilización implementado consistió en la suspensión de cloroplastos aislados, previamente precipitados por centrifugación a 2500 g durante 8 minutos, en una solución de buffer de aislamiento con 9 mg/mL de BSA y 10% (v/v) de glicerol, para su almacenamiento a -20 °C. Por otro lado, el segundo protocolo de estabilización aplicado inició con la suspensión de cloroplastos aislados en un volumen igual a una solución de 5% (v/v) de glutaraldehído diluido en un buffer frío de aislamiento sin BSA, o en una solución de 20% (w/v) de sacarosa. Esta suspensión fue agitada durante 5 minutos en un baño de hielo y, posteriormente, se retiró el excedente de glutaraldehído mediante dos lavados (Hardt & Kok, 1976). Para cada lavado, diluir la solución en buffer de aislamiento frío en una proporción 1:10 y centrifugar a 2500 g durante 8 minutos. El pellet resultante se suspendió completamente en una solución de buffer de aislamiento a temperatura fría sin BSA.

3.6.1.5. Análisis de la capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo de cloroplastos estabilizados.

Figura 9. Diagrama general del uso del sistema PreSens SDR para la medición de la liberación de oxígeno en cloroplastos estabilizados. Creado con BioRender.



A partir de los cloroplastos estabilizados por suspensión, se desarrollaron ensayos de medición para identificar la liberación de oxígeno en el medio, utilizando el sistema de medición óptico PreSens SDR, donde se determinarán los porcentajes de oxígeno liberado como residuo de la fotosíntesis de los cloroplastos, en el tiempo **(Figura 9)**. Para llevar a cabo este ensayo se utilizó el protocolo establecido por el fabricante del sistema para mediciones sensibles al oxígeno en el ambiente, con viales de 2 mL, en los cuales fue necesario añadir hasta 2,8 mL de cada solución y trabajar en un ambiente con temperatura estable durante todo el ensayo.

El sistema PreSens SDR fue armado y conectado a una computadora fija, según la configuración establecida en el manual de usuario. La placa con sensor y su soporte cobertor fueron colocados frente a una fuente de luz constante, dentro de un sistema de incubación a 25 °C, siguiendo la técnica descrita. Las muestras de cloroplastos fueron colocadas en los viales de medición, con un volumen adecuado para rellenarlos por completo, y se mantuvieron en la oscuridad hasta el momento de la medición. Dado el corto tiempo de estabilidad estructural que presentan estos organelos al ser expuestos a la luz, se estudió su vida útil mediante ensayos con muestreo cada 2 minutos, con un tiempo total de exposición constante de 8 horas, como método para evaluar la eficacia de la estabilización de las muestras en comparación con resultados previamente obtenidos para los cloroplastos aislados sin ningún estabilizante.

3.6.1.6. Análisis comparativo de la capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo de microorganismos fotosintéticos.

Figura 10. Diagrama general del uso del sistema PreSens SDR para la medición de la liberación de oxígeno en microalgas. Creado con BioRender.



Dada la inestabilidad característica de los cloroplastos aislados una vez expuestos a luz directa, acorde con la literatura (Jensent et al., 1966), se plantea la implementación de sistemas fotosintéticos alternativos para su evaluación dinámica, utilizando el sistema de medición óptico PreSens SDR. En este proceso fueron seleccionadas microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*, dada su desempeño previo en experimentaciones locales. Estas fueron sometidas a un ciclo de luz constante de 2 horas (**Figura 10**).

Para este ensayo, la concentración de las microalgas debe ser igual entre todos los viales, de manera que fue necesario realizar una cuantificación celular previa a los ensayos. El desarrollo de las mediciones se basó en el protocolo establecido por el fabricante del sistema para mediciones sensibles al oxígeno en el ambiente, con viales de 2 mL, en los cuales fue necesario añadir hasta 2,8 mL de cada suspensión de microalgas estudiada y trabajar en un ambiente con una temperatura estable de 25°C, durante todo el ensayo.

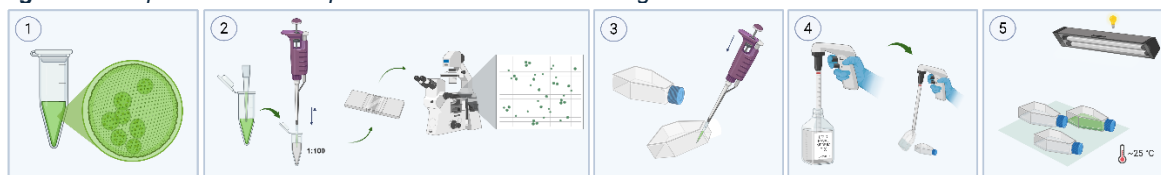
El PreSens SDR fue ensamblado y conectado a una computadora fija, según la configuración establecida en el manual de usuario, la placa con sensor y su soporte cobertor fueron colocados frente a una fuente de luz controlable, dentro de un sistema de incubación a 25 °C, siguiendo la técnica descrita por O'leary (O'Leary, 2019). Las muestras de microalgas fueron colocadas en los viales de medición, con un volumen adecuado para rellenarlos por completo, y colocadas en los espacios de la placa de medición para cada una de las variables experimentales.

3.6.2. Etapa 2:

3.6.2.1. Cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris*

Las microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*) fueron cultivadas en dos matraces T-25 (se mantuvieron un mes en T-25, 1 ml en 9 ml de medio cada uno; al mes se les realizó su primer cambio de medio y traspase a T-75), siguiendo lo descrito en la literatura existente para cultivos fotosintéticos (Rodas-Gaitán et al., 2012). Una vez identificado el volumen necesario para una concentración ideal, a través de la implementación de una cámara de Neubauer siguiendo el protocolo para la cuantificación de microalgas, se realizó la siembra en condiciones estériles, utilizando el medio de cultivo “Bold Basal Medium” (Bold) diluido a 1X, siguiendo los pasos planteados en el diagrama (**Figura 11**) y descritos a continuación: inicialmente se preparó el entorno de trabajo dentro de la cabina de bioseguridad, desinfectando con alcohol al 70% los matraces a utilizar en los nuevos cultivos, micropipetas de 1000 μ L, 10 μ L y sus puntas correspondientes, además de tiras de Parafilm y tubos cónicos de 1,5 mL, pipeteador automático y una pipeta serológica de 50 mL, estos materiales se irradiaron con luz ultravioleta como método de preparación para la siembra. Posteriormente, se extrajeron alícuotas de 1 mL de los cultivos que actuaron como inóculos en este proceso, para su cuantificación. Una vez determinado el volumen necesario para la siembra, este se extrajo de los cultivos inóculos y se sembró en matraces previamente curados con 10 mL de medio Bold 1X. Finalmente, se aforaron los matraces hasta su volumen máximo con el medio de cultivo. Los cultivos fueron mantenidos en agitación diaria para evitar sedimentaciones y expuestos a la luz blanca constante durante 40 días, momento en el que se inicia el nuevo subcultivo.

Figura 11. Representación del protocolo de cultivo de *C. vulgaris*. Creado con BioRender.

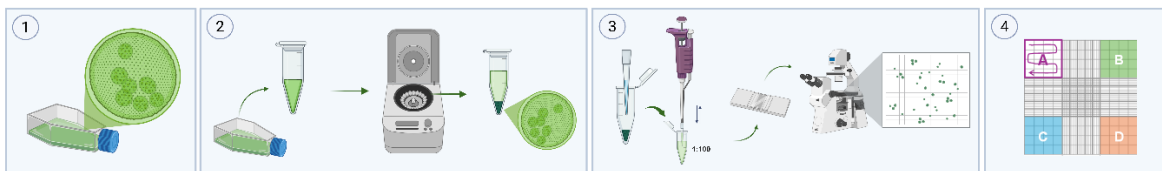


Nota: (1) obtención de inóculo, (2) cuantificación de la densidad celular con cámara de Neubauer, (3) pase de volumen adecuado para cada una de las concentraciones deseadas, (4) aforado de matraces de cultivo con medio Bold y (5) ubicación de los matraces de cultivo en ambientes que cumplan con sus condiciones de iluminación y temperatura adecuadas. Creado con BioRender.

3.6.2.2. Cuantificación de cultivos de microalgas

Con la finalidad de identificar el crecimiento de los cultivos, se realizó un proceso de muestreo el día de la siembra y a los 5 y 10 días después, finalizando con una cuantificación durante el primer cambio de medio necesario, una vez se observó turbidez y un cambio en la colorimetría del cultivo, 40 días después de la siembra inicial. Para esto, 1 µL de suspensión de microalgas fue diluido en 99 µL de agua destilada, para cada uno de los cultivos de interés. Posteriormente, se colocaron 10 µL de la primera dilución de microalgas en el hemo citómetro o cámara de Neubauer, previamente lavada cuidadosamente con agua destilada, y se observaron al microscopio, como se describe en la **(Figura 12 – 3)**. Se cuantificó la cantidad de microalgas presentes en cada uno de los cuadrantes externos del sistema (señalados en la figura como A, B, C y D), siguiendo un patrón en “S” entre los recuadros internos de cada cuadrante **(Figura 12 – 4)**. Una vez cuantificada cada célula individual, se determinó la concentración total del cultivo mediante la ecuación **(Ecuación 1)**.

Figura 12. Representación detallada del proceso de cuantificación manual. Creado con BioRender.



$$n_{total} = \sum Cells_A + \dots + Cells_D$$

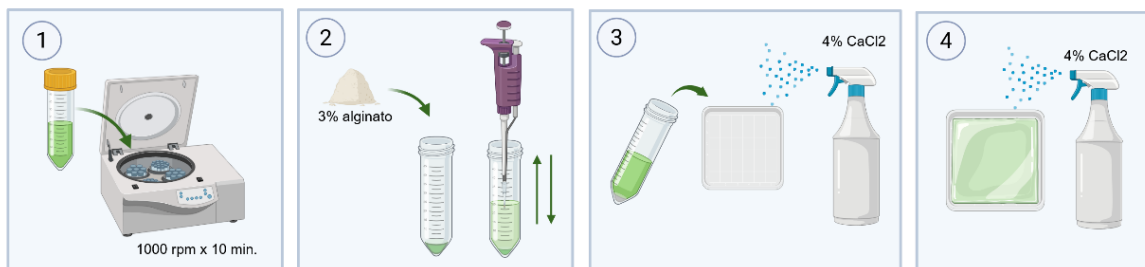
$$Concentración = \frac{n_{total} * 10\,000}{4 * \left(\frac{1}{100}\right)} \quad (Ecuación\ 1)$$

Ecuación 1. Suma total del número de células cuantificado en cada cuadrante externo (utilizando el patrón recomendado), multiplicada por el factor de crecimiento celular estándar. Dividido por el producto de la cantidad de cuadrantes utilizados y la relación de dilución de la preparación de la concentración de cuantificación.

3.6.2.3. Generación y caracterización de hidrogeles oxigenantes

3.6.2.3.1. Elaboración de hidrogeles oxigenantes.

Figura 13. Proceso de elaboración de hidrogel con alginato de sodio y microalgas de *Chlorella vulgaris*, con gasa como estructura interna. Creado con BioRender.

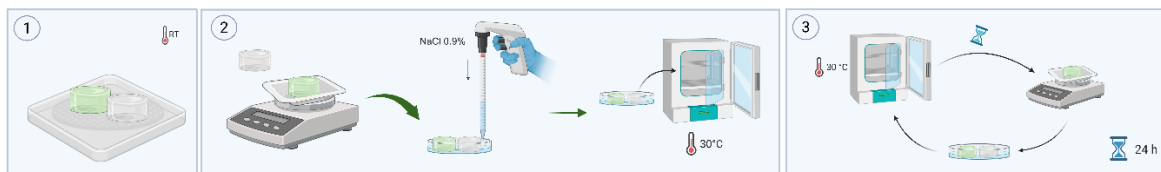


La formación del hidrogel fotosintético se realizó mediante un proceso de gelificación iónica, empleando alginato de sodio como matriz polimérica y cloruro de calcio (CaCl_2) como agente de reticulación, siguiendo metodologías previamente descritas para la inmovilización de microorganismos fotosintéticos (Chen et al., 2022; Jang et al., 2024). Inicialmente, se aplicó una capa uniforme de solución de CaCl_2 a una concentración de 4% (m/v) sobre una placa de Petri estéril. Sobre esta superficie se depositó una primera capa de solución de alginato de sodio al 3% (m/v), previamente mezclada con una suspensión celular de *Chlorella vulgaris* a una concentración alta ($>1 \times 10^9$), asegurando una distribución homogénea de las microalgas dentro de la matriz polimérica.

Seguidamente, se colocó cuidadosamente una gasa estéril de tres capas sobre la superficie del alginato, que actuó como soporte físico y elemento estructural del sistema. Posteriormente, se añadió una segunda capa de solución de alginato al 3% (m/v) sobre la gasa, seguida de una nueva aplicación de solución de CaCl_2 al 4% (m/v), con el fin de inducir la gelificación completa del sistema multicapa. Posteriormente, los parches obtenidos fueron sumergidos en la solución de CaCl_2 durante al menos una hora, con el objetivo de asegurar una reticulación homogénea y completa. Finalmente, se realizaron lavados sucesivos con agua destilada estéril para eliminar el exceso de calcio libre, y los parches fueron transferidos a un medio de cultivo específico para microalgas, con el fin de preservar la viabilidad y funcionalidad fotosintética del sistema.

3.6.2.3.2. Análisis de capacidad de hinchamiento de hidrogel con microalgas.

Figura 14. Diagrama protocolar de ensayo de hinchamiento. Creado con BioRender.



Para la evaluación del comportamiento de hinchamiento, se cortó una sección de 2 × 2 cm de una biopelícula, esta se colocó entre dos fragmentos de gasa estéril durante 5 minutos para su secado inicial. Posteriormente, se recortó un retazo de papel absorbente de celulosa y se colocó la biopelícula semiseca sobre él. La muestra se incubó a 30 °C durante 5 minutos adicionales para completar el proceso de secado, tras lo cual se retiró el papel absorbente y la biopelícula se colocó en contacto directo con el plato de Petri. La biopelícula seca fue pesada y registrada como tiempo inicial seco (t_0 -seca). A continuación, se añadieron 8 mL de solución salina (NaCl al 0.9% p/v), asegurando el contacto directo con la muestra, y se registró inmediatamente su peso correspondiente al tiempo inicial húmedo (t_0 -húmeda). La muestra se incubó tapada a 37 °C, registrándose su masa en tiempos establecidos: cada 15 minutos durante la primera hora del ensayo y, posteriormente, cada hora hasta completar 8 horas, con un último registro a las 24 horas de incubación. La masa de hinchamiento real inicial ($m_{h_inicial}$) se calculó como la diferencia entre la masa registrada en t_0 -húmeda y la masa en t_0 -seca. Para cada tiempo de medición (t), la masa de hinchamiento real ($m_h(t)$) se obtuvo restando la masa seca registrada en t_0 de la masa registrada en t . A partir de estos valores, la relación de hinchamiento se calculó como el cociente entre $m_h(t)$ y $m_{h_inicial}$ (**Ecuación 2**), con una relación inicial de hinchamiento igual a 1.00.

$$\text{Relación de hinchamiento} = \frac{m_h(t)}{m_{h_inicial}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Ecuación 2. División entre la masa de hinchamiento real, obtenida a partir de la resta del registro de masa en el tiempo cero del registro de la masa en el tiempo de medición, y la masa de hinchamiento real inicial calculada a partir de la diferencia entre las masas seca y húmeda registradas en el tiempo cero.

3.6.2.3.3. Análisis de liberación de oxígeno en hidrogeles con microalgas.

Figura 15. Diagrama representativo del proceso de medición de oxígeno. Creado con BioRender.

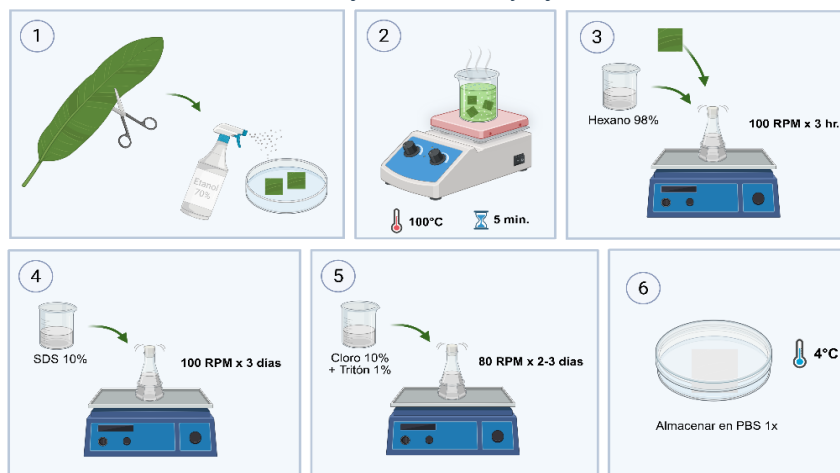


Utilizando hidrogeles oxigénicos de 1 cm x 1 cm, se realizaron mediciones de liberación de oxígeno en medio, utilizando el sistema de medición óptico PreSens SDR, con el que se determinaron los porcentajes de oxígeno liberado en el tiempo por las plataformas, tanto en ciclos de luz constante de 18 horas (**Figura 15**). Para llevar a cabo este ensayo, se utilizó el protocolo establecido por la fábrica para mediciones sensibles al oxígeno en el ambiente, empleando viales de 2 mL con sensores de oxígeno integrados en sus bases, del mismo fabricante. Inicialmente, el sistema PreSens SDR fue armado y conectado a una computadora fija, de acuerdo con lo establecido en el manual de usuario del fabricante. Una vez conectado el sistema, se configuró el software SDR proporcionado con el equipo, siguiendo los pasos establecidos por la fábrica en el manual de usuario. Seguidamente, la placa con sensor y su soporte cobertor fueron colocados en un cuarto oscuro, frente a una única fuente de luz constante, dentro de un sistema de incubación a 27 °C, siguiendo la técnica de implementación propuesta por O'leary para compensar la posible difusión del gas y la formación de burbujas ante el aumento de la concentración dentro del sistema cerrado (O'Leary, 2019).

Los hidrogeles fueron colocados en los viales de medición para que el sensor no se obstruya y pueda recibir luz directamente. Además, a estos viales de medición se les añadió suficiente medio de cultivo Bold 1X, de 2 mL a 2.5 mL, como medio líquido de suspensión para rellenarlos por completo y facilitar la detección del oxígeno liberado. A estas muestras se les realizaron mediciones cada 3 minutos para determinar el tiempo de oxigenación de estas plataformas bajo luz constante.

3.6.2.4. Descelularización de hojas tropicales

Figura 16. Protocolo de descelularización de hojas de banana y bijao. Creado con BioRender.

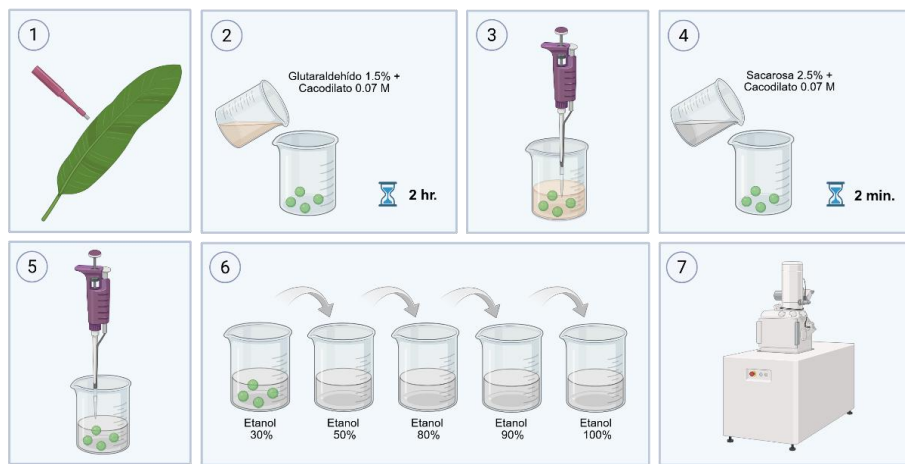


Observación: Entre cada cambio de solución se realizan tres lavados con agua destilada con 30 minutos de agitación a 100 RPM, cada uno.

Las hojas seleccionadas correspondieron a especies vegetales reconocidas por su resistencia mecánica, hoja de banana (*Musa x paradisiaca* L.) y hoja de bijao (*Calathea lutea*). El proceso de descelularización se realizó mediante una secuencia de tratamientos fisicoquímicos orientados a la remoción del contenido celular (**Figura 16**). Inicialmente, las hojas fueron sometidas a un tratamiento de remoción de la capa cerosa impermeable mediante inmersión en hexano concentrado al 98% (v/v) durante 3 horas, seguido de tres lavados exhaustivos con agua destilada, de 30 minutos cada uno, para asegurar la eliminación total de los residuos del solvente (Jones et al., 2021). Posteriormente, las muestras fueron sumergidas en una solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% (m/v) durante 3 días, como parte de un primer tratamiento con un detergente aniónico. Posteriormente, se realizó una serie de tres lavados de 10 minutos con agua destilada, y las muestras fueron sumergidas en una solución no iónica de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) y Triton X-100 al 1% (v/v) durante un periodo total de 48 a 72 horas, siguiendo una metodología modificada a partir de la de Adamski et al. (Adamski et al., 2018; Fontana et al., 2017). Finalizados los tratamientos detergentes, las hojas fueron sometidas a dos lavados sucesivos con agua destilada y, por último, con una solución tampón salina (PBS), con el objetivo de eliminar los residuos químicos. Finalmente, estas muestras se almacenan en PBS 1X a 4 °C.

3.6.2.4.1. Caracterización de andamios descelularizados por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Figura 17. Proceso de fijación de muestras de hoja para SEM. Creado con BioRender.



La retención de las características superficiales de los andamios descelularizados se evaluó mediante la obtención de imágenes de alta resolución de su arquitectura interna, en comparación con la de sus materiales nativos, utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM) y el software *ImageJ* para caracterizar los estromas de la estructura. Con esta finalidad, se aplicó el método de fijación y preparación de muestras descrito por Gershlak et al. (Gershlak et al., 2017). Inicialmente, las muestras fueron preparadas utilizando un punch para biopsias de 8 mm de diámetro. La fijación se llevó a cabo mediante inmersión en una solución de glutaraldehído al 1.5% (v/v) en un tampón de cacodilato de sodio a 0.07 M, ajustado a pH 7.2, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras fueron enjuagadas brevemente en una solución tampón de cacodilato de sodio a 0,07 M, suplementada con sacarosa al 2,5% (m/v), durante 2 minutos. Seguidamente, las muestras pasaron por un proceso de deshidratación mediante una serie de incubaciones en soluciones de etanol con concentraciones ascendentes de 30%, 50%, 80%, 90% y 100%, manteniéndolas en cada concentración durante 10 minutos. Finalizado el proceso de deshidratación, las muestras fueron conservadas en etanol absoluto (100%) y trasladadas al Instituto Smithsonian de Investigación Tropical (STRI), donde se llevó a cabo el secado a punto crítico, el recubrimiento con una aleación de oro/paladio y la posterior visualización en el sistema de microscopía electrónica de barrido.

3.6.2.5. Caracterización mecánica por ensayo de tracción y análisis dimensional de andamios descelularizados

Figura 18. Protocolo de ensayo mecánico de tracción. Creado con BioRender

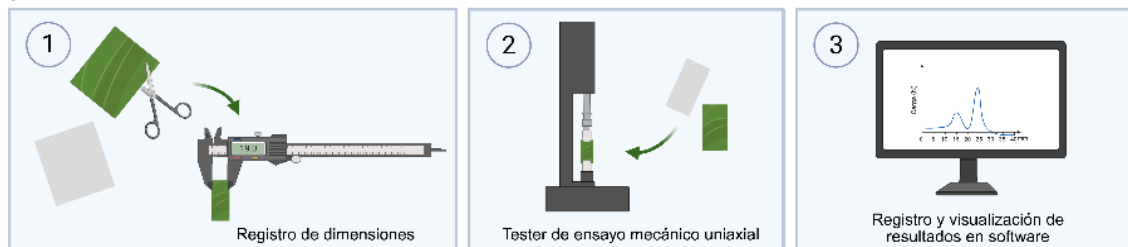


Figura 19. Protocolo de análisis de espesor. Creado con BioRender.



Las muestras de hoja nativa y descelularizada utilizadas en los ensayos fueron cortadas en tiras de la misma longitud y anchos específicos, siendo de 23.91 mm para la hoja nativa y de 26.18 mm para la hoja descelularizada, valores registrados a través de la implementación de un calibrador digital. Se resalta, además, que las mediciones y pruebas de caracterización se realizaron a temperatura ambiente, con muestras almacenadas bajo las mismas condiciones de refrigeración durante las 24 horas previas al desarrollo de los ensayos, procurando minimizar la variabilidad asociada a la manipulación del material.

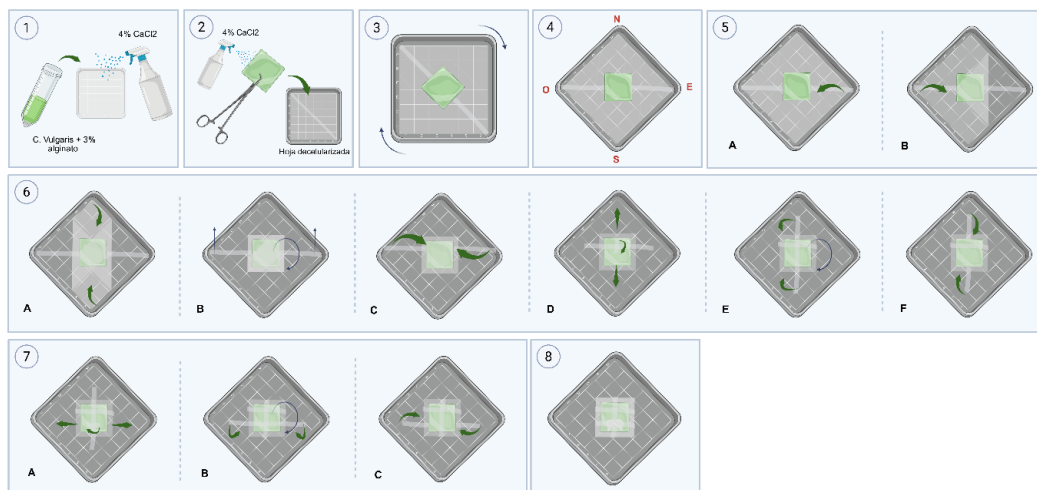
La caracterización mecánica de las hojas nativas y descelularizadas se realizó mediante ensayos de tracción uniaxial en una máquina de ensayo universal. Las muestras acondicionadas con las dimensiones mencionadas fueron fijadas en los extremos mediante un sistema de sujeción mecánica, lo que garantizó su correcta alineación y evitó deslizamientos durante la aplicación de la carga (**Figura 18**).

Los ensayos se llevaron a cabo aplicando una carga de tracción hasta la deformación o la falla de la muestra, lo que permitió registrar de forma continua los valores de carga en newtons (N) en función del alargamiento en milímetros, para generar una curva carga-deformación característica para cada muestra. A partir de estas curvas fue posible determinar los parámetros mecánicos de fuerza máxima y de porcentaje de deformación máxima ("*strain*"), utilizados para comparar las muestras.

Por otro lado, la medición del espesor de la hoja nativa y descelularizada se realizó con un micrómetro de precisión o un medidor de espesor con dial, con una resolución de 0,01 mm. Para cada condición, las muestras fueron posicionadas entre las superficies de medición del instrumento, asegurando un contacto uniforme sin deformación apreciable del material (**Figura 19**). Con esta técnica, las lecturas se obtienen mediante la combinación de la escala principal y el tambor micrométrico, registrando el espesor en milímetros en diferentes puntos de cada muestra, con el fin de obtener un valor representativo del espesor total.

3.6.2.6. Elaboración de plataforma oxigénica basada en hidrogel contenido dentro de hoja descelularizada (Tamal oxigénico).

Figura 20. Protocolo de amarre de tamal oxigénico. Creado con BioRender.



La plataforma de liberación de oxígeno, definida como “tamal oxigénico”, se basa en la integración de un hidrogel fotosintético recubierto con una hoja de bijao descelularizada. El proceso para su elaboración es detallado a continuación:

- **Paso 1:** Elaborar un hidrogel a base de alginato al 3% (w/v), diluido en una suspensión de microalgas de *Chlorella vulgaris*, utilizando cloruro de calcio al 4% para su polimerización (**Figura 20 – 1**).
- **Paso 2:** Colocar el hidrogel totalmente polimerizado en el centro de una hoja de bijao descelularizada, sobrepuesta en una tira de fibra de hoja de pita o tallo de banana descelularizada (**Figura 20 – 2**).
- **Paso 3:** Rotar la superficie de trabajo 45° en su eje (**Figura 20 – 3**) e identificar las cuatro puntas de la base (N, S, E, O) (**Figura 20 – 4**).
- **Paso 4:** Realizar el doblado de la punta E, hacia la punta O, pasando por encima del hidrogel (**Figura 20 – 5A**). Seguidamente, doblar la punta O hasta el límite de la base doblada en el extremo E, por encima de la base (**Figura 20 – 5B**).
- **Paso 5:** Doblar el extremo superior (N) e inferior (S) hacia el centro de la base, pasando por encima de los dobleces anteriores y sobreponiéndose uno en otro (**Figura 20 – 6A**).

- Paso 6: Reposicionar la estructura dándole la vuelta completa (180° sobre su eje vertical), de manera que los dobleces queden hacia la superficie. Deslizar la tira hacia arriba, por debajo de la estructura, hasta quedar a $\frac{1}{3}$ del extremo superior (N) de la estructura (**Figura 20 – 6B**).
- Paso 7: Tomar los extremos de la tira y anudarlos pasando ambas tiras por encima de todo, de manera que la estructura de hidrogel y hoja de bijao quede sujeta dentro de este primer nudo (**Figura 20 – 6C**).
- Paso 8: Una vez realizado el primer nudo, tomar los extremos de la tira y dirigirlos hacia los extremos N y S de la base (**Figura 20 – 6D**). Al realizar esta redirección de las tiras, se debe observar a las tiras en una forma similar a una cruz (“+”), apreciable en la figura (**Figura 20 – 6E**).
- Paso 9: Reposicionar la estructura dándole una vuelta completa (180° en su eje vertical) (**Figura 20 – 6E**). En este giro, la forma de cruz queda hacia la superficie de trabajo, y los extremos de la tira deben sobresalir por debajo de la estructura de hidrogel con hoja descelularizada, en sus extremos N y S, como se aprecia en la figura (**Figura 20 – 6F**).
- Paso 10: Doblar los extremos de la tira por encima de la estructura de hidrogel con hoja descelularizada (**Figura 20 – 7A**), cruzarlos a $\frac{2}{3}$ del extremo N, y estirarlos hacia los extremos E y O, para realizar un segundo nudo. Al redireccionar los extremos de la tira, se debe observar una forma semejante a una doble daga (“‡”), apreciable en la figura (**Figura 20 – 7B**).
- Paso 11: Reposicionar la estructura dándole vuelta completamente (180° en su eje vertical) (**Figura 20 – 7B**). En este giro, los extremos de la tira deben sobresalir por debajo de la estructura de hidrogel con hoja descelularizada.
- Paso 12: Tomar los extremos sobresalientes de la tira por encima de toda la estructura y anudarlos (**Figura 20 – 7C**). Realizar un segundo y tercer nudo con los extremos de tira sobresalientes del nudo anterior (**Figura 20 – 8**).

3.6.2.7. Análisis de liberación de oxígeno en hidrogel contenido dentro de hoja descelularizada (Tamal oxigénico).

Figura 21. Protocolo de medición de oxígeno liberado por tamales oxigénicos. Creado con BioRender



Utilizando plataformas oxigénicas de 1 cm x 1 cm, contenidas en hojas descelularizadas, se realizaron utilizando el sistema de medición óptico PreSens SDR, en el que se determinan los porcentajes de oxígeno liberado en el tiempo, tanto en ciclos de luz constante de 18 horas como en ciclos de luz y oscuridad de 1 hora y 30 minutos cada uno (**Figura 21**). Para llevar a cabo este ensayo se emplearon viales de 2 mL con sensores de oxígeno integrados en sus bases. Inicialmente, el sistema PreSens SDR fue conectado a una computadora fija, de acuerdo con lo establecido en el manual de usuario del fabricante. Una vez conectado el sistema, se configuró el software SDR proporcionado con el equipo. Seguidamente, la placa con sensor y su soporte cobertor fueron colocados en un cuarto oscuro, frente a una única fuente de luz, dentro de un sistema de incubación a 27 °C, siguiendo la técnica de implementación descrita por O'leary para compensar la posible difusión del gas y la formación de burbujas ante el aumento de la concentración dentro del sistema cerrado (O'Leary, 2019). Las plataformas cubiertas con hojas descelularizadas fueron colocadas en los viales de medición, de modo que el sensor no se obstruyera y las plataformas pudieran recibir luz directamente. Además, a estos viales de medición se les añadió suficiente medio de cultivo Bold 1X, de 1 mL a 2 mL, para rellenarlos por completo y facilitar la detección del oxígeno liberado por las plataformas oxigénicas. A estas muestras se les realizaron mediciones cada 3 minutos para identificar el tiempo de oxigenación real de estas plataformas en luz constante; posteriormente, estas muestras fueron expuestas a los ciclos de luz y oscuridad descritos previamente para evaluar su interacción con el medio, manteniendo mediciones cada 3 minutos.

3.7. Seguimiento de la investigación

El seguimiento de la investigación se llevará a cabo mediante un sistema organizado de supervisión técnica y administrativa, orientado a garantizar el cumplimiento de los objetivos, metas y plazos establecidos en la propuesta. Se realizarán revisiones técnicas semanales destinadas al análisis de resultados preliminares, la revisión metodológica y la planificación de las actividades inmediatas. De manera complementaria, se desarrollarán reuniones mensuales de evaluación integral del proyecto, en las cuales se contrastarán los progresos alcanzados con el cronograma establecido, verificando el cumplimiento de los objetivos y productos previstos.

Para fortalecer la organización y el control de las actividades, se emplearán herramientas digitales de gestión de proyectos, tales como cronogramas electrónicos en calendarios y matrices de seguimiento. Estas permitirán documentar avances, registrar ajustes metodológicos y consolidar los resultados experimentales.

Por otra parte, se mantendrán expedientes físicos, dentro de un cuaderno de laboratorio, que integren datos técnicos y respaldos estadísticos de los protocolos realizados. En este mismo ámbito, la calidad experimental se sustentará en la estandarización rigurosa de procedimientos, la validación interna de datos, la repetición sistemática de ensayos críticos y la comparación de resultados entre réplicas biológicas e independientes. Cuando se detecten resultados atípicos o inconsistencias, se activarán procesos de verificación técnica que incluirán recalibración de equipos, revisión de condiciones experimentales y repetición controlada de pruebas clave. Además, se mantendrá registro documentado de cualquier modificación metodológica realizada durante la ejecución del proyecto, asegurando transparencia y reproducibilidad.

3.8. Riesgos

Tabla 11. Riesgos asociados a la investigación				
ETAPA 1:	Analizar la viabilidad de integración de cloroplastos aislados en andamios, a partir de su capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo			
Riesgo	Probabilidad de ocurrencia	Nivel de impacto	Valor de riesgo	Propuesta de mitigación
Pérdida de funcionalidad fotosintética de los cloroplastos	2	3	6	Optimización de condiciones de aislamiento, control de temperatura y luz, realización de pruebas piloto y uso de controles funcionales previos a cada experimento.
Variabilidad biológica del material vegetal	2	2	4	Uso de hojas del mismo lote y estado fisiológico similar, estandarización de criterios de selección y registro de condiciones ambientales.
Manejo inadecuado de muestras durante extracción.	3	3	9	Trabajo en frío y oscuridad en todas las etapas del proceso, incluyendo la manipulación en centrifugaciones y filtrados.
Pérdida de funcionalidad de muestras al trasladarlas a microscopía	2	3	6	Utilizar alícuotas de la extracción obtenida, manipulándola a temperaturas bajas y sin exposición directa a la luz hasta su visualización.
Pérdida de funcionalidad de muestras estrés oxidativo en almacenamiento	1	3	3	Evitar la exposición de las muestras a luz directa aún dentro del espacio de almacenamiento, colocándolas dentro de un contenedor opaco.
Baja medición de oxígeno en muestras extraídas	2	3	6	Cuantificación de cloroplastos extraídos previo a la medición para asegurarse de no sobre diluir la muestra y mantener una concentración detectable para el sistema.
Fallo en sistema de refrigeración de muestras	1	3	3	Sistema de respaldo para el almacenamiento de muestras en frío y oscuridad.
Fallo en el sistema de medición de oxígeno	2	3	6	Verificación de calibración previo a cada sesión de medición con controles no oxigenantes y uso de estándares conocidos.
Retraso en adquisición de reactivos críticos	2	2	4	Planificación anticipada de compras y mantenimiento de inventario actualizado.
Limitaciones de acceso a laboratorio o equipos	3	1	3	Reprogramación flexible del cronograma y priorización de actividades de análisis de datos en periodos sin acceso experimental.

ETAPA 2:	Desarrollar un hidrogel de alginato fotosintético en una plataforma estructural tipo tamal descelularizado.			
Riesgo	Probabilidad de ocurrencia	Nivel de impacto	Valor de riesgo	Propuesta de mitigación
Contaminación o muerte de cultivo de microalgas	1	3	3	Aplicación de técnicas de bioseguridad para asegurar el trabajo en esterilidad.
Variabilidad biológica del material vegetal	2	2	4	Uso de hojas del mismo lote y estado fisiológico similar, estandarización de criterios de selección y registro de condiciones ambientales.
Pérdida de muestra por fallo en etapa de descelularización	1	3	3	Seguimiento detallado de protocolos estandarizados, evitando alterar tiempos de exposición y agitación.
Daño estructural en muestras descelularizadas en almacenamiento	1	3	3	Almacenamiento en condiciones de humedad controlada o soluciones conservantes, monitoreo periódico de integridad estructural y preparación de réplicas adicionales.
Fallo en el sistema de medición de oxígeno	2	3	6	Verificación de calibración previo a cada sesión de medición con controles no oxigenantes y uso de estándares conocidos.
Retraso en adquisición de reactivos críticos	2	2	4	Planificación anticipada de compras y mantenimiento de inventario actualizado.
Inestabilidad estructural del hidrogel	2	3	6	Ajuste de concentración polimérica, validación mecánica preliminar y pruebas de estabilidad antes de ensayos funcionales.
Baja traslucidez en hidrogel con hoja descelularizada	2	2	4	Verificación previa de potencia en el sistema de iluminación utilizado y solo dar aplicación a hojas totalmente transparentes.
Limitaciones de acceso a laboratorio o equipos	3	1	3	Reprogramación flexible del cronograma y priorización de actividades de análisis de datos en períodos sin acceso experimental.

CAPÍTULO 4
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS
RESULTADOS

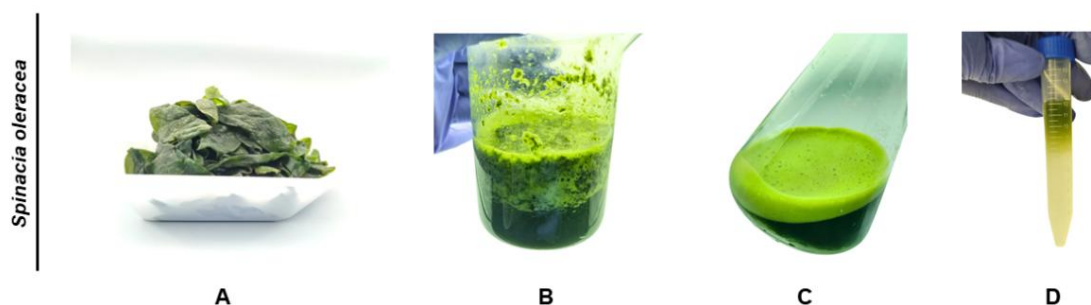
4. CAPÍTULO 4: ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

4.1. Resultados:

4.1.1. Etapas 1:

4.1.1.1. Aislamiento de cloroplastos a partir de espinaca

Figura 22. Proceso de extracción de cloroplastos a partir de hojas de espinaca.



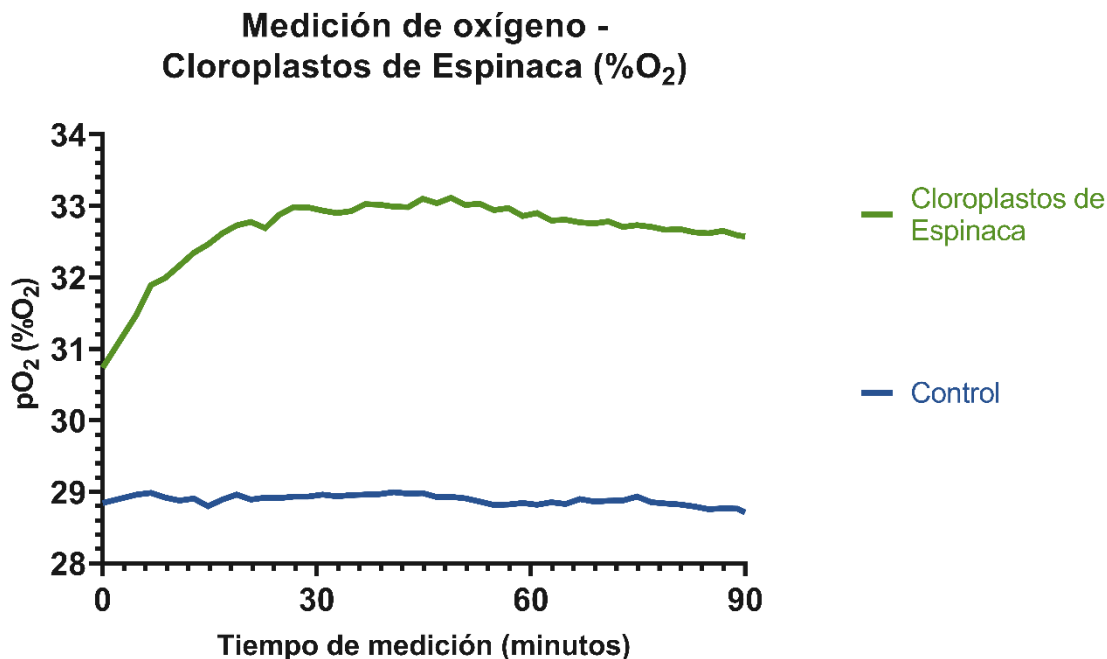
Nota: (A) corte, (B) homogenización, (C) filtrado y centrifugación y (D) separación por gradiente de Percoll.

El proceso de extracción permitió obtener una fracción enriquecida en cloroplastos a partir de hojas de *Spinacia oleracea*. Para esto, las muestras lavadas y cortadas (**Figura 22 – A**), homogenizadas (**Figura 22 – B**), filtradas y centrifugadas (**Figura 22 – C**) son trabajadas en frío y oscuridad, para ser posteriormente colocadas para centrifugación sobre un gradiente de Percoll (**Figura 22 – D**), donde se observa la formación de un pellet blanquecino, una banda semi definida en la parte superior del gradiente y otra mayormente definida localizada en la interfase entre las capas de 40-80%, correspondiente a la fracción recuperada. Esta fracción presentó una coloración verde intensa, característica de la presencia de pigmentos fotosintéticos.

La suspensión obtenida a partir de la extracción de hojas de *Spinacia oleracea* pierde su tonalidad de verde intenso al ser expuesta a temperaturas superiores a -18 °C durante más de 2 horas, aún al ser mantenidas en oscuridad, tornándose verde oscuro. Fue posible identificar que este tono se mantiene por hasta 8 meses, manteniendo condiciones de almacenamiento en oscuridad a -18 °C, además de que, posterior a este almacenamiento, algunas muestras presentaban una mayor concentración de verde oscuro, perceptible como precipitado, en las bases de los tubos utilizados para su de almacenamiento.

4.1.1.2. Análisis de capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo de cloroplastos aislados

Gráfica 4. Medición de oxígeno en el tiempo detectado en muestras de cloroplastos extraídos.



Nota: muestra utilizada con n = 6.

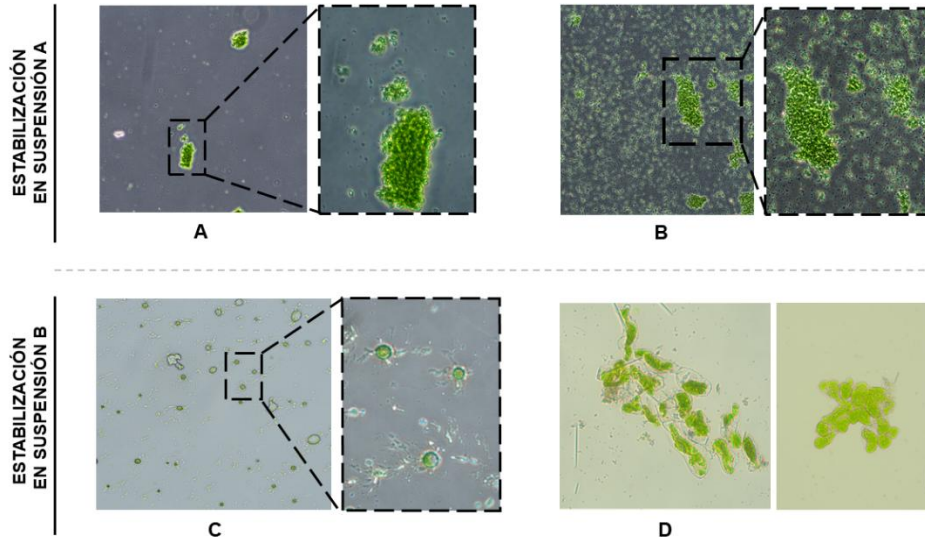
El comportamiento de los cloroplastos aislados de espinaca, en contraste con un control de su medio de suspensión, permite obtener mediciones comparables entre muestras en un tiempo total de 90 minutos. En el gráfico (**Gráfica 4**) se observa el inicio de un aumento exponencial del porcentaje parcial de oxígeno detectado en los cloroplastos de espinaca, mientras que las muestras de control permanecen en valores estables durante todo el ensayo, reconociendo que los cloroplastos extraídos no resultaron viables por un lapso significativo.

De manera específica, el porcentaje parcial de oxígeno detectado en el tiempo para las muestras de cloroplastos de espinaca varía de la siguiente manera: 32.16% en los primeros 10 minutos, 32.93% a los 30 minutos de medición, 33.11% a los 50 minutos y 32.6% a los 90 minutos, con un valor mínimo registrado de 30.73% en el tiempo 0. Por otro lado, los controles de medio de suspensión se mantuvieron en $28.8 \pm 0.10\%$ de oxígeno disuelto a lo largo de la medición.

4.1.1.3. Caracterización de cloroplastos por microscopía

4.1.1.3.1. Microscopía de campo claro

Figura 23. Microscopía en campo claro de cloroplastos extraídos y estabilizados en suspensiones

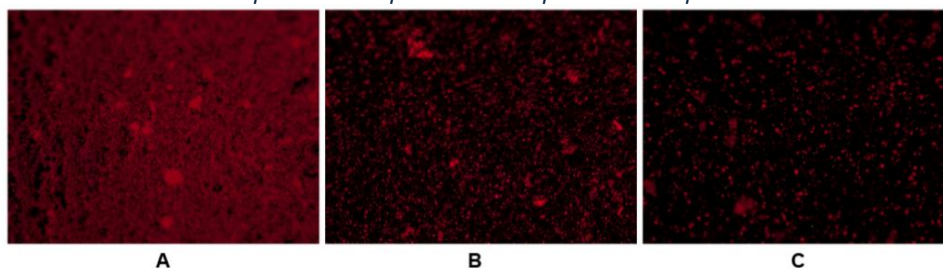


Nota: (A – B) muestras suspensión A compuesta por Glicerol + BSA y (C - D) muestras en suspensión B compuesta por Glutaraldehído.

La caracterización microscópica permitió evaluar la morfología y distribución de los cloroplastos tanto en suspensión (**Figura 23**). Mediante microscopía en campo claro, los cloroplastos aislados se observaron como estructuras con contornos bien definidos y una coloración verde característica. Estas estructuras se presentaron dispersas en el medio con suspensión A, con una distribución relativamente homogénea y evidencia de pequeñas agrupaciones microscópicas sin borde definido (**Figuras 23 – A y 23 – B**). Para la suspensión B, se identificaron variaciones en la definición de los bordes y en la intensidad de la coloración entre distintas partículas, con formas semejantes a cápsulas pequeñas con contenido verde intenso (**Figura 23 – C**), así como la presencia de estructuras agrupadas de mayor tamaño con morfología irregular, igualmente rellenas de un pigmento verde intenso y con bordes parcialmente definidos con agrupaciones (**Figura 23 – D**).

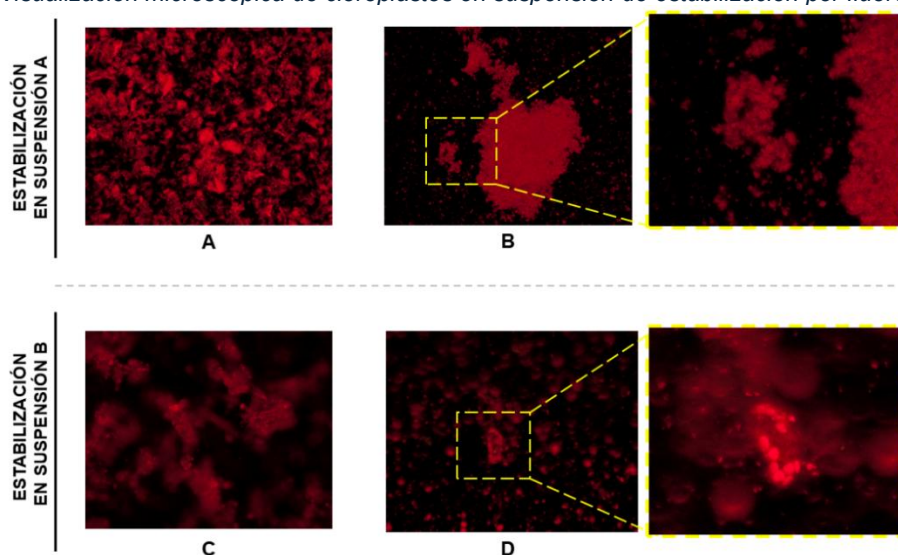
4.1.1.3.2. Microscopía de fluorescencia

Figura 24. Visualización microscópica de cloroplastos en suspensión libre por fluorescencia.



Nota: (A) gota concentrada sin distribución, (B) inicio de gradiente de distribución, (C) final de gradiente de distribución. Objetivo utilizado: 4X.

Figura 25. Visualización microscópica de cloroplastos en suspensión de estabilización por fluorescencia.



Nota: Suspensiones de estabilización utilizadas (A - B) suspensión A (A, B) y (C - D) suspensión B. Objetivo: 10X (A, C), 20X y 40X (B, D).

La visualización mediante microscopía de fluorescencia confirmó la presencia de cloroplastos mediante su auto fluorescencia característica. En las muestras en suspensión, se observó señal fluorescente en el canal rojo, correspondiente a la emisión de los pigmentos fotosintéticos, con distribución variada conforme la manipulación de la muestra. En condiciones de alta concentración, se observó una señal fluorescente intensa localizada en regiones específicas, sin una distribución homogénea en el campo visual (**Figura 25 – A**), a medida que la muestra presentó un gradiente de dispersión, la señal fluorescente mostró una transición hacia una distribución más extendida (**Figura 25 – B**), alcanzando finalmente una disposición más uniforme con menor intensidad localizada (**Figura 25 – C**).

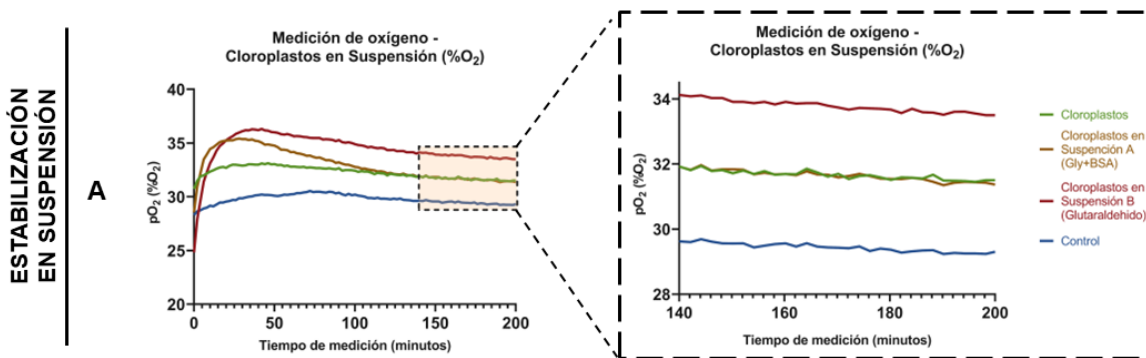
En las suspensiones sometidas a procesos de estabilización, se observaron diferencias en el patrón de fluorescencia entre las condiciones evaluadas. La suspensión A presentó una señal fluorescente definida, con menor uniformidad en su distribución, caracterizada por la presencia de grandes agrupaciones sin bordes definidos (**Figura 25 – A**) y un tono tenue de fluorescencia, apreciable dentro de las estructuras aglomeradas, tras la excitación inicial (**Figura 25 – B**). Por su parte, la suspensión B evidenció una mayor definición estructural y una distribución más homogénea del material fluorescente, con agrupaciones de sistemas ovoides en estructuras con bordes definidos (**Figura 25 – C**) y una tonalidad roja intensa encapsulada en el contenido dentro de ellas (**Figura 25 – D**). A mayores aumentos (20X y 40X), en la suspensión B es posible identificar con mayor claridad estructuras discretas compatibles con cloroplastos, con una señal más delimitada que en la suspensión A.

4.1.1.4. Estabilización de cloroplastos aislados en suspensión

La aplicación de los protocolos de estabilización permitió obtener suspensiones de cloroplastos con características macroscópicas diferenciadas según el tratamiento aplicado. En el caso del sistema basado en BSA y glicerol, la suspensión resultante presentó una coloración verde tenue y homogénea, y se mantuvo estable tras su almacenamiento a -20 °C, sin evidencia de agregación visible ni separación de fases al momento de su recuperación. Por su parte, las muestras tratadas con glutaraldehído presentaron una modificación en la apariencia de la suspensión, observándose una coloración verde más intensa y una ligera tendencia a la formación de pellets compactos tras los procesos de centrifugación y lavado para la remoción de los aldehídos excedentes.

4.1.1.5. Análisis de capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo de cloroplastos estabilizados

Gráfica 5. Mediciones de liberación de oxígeno de cloroplastos estabilizados en suspensión A y suspensión B.



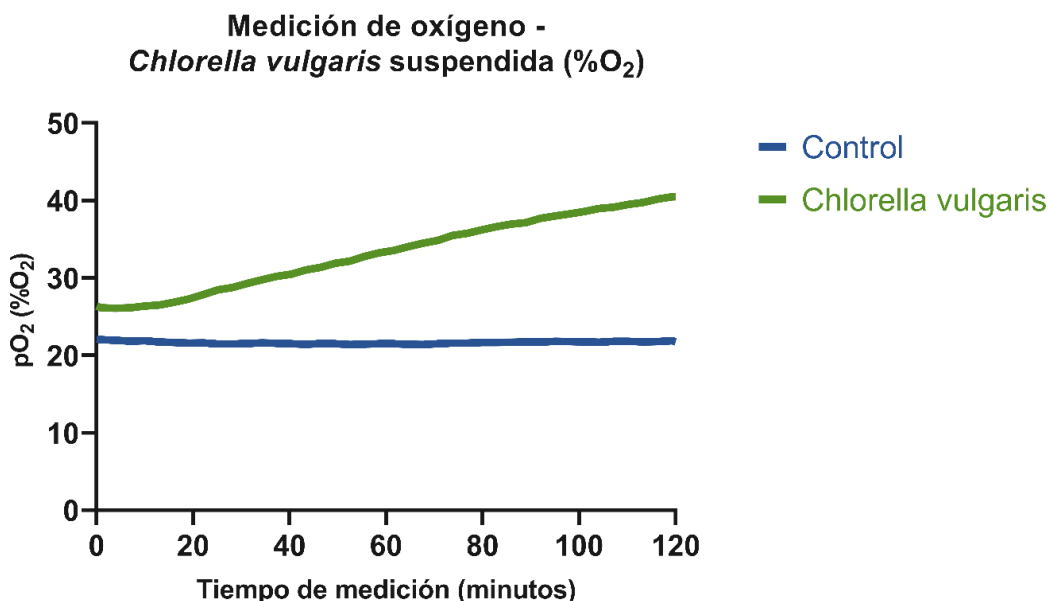
Nota: muestras utilizadas con n=6.

La capacidad de liberación de oxígeno de los cloroplastos estabilizados en suspensión presenta un comportamiento dinámico durante aproximadamente 200 minutos de medición (**Gráfica 5 – A**). En términos generales, las muestras presentaron un incremento inicial en el porcentaje de oxígeno disuelto, seguido de la aparición de un punto máximo de liberación: en las muestras sin agente de estabilización se observó un valor máximo de 32.98% a los 24 minutos, mientras que las muestras estabilizadas mediante la suspensión A (glicerol + BSA) alcanzaron un valor de 35.26% a los 20 minutos. Por su parte, las muestras estabilizadas con la suspensión B (glutaraldehído) mostraron un máximo de 36,31% a los 42 minutos, lo que evidencia una respuesta más tardía en comparación con las demás condiciones.

Posterior al punto máximo de liberación, las muestras estabilizadas presentaron una disminución progresiva de los niveles de oxígeno detectado hasta el final del ensayo. A los 200 minutos, las muestras con estabilización mediante suspensión B mantuvieron el valor más elevado, con un registro de 33,5%, mientras que las muestras con estabilización A y las sin agente estabilizante presentaron valores similares, en el orden de 31,42% y 31,50%, respectivamente. En contraste, el control experimental mostró un comportamiento estable durante todo el periodo de medición, con valores cercanos al $28.8 \pm 0.5\%$, sin variaciones significativas.

4.1.1.6. Análisis de la capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo de microorganismos fotosintéticos.

Gráfica 6. Mediciones de liberación de oxígeno de microalgas suspendidas.



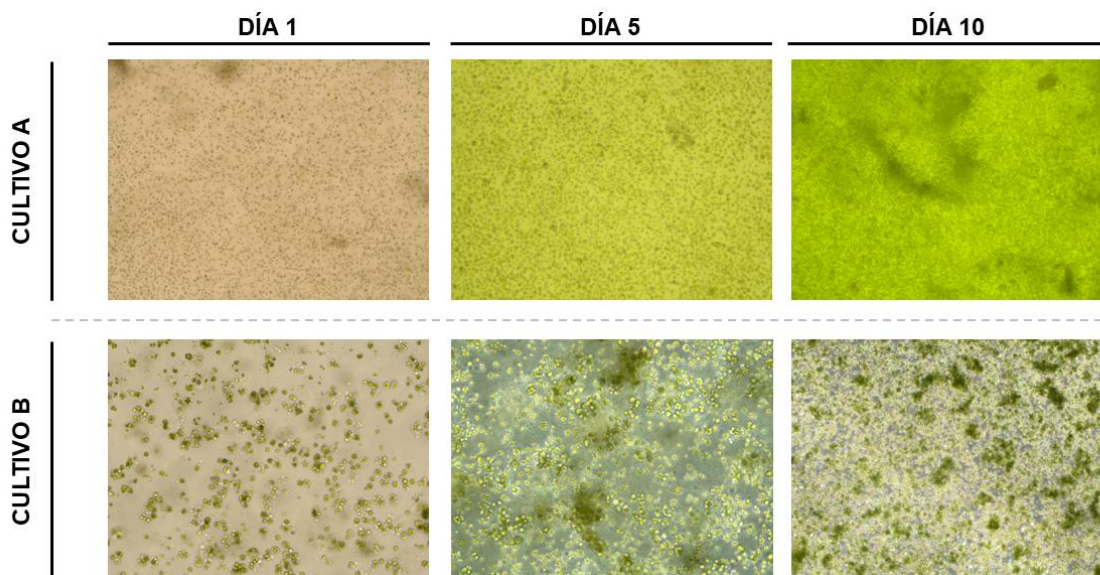
Nota: muestras utilizadas con n=2.

La medición del porcentaje de oxígeno diluido a lo largo del tiempo, calculado por el sistema a través de la presión parcial de oxígeno, evidenció un comportamiento diferencial entre el grupo control y la suspensión con microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* utilizada en una concentración de 19.25×10^6 células/mL, como es apreciable en el gráfico (**Gráfica 6**). Para el ciclo de luz constante de dos horas, las microalgas mostraron un incremento progresivo en los niveles de oxígeno detectado, iniciando en valores cercanos al 26.35% al tiempo 0 y alcanzando el 40.41% al final del ensayo. Este aumento se produjo de manera sostenida, con una tendencia casi lineal bajo las condiciones de iluminación aplicadas, de manera que no se observaron fluctuaciones abruptas en la concentración de oxígeno detectada, evidenciando un comportamiento estable durante todo el ensayo. Similarmente, las mediciones del grupo control presentaron valores relativamente estables manteniéndose en un rango aproximado de 21-22% a lo largo de todo el periodo de medición. En comparación con experimentos previos realizados con cloroplastos aislados, este sistema presentó una mayor consistencia en los datos obtenidos, por lo que se sostiene su aplicación en las siguientes etapas experimentales.

4.1.2. Etapa 2: Desarrollar un hidrogel de alginato fotosintético en una plataforma estructural tipo tamal descelularizado.

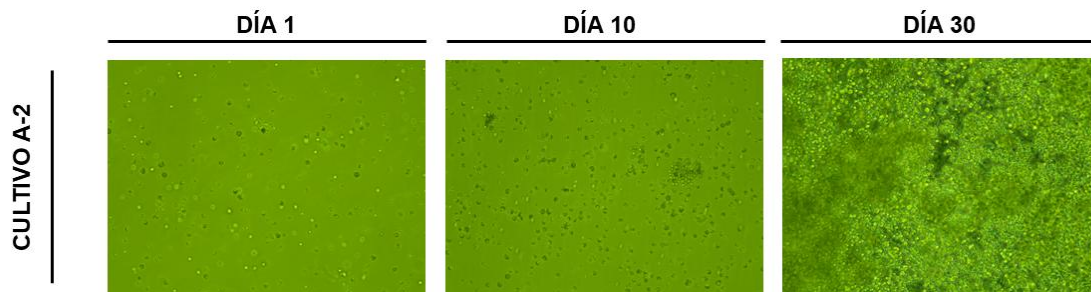
4.1.2.1. Cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris*

Figura 26. Fotografía microscópica representativa del crecimiento de microalgas *Chlorella vulgaris*



Nota: seguimiento en los días 1, 5 y 10: cultivo A fotografiado con objetivo 4X para los 3 días y cultivo B fotografiado con objetivo 10X para el día 1, día 5 y 4X para el día 10.

Figura 27. Fotografía microscópica representativa del crecimiento de un subcultivo de *Chlorella vulgaris*



Nota: seguimiento a 30 días fotografiado en los días 1, 10 y 30, con objetivo 20X para los 3 días.

El crecimiento de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* se desarrolló en dos cultivos derivados de otros dos cultivos existentes en el centro de investigación, actuando como inóculos. La evolución de cada uno de los cultivos es apreciable en la figura (**Figura 26**), donde se observa un cambio en la densidad óptica y la confluencia, así como un cambio colorimétrico evidente en el cultivo A con el paso de los días expuestos a luz constante.

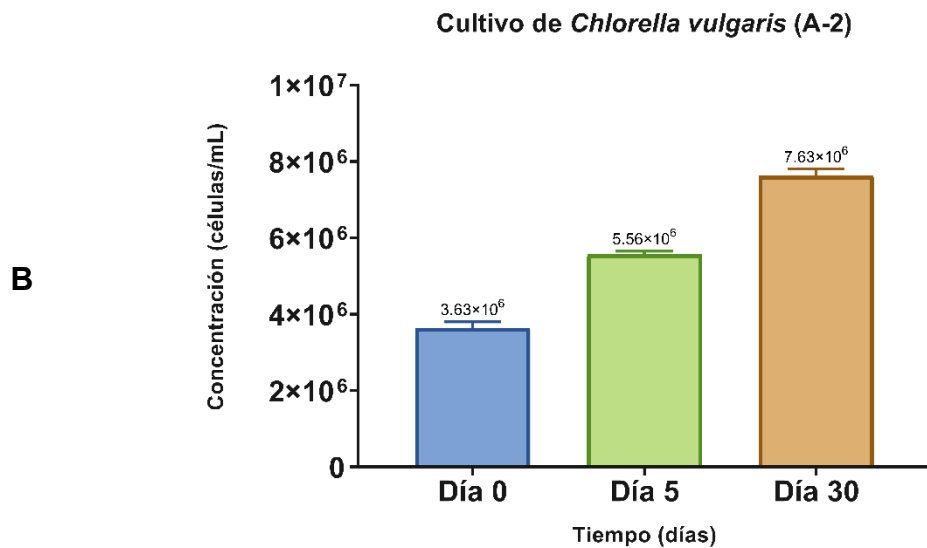
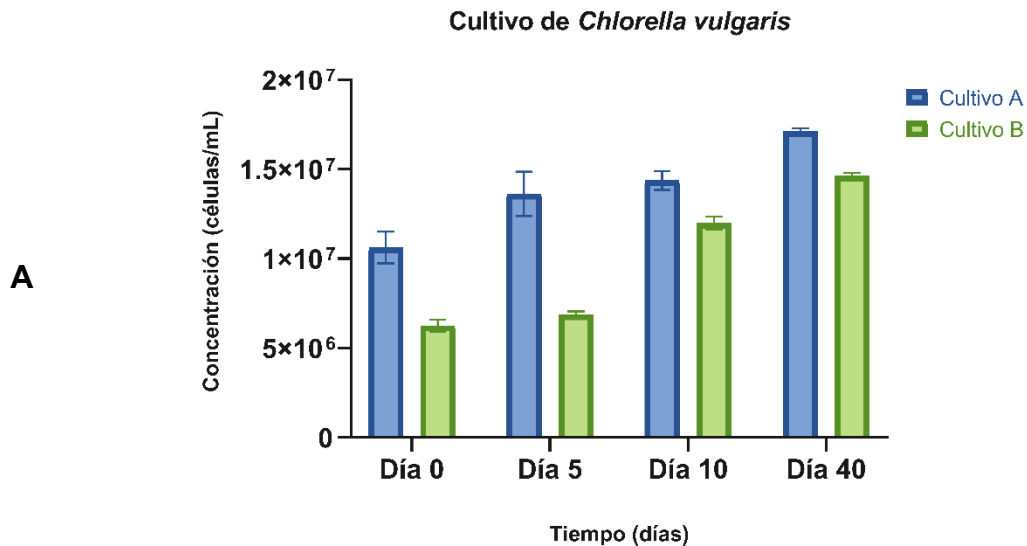
En el día 1, ambos cultivos presentan una baja densidad óptica, con confluencias aproximadas de 30-35% para el primer cultivo y de 15-20% para el segundo, pudiéndose apreciar microalgas dispersas al observarlos bajo microscopía de campo claro. En el día 5, el cultivo A presenta un mayor aumento de la densidad óptica, apreciable en comparación con el cultivo B, de manera que en el cultivo A se estima una confluencia del 40-45% y, en el cultivo B, una de entre 25-30%. Además, en este día, el cultivo A presenta un cambio colorimétrico asociado a una mayor cantidad de agrupaciones de microalgas, distinguibles al observar los cultivos al microscopio.

Por su parte, el cultivo B mantiene su tonalidad inicial y es posible observar, al microscopio, un pequeño aumento en la cantidad de microalgas agrupadas. Durante los siguientes días, se presume que ambos cultivos entraron en fase de crecimiento exponencial, puesto que para el día 10 es apreciable la mayor cantidad de microalgas agrupadas registradas a la fecha de seguimiento, con confluencias estimadas entre el 90-95% para el cultivo A y 70-75% para el cultivo B. Finalmente, en ambos cultivos se observa una alta densidad óptica y los cultivos sostienen un cambio en tonalidad, aún al observarse por microscopía, presentando una tonalidad sepia indicativa de necesidad de un cambio de medio a los 40 días de la siembra inicial.

Posterior a este cambio de medio, con la expansión del cultivo A se presentaron cambios físicos similares apreciables por microscopía, como es demostrado en la figura (**Figura 27**), con la peculiaridad de un mantenimiento en la tonalidad de verde observado, a pesar del evidente aumento en la densidad óptica y agrupaciones identificable posterior a 30 días de crecimiento: en el día 1 se cuenta con una confluencia menor al 10% de la superficie total del cultivo, al día 10 se presenta un aumento con una confluencia apreciable cercana al 20-25% y para el día 30 la confluencia visual aumenta significativamente a un 85-90%.

4.1.2.2. Cuantificación de cultivos de microalgas

Gráfica 7. Crecimiento de microalgas de la especie *Chlorella vulgaris*.



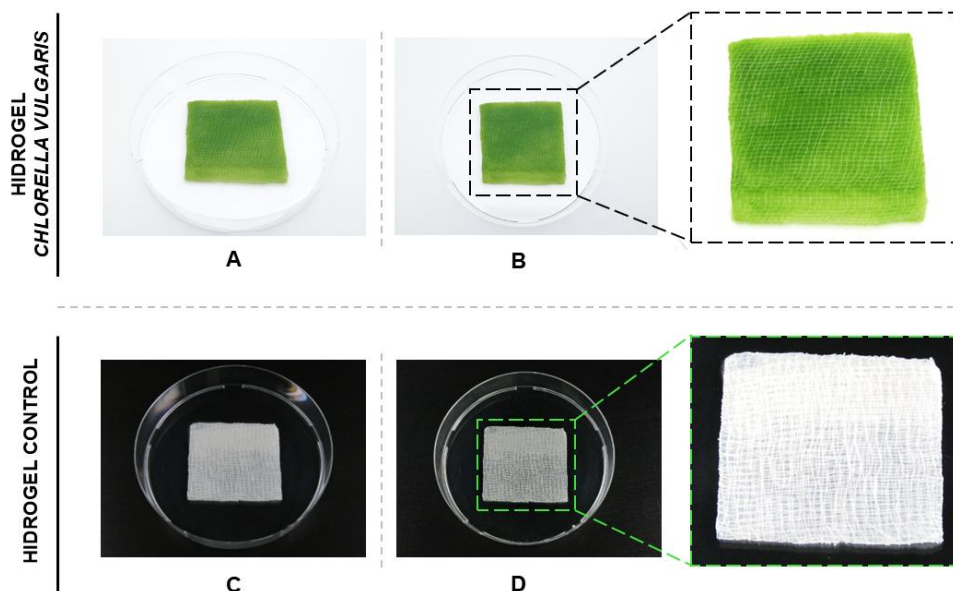
Nota: seguimiento de cultivos iniciales a 40 días (A) y seguimiento de subcultivos a 30 días (B).

La evolución cuantitativa de los cultivos de *Chlorella vulgaris* es descrita en el gráfico (Gráfica 7), a partir de los datos obtenidos mediante cuantificación celular manual en la Cámara de Neubauer. Para el día 0, el cultivo A presenta una densidad celular de 1.06×10^7 células/mL y el cultivo B presenta una densidad celular de 6.25×10^6 células/mL, lo que corresponde a la fase de inoculación en un volumen total de 10 mL. Al día 5 se registra un aumento significativo en el cultivo A, con una densidad

celular cuantificada de 1.36×10^7 células/mL, mientras que el cultivo B mantiene una densidad celular similar a la registrada anteriormente, con 6.88×10^6 células/mL. Para el día 10 se registra una densidad celular de 1.44×10^7 células/mL para el cultivo A y de 1.2×10^7 células/mL para el cultivo B, resaltando que la diferencia entre el último registro y este sugiere que ambos cultivos entraron en fase de crecimiento exponencial entre el quinto y el décimo día de mantenimiento bajo luz constante y agitación diaria. Finalmente, a los 40 días de siembra, tras el cambio de medio y matraces, se identifica, por cuantificación, una densidad celular de 1.71×10^7 células/mL para el cultivo A y 1.46×10^7 células/mL para el cultivo B, y se realiza la siembra del subcultivo A-2 con 3.63×10^6 células/mL iniciales, resaltando que en esta fecha de inspección ambos cultivos presentan una tonalidad verde intensa, indicativa de su crecimiento (**Gráfica 7 – A**). El subcultivo A-2 se desarrolló durante 30 días, registrándose su crecimiento en el día 10 con 5.56×10^6 células/mL y al día 30 con 7.63×10^6 células/mL (**Gráfica 7 – B**).

4.1.2.3. Elaboración de hidrogeles oxigenantes con microalgas

Figura 28. Hidrogeles con alginato de sodio polimerizado.



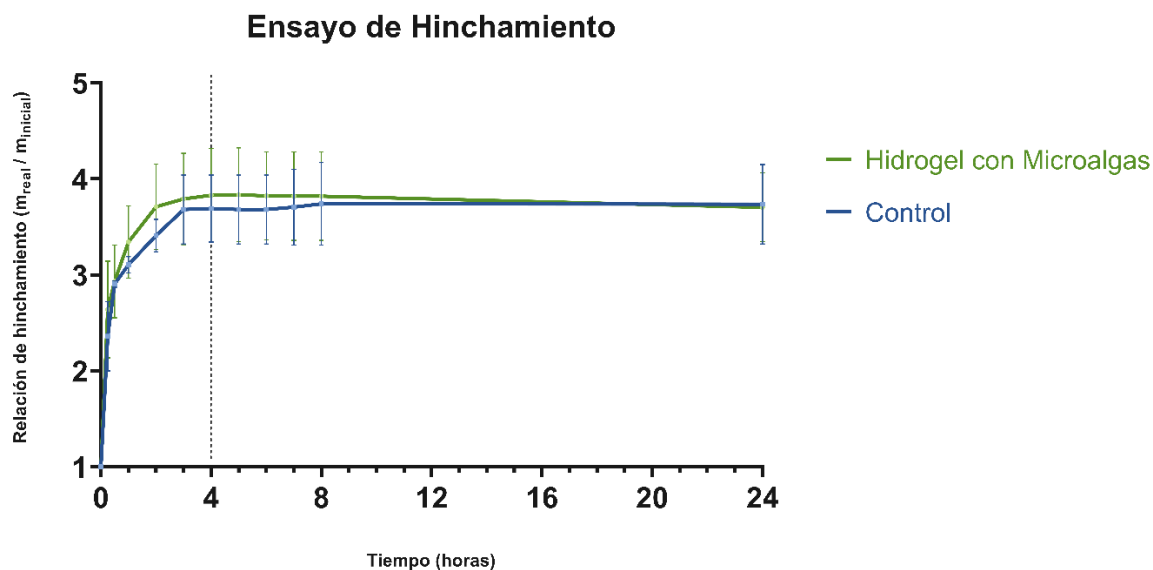
Nota: panel superior con hidrogeles integrados con microalgas (A y B) y panel inferior con hidrogel de control (C y D). Comparación con plato de Petri de 100 mm (A, C) y acercamiento (B, D).

La elaboración de hidrogeles a base de alginato de sodio, con microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* suspendidas en medio Bold 1X, permitió obtener estructuras con morfología definida y apariencia homogénea tras la polimerización con cloruro de calcio. A escala macroscópica, los hidrogeles presentaron una consistencia firme y una geometría estable, manteniendo su integridad durante la manipulación. En comparación con los hidrogeles de control elaborados únicamente con medio Bold 1X, no se observaron diferencias evidentes en la forma general ni en la cohesión estructural de las muestras (**Figura 28 – A y Figura 28 – C**).

Tras su transferencia a medio Bold 1X, los hidrogeles con microalgas conservaron una coloración verde intensa, distribuida de manera relativamente uniforme a lo largo de toda su estructura. Esta coloración se mantuvo durante el periodo inicial de observación, sin evidencia de decoloración localizada ni de formación de zonas heterogéneas visibles (**Figura 28 – B**). De manera similar, los hidrogeles control presentaron una apariencia traslúcida homogénea, sin cambios macroscópicos en su estructura ni en su consistencia durante su almacenamiento en el medio de cultivo (**Figura 28 – D**).

4.1.2.4. Análisis de capacidad de hinchamiento de hidrogeles oxigenantes con microalgas

Gráfica 8. Variación en relación de hinchamiento a las 24 horas de los hidrogeles oxigenantes y control.



Nota: Muestras utilizadas con $n=3$.

En el gráfico (**Gráfica 8**) es posible identificar el aumento en la relación de hinchamiento tanto de los hidrogeles con microalgas *Chlorella vulgaris* incorporadas como parte de una película polimerizada de alginato disuelto en medio Bold 1X, como en los hidrogeles control elaborados únicamente con alginato y medio Bold 1X, con una misma base de gasa estéril para proporcionar soporte estructural.

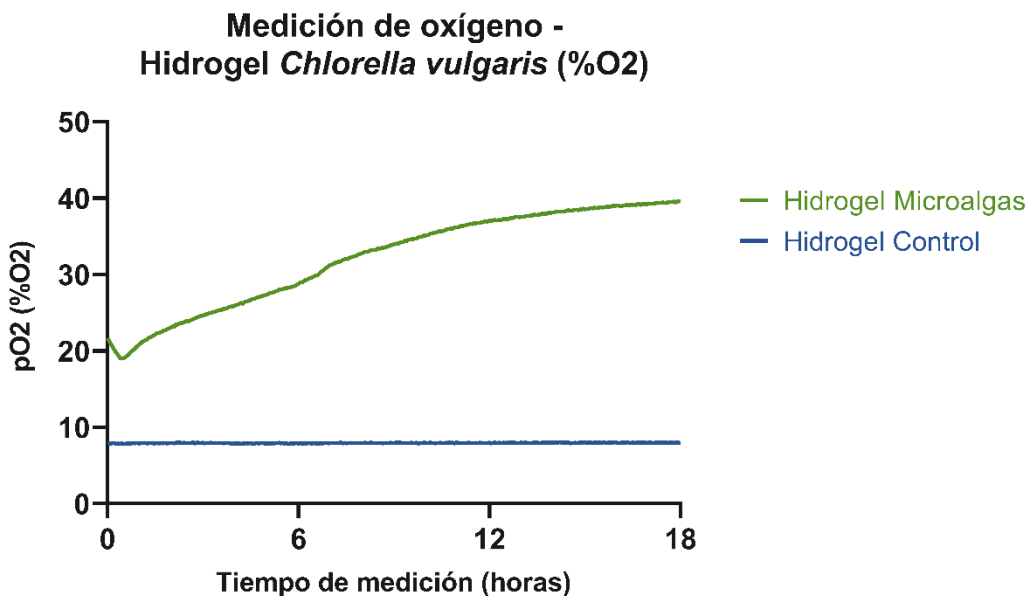
Durante las primeras tres horas de exposición se observa un aumento exponencial en la masa registrada para todas las muestras, descritas a continuación: ambas muestras inician con una relación de hinchamiento de 1.0, posterior a los primeros 15 minutos de incubación en solución salina, la muestra de hidrogel con microalgas mantiene una relación de hinchamiento de 2.64, mientras que el control presenta un valor de 2.36; a los 30 minutos, la relación de hinchamiento para la muestra de hidrogel con microalgas aumenta a 2.93, así como la del hidrogel control a 2.91; para la primera hora de exposición, la muestra de hidrogel de microalgas presenta 3.35 en su relación de hinchamiento, mientras que la muestra control aumenta a una relación de hinchamiento de 3.11; a los 120 minutos de medición, o dos horas, la relación de hinchamiento aumentó a 3.71 para la muestra de hidrogel con

microalgas y a 3.41 para la muestra control, similarmente, con el registro de las 3 horas se observa una relación de hinchamiento de 3.79 para la muestra de hidrogel y un aumento a 3.68 para la muestra control.

Posterior a este punto, los hidrogeles con microalgas y los de control presentaron relaciones de hinchamiento similares con varianza mínima, registrando 3.83 para el hidrogel con microalga y 3.68 para el hidrogel control a la cuarta, quinta y sexta hora, 3.82 y 3.70 en la séptima hora, 3.82 y 3.74 para la octava hora, culminando con un registro en la relación de hinchamiento de 3.71 para el hidrogel de alginato con microalgas y de 3.73 para el hidrogel control a las 24 horas de medición.

4.1.2.5. Análisis de liberación de oxígeno en el tiempo de hidrogeles oxigenantes con microalgas

Gráfica 9. Representación de la liberación de oxígeno registrada en hidrogeles con microalgas.

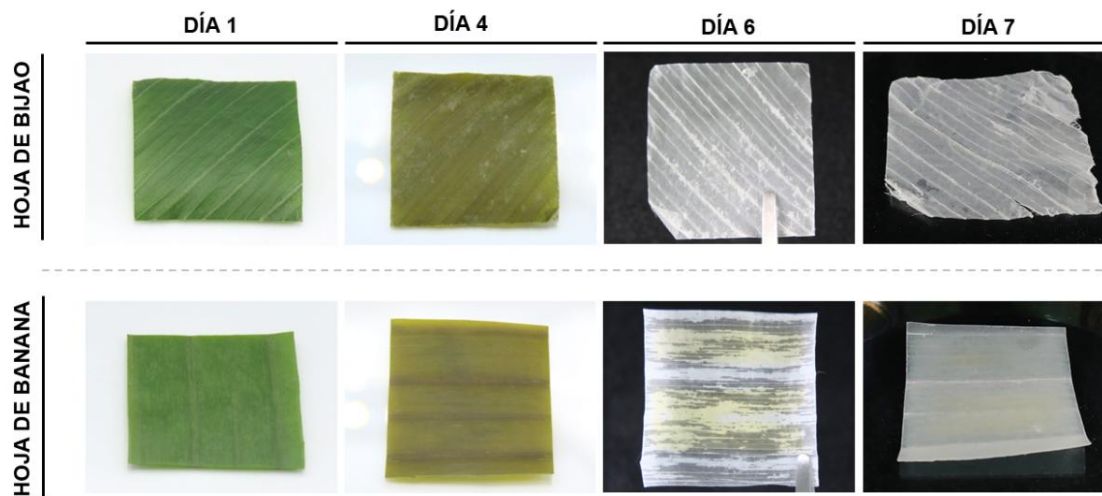


Nota: muestras expuestas a luz constante en el sistema PreSens SDR con n=3.

Las mediciones bajo una fuente externa de luz constante tienen un efecto apreciable en los hidrogeles con microalgas, al registrar un aumento de la presión parcial de oxígeno en comparación con las muestras control, posterior a los primeros 25 minutos de medición, de manera que las muestras de hidrogeles con microalgas muestran un crecimiento exponencial en la concentración detectada, mientras que aquellas sin microalgas mantienen valores estables. A partir del punto mencionado, el porcentaje parcial de oxígeno detectado varía en el tiempo para las muestras de microalgas aumentando conforme a lo descrito en el gráfico (**Gráfica 9**) siendo: 18.99% para el tiempo de 0.45 horas, 20.85% para la primera hora, 23.07% para la medición a las 2 horas, 25.93% en 4 horas, 28.74% en 6 horas, 32.74% en 8 horas, 35.10% en 10 horas, 37.04% en 12 horas, 38.13% en 14 horas, 38.99% en 16 horas, llegando a un valor máximo registrado de 39.56% de oxígeno en la hora 18 del ensayo, donde se le da conclusión. Por su parte, el hidrogel control presentó un valor de $7.9 \pm 0.07\%$ durante toda la duración del ensayo.

4.1.2.6. Descelularización de hojas tropicales.

Figura 29. Evolución en macrofotografía de muestras durante el proceso de descelularización en hojas



Nota: progreso en bijao (superior) y en hoja de banana (inferior), con seguimiento durante 7 días.

El proceso de descelularización realizado durante 7 días en muestras frescas de hoja de banana y bijao provoca cambios en su color, opacidad, permeabilidad y, ligeramente, en su rigidez. El día 1 de descelularización, las muestras de ambas especies de hoja presentan mayor flexibilidad y un cambio leve en la tonalidad de verde posterior al proceso de hervido y mejor permeabilidad a medios acuosos posterior al proceso de remoción de cutícula con hexano (**Figura 29 – Día 1**). El día 4 las muestras, tanto de hoja de banana como de bijao, presentan un cambio evidente en su colorimetría al pasar de un tono verde a un tono marrón oscuro en caso de las hojas de banana y marrón claro en las hojas de bijao, similar a lo visualizado en estudios de desnaturalización de hojas o el proceso natural de degradación de hojas posterior a su separación del tallo principal (**Figura 29 – Día 4**). En el día 5, posterior a las primeras 24 horas en la solución decolorante, las muestras de bijao presentan un avance significativo en el área tornada blanca de la hoja, llegando a cubrir aproximadamente el 80% de la totalidad de la muestra; mientras que las hojas de banana aún presentan mayoritariamente la tonalidad mayor del día anterior, con áreas blancas únicamente ubicadas en los bordes y dobleces naturales de la hoja.

En el día 6, las muestras de hoja de bijao presentan una decoloración total sin afectar la integridad estructural de la muestra, lo que constituye el principal indicativo de una descelularización efectiva; por su parte, las muestras de hoja de banana mantienen secciones con tonalidades amarillas oscuras, con un porcentaje aproximado del 70% de decoloración del área total (**Figura 29 – Día 6**). Finalmente, en el día 7, las muestras de banana se perciben totalmente decoloradas, con una tonalidad blanca uniforme por toda su extensión, sin comprometer su integridad estructural; es importante resaltar que las muestras de hoja de bijao se vuelven más traslúcidas en este día, más la integridad de las muestras se pierde totalmente, volviéndose quebradizas al momento de manipularlas (**Figura 29 – Día 7**).

4.1.2.7. Caracterización de andamios descelularizados por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Figura 30. Fotografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de una hoja tropical nativa y descelularizada

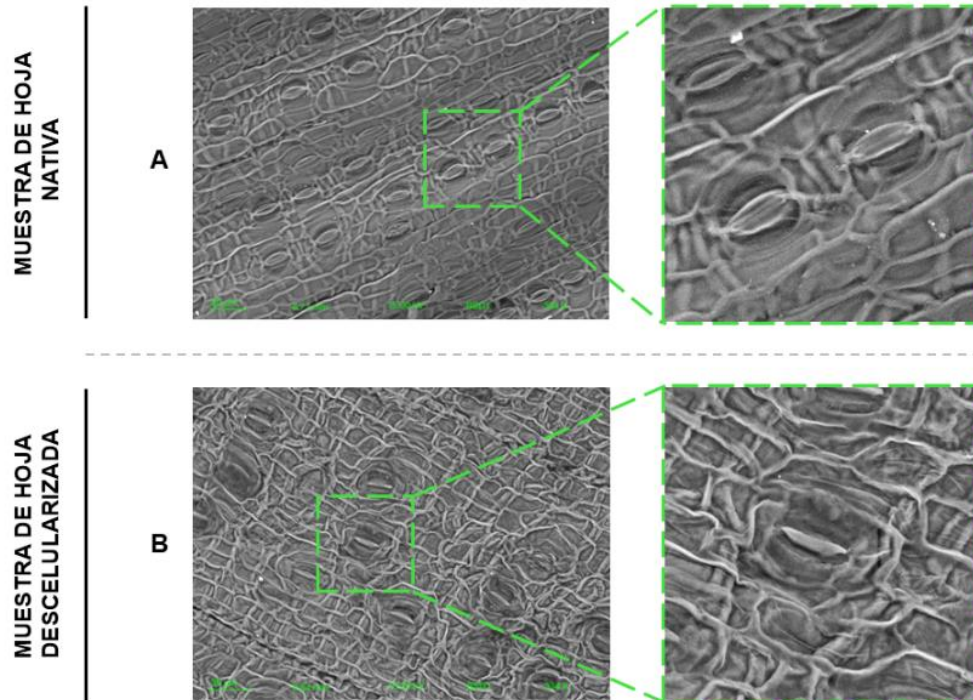
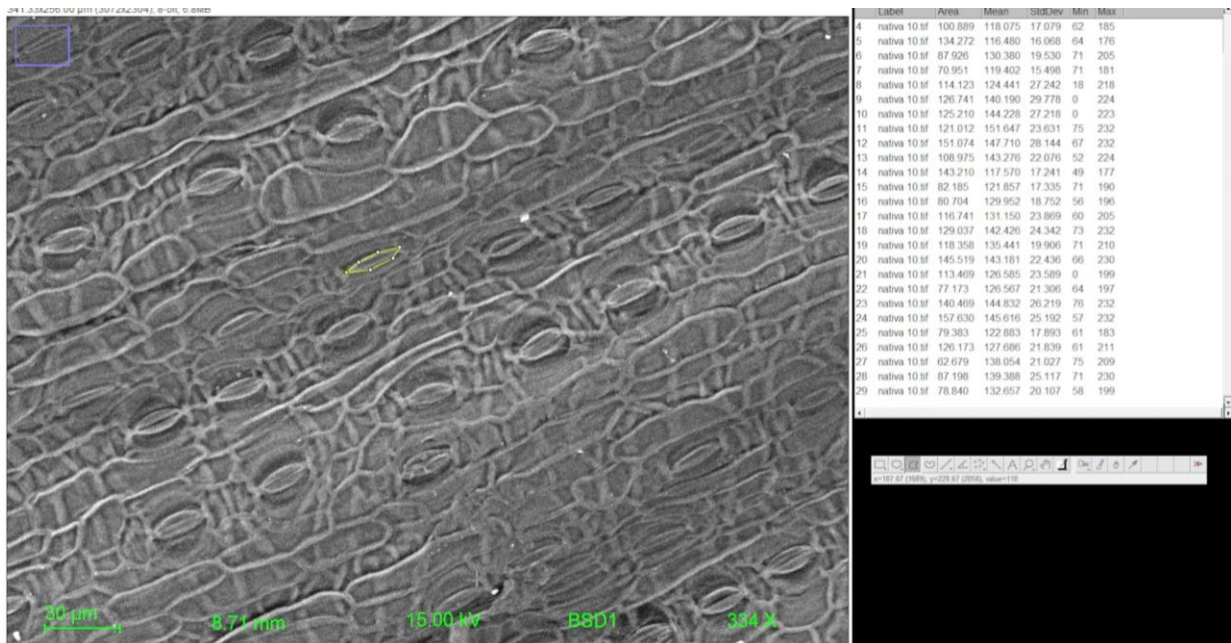


Figura 31. Determinación manual de tamaño de estomas por ImageJ.

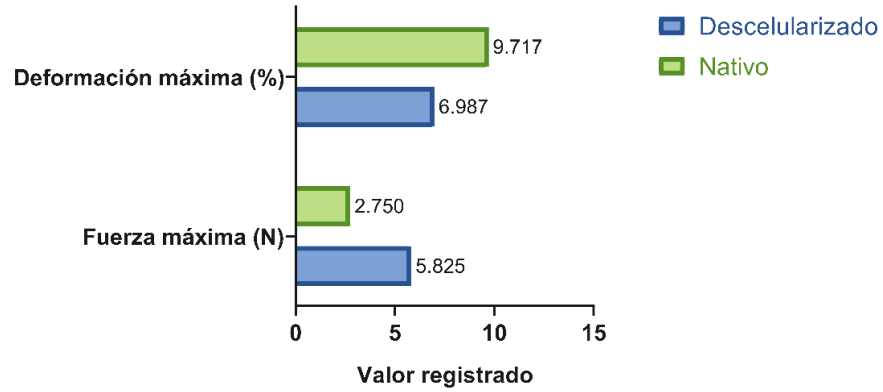


La caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido permitió evaluar la microestructura superficial de los andamios **(Figura 30)**. En la muestra nativa se observó una arquitectura altamente organizada, caracterizada por una estructura definida y la presencia de estomas distribuidos de manera relativamente uniforme, con morfología elíptica bien delimitada y orientación preferencial a lo largo del tejido, lo que evidencia la integridad estructural del material vegetal original **(Figura 30 – A)**. En contraste, la muestra descelularizada conservó la organización general del tejido; sin embargo, se observó una modificación en la definición de las estructuras superficiales, con estomas que permanecen identificables, aunque con contornos menos definidos y una apariencia más irregular en comparación con la muestra nativa, presentando una topografía más heterogénea **(Figura 30 – B)**.

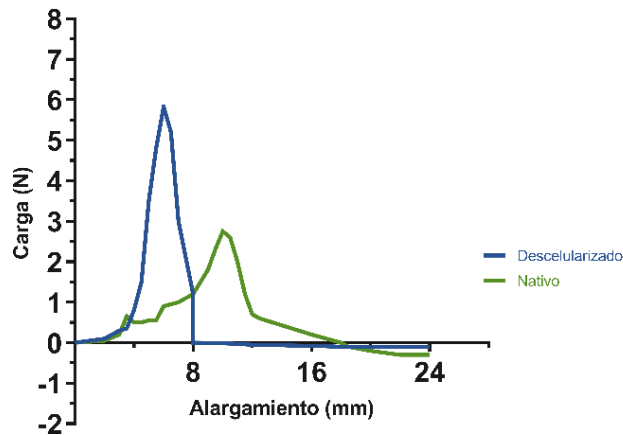
Por otra parte, el análisis de imagen digital permitió estimar las dimensiones de las estructuras porosas observadas. En la muestra nativa, los estomas presentan longitudes del orden de 20–30 μm , con ostiolos centrales de aproximadamente 5–10 μm . Por su parte, en la muestra descelularizada, estas estructuras centrales presentan dimensiones ligeramente menores y una mayor variabilidad, con aperturas en el rango aproximado de 3–8 μm y estomas de forma alargada e irregular, con longitudes más cercanas a 30 μm . Adicionalmente, mediante el análisis de partículas manual en ImageJ, se estimó el área de los ostiolos y estomas, evidenciando una distribución heterogénea en ambas condiciones, sin diferencias abruptas en el orden de magnitud de las dimensiones evaluadas: los ostiolos en las muestras nativas presentaron un área promediada de $114 \pm 22 \mu\text{m}^2$ y sus estomas con un área promedio de $343 \pm 24 \mu\text{m}^2$, mientras que las muestras nativas presentaron un área promediada de $74 \pm 37 \mu\text{m}^2$ en sus ostiolos y $413 \pm 35 \mu\text{m}^2$ en sus estomas.

4.1.2.8. Caracterización mecánica por ensayo de tracción y análisis dimensional de andamios descelularizado

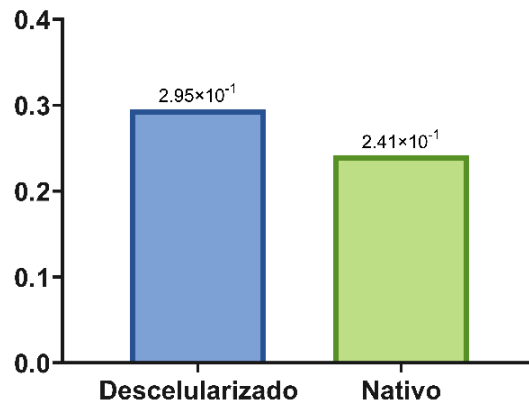
Gráfica 10. Valores máximos obtenidos en muestras de hojas tropicales a partir de ensayos de tracción.



Gráfica 11. Representación del comportamiento de las muestras durante un ensayo de tracción.



Gráfica 12. Representación de los resultados dimensionales de las muestras nativas y descelularizadas



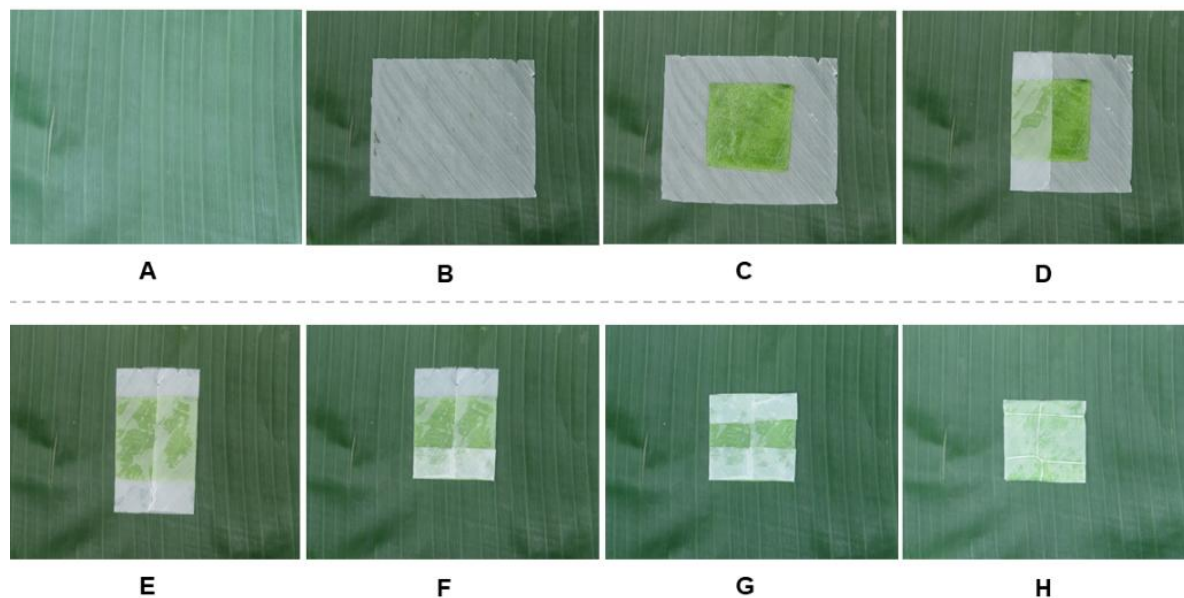
El ensayo de tracción evidenció diferencias significativas en el comportamiento mecánico entre las muestras de hoja nativa y de hoja descelularizada, donde las curvas carga-deformación mostraron perfiles distintos en cada condición, reflejando cambios en la respuesta estructural del material tras el proceso de descelularización. Para la muestra nativa, la curva carga–deformación presentó un incremento progresivo con múltiples puntos de inflexión, alcanzando una fuerza máxima de 2.75 N y una deformación máxima de 9.717% (**Gráfica 10**); posterior a este punto, se observó una disminución gradual de la carga hasta llegar a valores cercanos a cero, acompañada de fluctuaciones que sugieren una mayor capacidad de deformación antes de alcanzar el punto de falla total (**Gráfica 11**).

Por otro lado, la muestra descelularizada mostró un comportamiento caracterizado por un incremento abrupto de la carga, alcanzando una fuerza máxima de 5.825 N y una deformación máxima de 6.987% (**Gráfica 10**), evidenciándose una caída pronunciada de la carga hacia valores cercanos a cero tras este punto, lo que indica una falla estructural más súbita, sugestiva de una mayor rigidez del material, pero de menor capacidad de deformación (**Gráfica 11**). De manera que, la muestra de hoja descelularizada presentó valores superiores para la fuerza máxima en comparación con la nativa, mientras que esta última mostró una mayor capacidad de resistencia ante deformación.

La caracterización del espesor de las hojas mediante micrometría evidenció una reducción del espesor de las muestras sometidas al proceso de descelularización en comparación con las muestras nativas. La muestra de hoja nativa presentó un espesor aproximado de 0.290 ± 0.005 mm, mientras que la muestra de hoja descelularizada registró valores cercanos a 0.241 mm, lo que sugiere una modificación en la estructura del tejido vegetal que no compromete su integridad ni su capacidad de manipulación (**Gráfica 12**). Resaltando que esta reducción de espesor es consistente con los cambios en las propiedades mecánicas, evaluados por los ensayos mecánicos, previamente descritos.

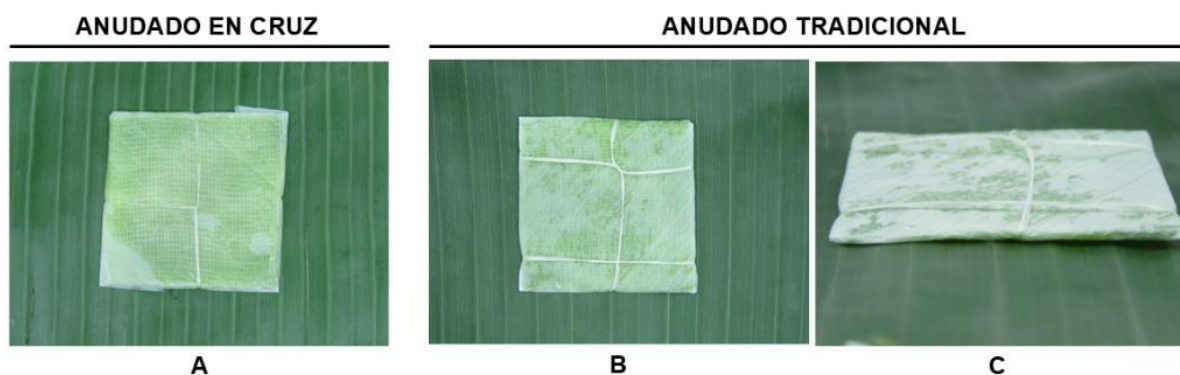
4.1.2.9. Elaboración de plataforma oxigénica basada en hidrogel contenido en una hoja descelularizada (Tamal oxigénico).

Figura 32. Proceso de elaboración de plataforma tipo “tamal oxigénico”.



Nota: (A) preparación de espacio, (B) preparación de base descelularizada, (C) ubicación de hidrogel de alginato con microalgas en hoja descelularizada, (D) doblez de hoja descelularizada de izquierda hacia el centro, (E) doblez de hoja descelularizada de derecha hacia el centro, (F) doblez de sobresaliente de hoja descelularizada inferior hacia el centro, (G) doblez de sobresaliente de hoja descelularizada superior hacia el centro, (H) amarrado final con fibra descelularizada en patrón tradicional.

Figura 33. Variación en anudados aplicados para el cierre de plataforma tipo “tamal oxigénico”.

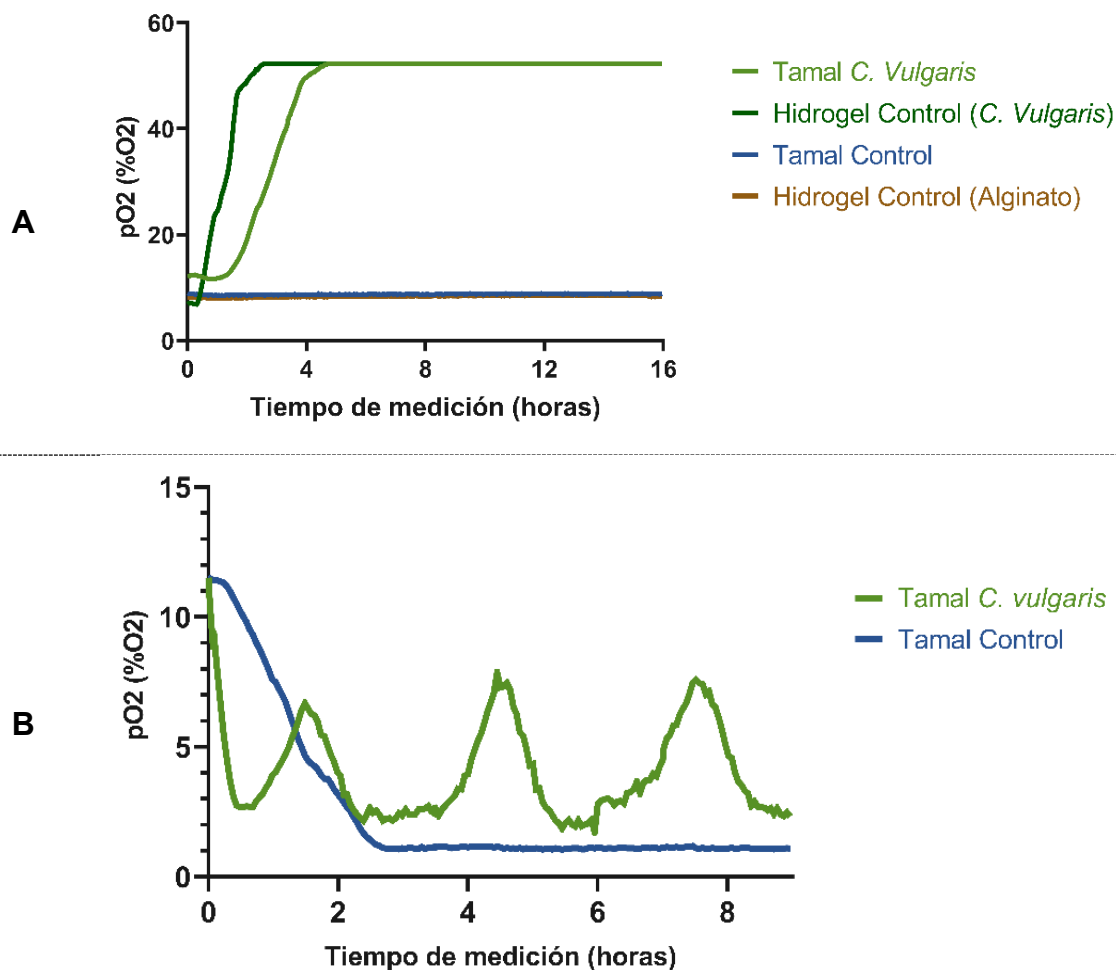


Nota: (A) anudado simple en cruz, (B) anudado tradicional con doble cruz vista superior y (C) vista lateral.

La integración del hidrogel fotosintético con la hoja de bijao descelularizada permitió obtener una estructura compacta y manipulable, en la que el hidrogel quedó completamente contenido en el recubrimiento vegetal. La conformación final presentó una geometría definida y reproducible, resultado de la secuencia de dobleces aplicada (**Figura 31 – B-G**), sin evidencia de exposición directa del hidrogel al exterior. La estructura ensamblada mostró adecuada integridad mecánica durante su manipulación, manteniendo la cohesión entre el hidrogel polimerizado y la hoja descelularizada aun 30 días después de su ensamblaje, requiriendo cambios de la solución de suspensión semanalmente y exposición a la luz constante. El sistema de sujeción mediante tiras de hebra descelularizada permitió fijar los dobleces de manera efectiva (**Figura 31 – H**), mediante un amarre en cruz (**Figura 32 – A**) y un amarre doble tradicional de los tamales (**Figura 32 – B y Figura 32 – C**), evitando la desintegración de la estructura aún bajo condiciones de manipulación o inmersión en medio total, por varios días.

4.1.2.10. Análisis de liberación de oxígeno en hidrogel contenido dentro de hoja descelularizada (Tamal oxigénico).

Gráfica 13. Descripción del comportamiento de plataformas de "Tamal oxigénico"



Nota: gráficas definidas en términos de su capacidad de liberar oxígeno en el tiempo: bajo luz constante (A) y en ciclos de luz/oscuridad (B) con muestras de $n = 3$.

El comportamiento de los hidrogeles de alginato con microalgas contenidos dentro de una estructura de hoja descelularizada es estudiado con mediciones del oxígeno diluido en el medio de las muestras con microalgas y sus controles a 16 horas de luz constante y, posteriormente, en ciclos de luz/oscuridad de 1.5 horas cada uno, para un tiempo total de medición de 9 horas con 3 ciclos totales. Las muestras utilizadas presentaron un cambio colorimétrico al final de la medición, tornándose blanquecinas o marrones al cuarto día de exposición en un ambiente cerrado.

Para el primer ensayo, se distingue un porcentaje de oxígeno en el tiempo, para las muestras de microalgas en estructura de hoja descelularizada mantenidas en luz constante, variante conforme a lo descrito en el gráfico (**Gráfica 13 – A**) siendo: 11.74% para la primera hora de medición, 19.08% a la segunda hora, 35.14% para la tercera hora de medición y 49.68% para la cuarta hora de medición, llegando a la saturación del sistema en el 52.3% de oxígeno en 4.75 horas (4 horas y 45 minutos). De forma similar, los valores del hidrogel con microalgas varían en el tiempo, de manera que fueron capturados valores de 24.42% para la primera hora, 49% para la segunda hora, llegando al punto de saturación de oxígeno (52.3%) en el tiempo de 2.75 horas (2 horas y 45 minutos), 2 horas más rápido que en la estructura con hoja descelularizada. Por su parte, los valores de los hidrogeles de control presentan un porcentaje de oxígeno diluido en el tiempo con varianza reducida a un valor de $8.78 \pm 0.03\%$, por toda la duración del ensayo. Por otro lado, el comportamiento en ciclos de luz/oscuridad de 1 hora y 30 minutos por cada uno es descrito en el siguiente gráfico (**Gráfica 13 – B**), con el porcentaje parcial de oxígeno diluido en las muestras con hidrogeles de microalgas en estructura de hoja descelularizada variando conforme a la presencia de luz, posterior al punto de estabilización inicial en el tiempo de 0,5 horas (30 minutos). A partir de este punto, los valores detectados oscilaron entre un máximo de 6.68% para la etapa de encendido y un mínimo de 2.15% para la etapa de apagado del primer ciclo. Similarmente, el porcentaje de oxígeno aumenta a un máximo de 7.84% y disminuye a un mínimo de 1.73% en el siguiente ciclo de encendido y apagado, finalizando con un aumento a un máximo de 7.58% y un mínimo de 2.3% para el tercer ciclo de encendido y apagado. En promedio, los hidrogeles con la estructura de tipo tamal de oxígeno responden a la alteración de la luz hasta alcanzar un valor de aproximadamente 7.36% en 1 hora y 30 minutos en exposición constante, y un valor mínimo de 2.06% en 1 hora y 30 minutos de oscuridad total. De forma similar al ensayo anterior, los controles de hidrogel de alginato sin microalgas presentaron una varianza mínima a partir de su punto de estabilización identificado en el tiempo de 2,75 horas (2 horas y 45 minutos), manteniéndose en $1,08 \pm 0,08\%$ de oxígeno diluido detectado independientemente de los cambios en ciclos de luz y oscuridad.

4.2. Discusión

Etapas 1. Análisis de la viabilidad de integración de cloroplastos aislados en andamios, a partir de su capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo.

La extracción de cloroplastos presenta diferencias notables en la estabilidad según la especie vegetal empleada como materia prima. Las hojas de *Spinacia oleracea* utilizadas permitieron la obtención de fracciones de coloración verde intensa, compatibles con la presencia de cloroplastos, las variaciones en la conservación de dicha coloración sugieren comportamientos diferenciales en la estabilidad posterior a la extracción. Se observa una disminución en la intensidad de verde incluso en almacenamiento a -18°C lo que puede estar asociado a una rápida pérdida estructural de los cloroplastos y sugiere una disminución en la funcionalidad fotosintética del sistema, tornándose un color verde oscuro aún tras breves exposiciones a luz blanca en algunas de las muestras y blanquecinas en otras, lo cual puede estar relacionado con diferencias en la composición lipídica de sus membranas, contenido de pigmentos o la presencia de compuestos antioxidantes propios de la especie. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Chen et al. para los resultados de la extracción a partir de *Spinacia oleracea* (Chen et al., 2022). Contrario a lo esperado, a partir de las variaciones en la tonalidad de verde observadas en las muestras, los resultados de las mediciones de capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo evidencian una mayor actividad fotosintética en las muestras de *Spinacia oleracea*. En las mediciones con estos cloroplastos se observa un incremento progresivo en el porcentaje de oxígeno disuelto durante los primeros minutos de medición, seguido de una estabilización en valores cercanos al máximo alcanzado, lo que sugiere la conservación parcial de la actividad fotosintética en cloroplastos aislados durante un periodo corto, capaces de mantener una producción de oxígeno sostenida bajo luz constante. En conjunto, estos resultados comprueban la obtención de unidades fotosintéticas cloroplásticas temporalmente funcionales, más su capacidad de liberación de oxígeno no es directamente proporcional a su colorimetría. Cabe resaltar que la capacidad oxigenante de los cloroplastos aislados no suele estudiarse, limitándose a evaluar su actividad fotosintética en el tiempo (Chen et al., 2022).

La visualización al microscopio, tanto de campo claro como de fluorescencia, permitió confirmar la presencia de cloroplastos en las muestras extraídas, estabilizadas en suspensión. Gracias a la auto fluorescencia de los cloroplastos en el canal rojo, la microscopía por fluorescencia cobra mayor relevancia para la identificación y caracterización de estas estructuras fotosintéticas. Sin embargo, las estructuras identificadas en ambas observaciones permiten visualizar sistemas similares a los esperados para cloroplastos enteros en suspensión libre, con partículas esparcidas homogéneamente por el campo de visualización; con una solución estabilizante de glicerol y seroalbúmina bovina con grandes agrupaciones de partículas sin borde definido concentradas por regiones del campo de visualización y algunas partículas libres esparcidas alrededor de las estructuras principales; con una solución de estabilización de glutaraldehído, donde son formadas cápsulas con bordes definidos y opacidad baja alrededor de un grupo pequeño de cloroplastos aislados. La presencia de partículas no fotosintéticas, apreciables mediante la visualización en otros canales junto con el canal rojo, puede estar relacionada con el desarrollo de la extracción con soluciones de extracción no estériles, así como con la elaboración de las diluciones base de alginato con un medio disolvente no estéril.

En conjunto, los resultados obtenidos con ambas técnicas de microscopía evidencian la presencia e integración de los cloroplastos en los sistemas evaluados, manteniendo estructuras identificables tanto en suspensiones regulares como estabilizadas. Además de coincidir con lo expuesto por múltiples autores recientes en el campo de la extracción de unidades fotosintéticas, como el ensayo de Chen et al., donde se observan cloroplastos aislados en suspensión (P. Chen et al., 2022).

La efectividad de los sistemas basados en cloroplastos estabilizados se evalúa en función de su capacidad para liberar oxígeno a lo largo del tiempo, bajo una fuente de luz constante a temperatura ambiente. Los resultados obtenidos en estos ensayos para las muestras estabilizadas en suspensión evidencian que la implementación de estrategias de estabilización influye tanto en la magnitud como en la dinámica temporal de la producción de oxígeno por cloroplastos aislados,

resaltando que la aplicación de la suspensión de estabilización basada en glutaraldehído mostró un comportamiento caracterizado por la obtención de los valores máximos de oxígeno y la mayor estabilidad de la liberación a lo largo del tiempo. Asimismo, esta muestra presenta un incremento inicial más lento en los niveles de oxígeno disuelto en comparación con las muestras sin estabilización y con glicerol y seroalbúmina bovina. Este retraso en la cinética de liberación y en la estabilización a una concentración de oxígeno inferior al punto de saturación del equipo podría estar asociado a una mayor preservación estructural y funcional de los cloroplastos, como respuesta a los cambios en los gases disueltos del medio inmediato. Estos resultados no son directamente comparables con otros ensayos publicados en los últimos años, ya que las condiciones aplicadas no fueron identificadas dentro de la literatura abarcada en este ensayo, considerando que los protocolos implementados evalúan su efectividad con base en otros parámetros como su actividad fotosintética detectada, la cantidad de clorofilas en el tiempo o con estabilizadores adicionales, como es el caso de Chen et al. (Chen et al., 2022).

Finalmente, el incremento sostenido de la concentración de oxígeno en la suspensión de *Chlorella vulgaris* bajo iluminación continua sugiere la presencia de actividad fotosintética funcional, capaz de generar oxígeno de manera progresiva en el medio. A diferencia del grupo control, en el cual los niveles de oxígeno permanecieron constantes, el aumento registrado en la suspensión biológica sugiere que la producción de oxígeno superó a la generada por los organelos aislados. Además de mantener la estabilidad en los niveles de oxígeno detectados por un lapso mayor, en comparación con el obtenido para las mediciones con cloroplastos extraídos de hojas de *Spinacia oleracea*.

Etapa 2. Desarrollar un hidrogel de alginato fotosintético en una plataforma estructural tipo tamal descelularizado, como estrategia innovadora mediante técnicas de bioingeniería.

En el presente estudio, se desarrolla un hidrogel con microalgas de la especie *Chlorella vulgaris* en una matriz de alginato de sodio polimerizado con cloruro de calcio, con capacidad de liberar oxígeno en su medio inmediato y sin efectos negativos en sus propiedades mecánicas. El uso de esta especie de microalgas se llevó a cabo a una concentración inferior a 10 millones de células y presentó un alto grado de supervivencia al ser mantenido en una solución de medio de cultivo, así como una capacidad constante de liberar oxígeno ante una fuente de luz durante al menos 18 horas consecutivas. Cabe resaltar que, al finalizar este ensayo, el porcentaje de oxígeno diluido detectado de 39.56% se mantenía en un aparente aumento exponencial, lo que sugiere que su capacidad de liberación de oxígeno en el tiempo es mayor que la duración del ensayo. Este comportamiento es consistente con lo descrito por Tarsitano et al., quienes mencionan que concentraciones similares de microalgas de esta especie en hidrogeles de alginato de sodio no afectan la porosidad de la matriz y permiten la liberación de oxígeno generado como parte de los procesos de fotosíntesis de los microorganismos (Tarsitano et al., 2025).

Estos hidrogeles con microalgas fueron mantenidos en el medio de cultivo de las microalgas, donde no presentaron fallos estructurales ni cambios en su morfología aún a 30 días de inmersión, con una capacidad de hinchamiento sostenida en el tiempo, como es de esperarse al comparar con otros estudios donde los polímeros de alginato de sodio se demuestran como una alternativa viable de alta porosidad y permeabilidad (Ren et al., 2024; Tarsitano et al., 2025; H. Wang et al., 2025), a pesar de no contar con otras propiedades anexas como sucede con los hidrogeles elaborados por Cui et al. y Zhang et al. (Cui et al., 2025; H. Zhang et al., 2026).

Otro resultado interesante se observa como consecuencia de esta rápida permeabilidad a las suspensiones inmediatas, ya que se evidenció que esta característica hace vulnerables a los microorganismos frente a soluciones no ideales, como el medio diluido con agua destilada remanente, lo que se traduce en

la reducción de la cantidad de células fotosintéticas vivas dentro del hidrogel. Se estima que la razón detrás de este comportamiento está relacionada con posibles contaminantes presentes en líquidos no estériles, más que con el factor de dilución aplicado ante la exposición, sin descartar esta variante totalmente, ya que el comportamiento de las microalgas cambió completamente al remplazar la solución y contenedor de almacenamiento de los hidrogeles. Este acontecimiento es similar a lo planteado en el estudio de Zhang et al., donde se indica que aun cambios pequeños en la concentración de nutrientes y otros componentes del ambiente inmediato a los hidrogeles con *Chlorella vulgaris* pueden promover o limitar su crecimiento y supervivencia aun en iluminación constante (H. Zhang et al., 2026).

Para la descelularización de hojas vegetales se obtuvieron resultados consistentes con la literatura disponible, específicamente para la especie *Musa × paradisiaca*, según Banavar et al., dado que la implementación de hojas de *Calathea lutea* como materia prima para la obtención de andamios descelularizados no fue identificada en la literatura abarcada en este estudio (Banavar et al., 2024). El proceso de descelularización aplicado evidenció una pérdida de la integridad estructural en las hojas de *Calathea lutea*, particularmente durante las últimas 24 horas de exposición al removedor de pigmento, en contraste con las hojas de *Musa x paradisiaca*, que conservaron su arquitectura general. Una posible explicación de este comportamiento radica en las diferencias intrínsecas en la rigidez y el grosor natural de las hojas, lo que podría influir en su susceptibilidad a la descelularización.

En este sentido, la necesidad de prolongar el proceso de despigmentación para lograr la decoloración completa en *Musa x paradisiaca* contrasta con la aparente sobreexposición de *Calathea lutea*, donde esta prolongación podría haber favorecido no solo la eliminación de componentes celulares, sino también la degradación parcial de la matriz estructural de celulosa. Siendo este último factor respaldado por el estudio de Gershlak et al. sobre la descelularización de hojas de estructura naturalmente delgada (Gershlak et al., 2025; Gershlak et al., 2017).

En cuanto a la caracterización física de los andamios descelularizados, es posible identificar una variación en la superficie estructural de las muestras de hoja tras el

proceso de descelularización mediante análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM). En particular, se observan estomas menos definidos y en menor cantidad, sobre una estructura tisular irregular. Este patrón es consistente con la distribución irregular y la estructura desordenada identificadas y reportadas por Banavar et al. en muestras de hojas tropicales sometidas a descelularización, lo que sugiere que estas modificaciones corresponden a efectos característicos de la exposición de la matriz estructural subyacente, como resultado de la remoción de los componentes celulares (Banavar et al., 2024).

Por otro lado, los resultados del estudio de tracción evidencian un incremento de la resistencia mecánica de las muestras descelularizadas, junto con una disminución de su capacidad de deformación, en comparación con los valores equivalentes de las muestras nativas. Este comportamiento es consistente con lo reportado por Harris et al., en el que la descelularización de tejidos vegetales condujo a la exposición de una matriz estructural predominantemente fibrilar, caracterizada por su mayor rigidez mecánica y menor capacidad de deformación (Harris et al., 2021). No obstante, los ensayos de Gershlak et al. presentan resultados contrastantes, en los que el proceso de descelularización se asocia con una disminución tanto de la resistencia mecánica como de la capacidad de deformación del material, lo cual se atribuye a posibles daños estructurales inducidos durante la eliminación celular (Gershlak et al., 2025; Gershlak et al., 2017). Considerando lo expuesto, las diferencias observadas entre el estudio y la literatura disponible pueden estar relacionadas con variaciones en el protocolo de descelularización y en la especie de hoja vegetal empleada.

En cuanto a los cambios dimensionales observados, la reducción del espesor de las muestras descelularizadas puede estar asociada a la remoción de componentes celulares durante el procesamiento. Si bien la literatura no reporta de manera consistente mediciones directas del espesor en hojas descelularizadas, el estudio de Gershlak et al. y otros similares han documentado la eliminación del contenido intracelular y la preservación de la matriz estructural vegetal, lo que sugiere una reorganización del tejido hacia una estructura más compacta (Gershlak et al., 2017;

Harris et al., 2022; Lacombe et al., 2020). Tomando esto en consideración, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían interpretarse como una manifestación de dicha reorganización estructural, en la que la pérdida de volumen celular contribuye a la disminución del grosor del material, sin comprometer la integridad de la estructura.

Finalmente, en el presente ensayo se desarrolla la integración del hidrogel con microalgas en una estructura elaborada a partir de una hoja descelularizada y anudada siguiendo un patrón tradicional de doble cruz, dando lugar al sistema denominado “tamal oxigénico”. Este sistema se mantuvo en almacenamiento bajo luz constante y sumergido en medio de cultivo Bold 1X durante hasta 30 días, en el que, a nivel macroscópico, no se observaron desplazamientos significativos del hidrogel dentro del recubrimiento ni efectos negativos relacionados con la falta de luz o con la permeabilidad de los nutrientes del medio a las microalgas integradas en el hidrogel tras el anudado final, lo que evidencia la viabilidad del método de ensamblaje. Como método de caracterización funcional, la capacidad de liberación de oxígeno de estos sistemas se obtiene una descripción de su comportamiento bajo luz constante por 16 horas, comparable con la oxigenación de hidrogeles sin recubrimiento, seguida de ciclos cortos de luz/oscuridad de 1 hora y 30 minutos cada uno, ambos ensayos descritos en los siguientes párrafos.

En la primera condición experimental mencionada, los resultados obtenidos evidencian que la incorporación de la estructura de hoja descelularizada influye de manera significativa en la dinámica de liberación de oxígeno del sistema. Si bien los hidrogeles con microalgas sin estructura alcanzaron valores máximos de oxígeno en menos tiempo, las muestras integradas en la estructura tipo “tamal oxigénico” mostraron una mayor capacidad de acumulación de oxígeno disuelto, alcanzando valores de saturación superiores. Este comportamiento sugiere un posible efecto de confinamiento o retención del oxígeno dentro del sistema estructural, con su liberación al medio inmediato en menor proporción con el tiempo, descartando la posibilidad de un problema de iluminación directa al utilizar estructuras percibidas como mayoritariamente traslúcidas para el recubrimiento de los hidrogeles.

La comparación directa del comportamiento del sistema propuesto bajo condiciones de luz constante se ve limitada por la escasa disponibilidad de estudios que reporten estructuras equivalentes. No obstante, el comportamiento de liberación de oxígeno observado en los hidrogeles sin recubrimiento es consistente con lo descrito por Tarsitano et al. y Cui et al., quienes reportan que sistemas basados en *Chlorella vulgaris* pueden alcanzar estados de saturación de oxígeno disuelto en el medio tras exposición prolongada a luz constante, dependiendo del sistema de medición empleado (Cui et al., 2025; Tarsitano et al., 2025). Sin embargo, a diferencia de lo reportado por estos autores, en el presente estudio se identificó un punto de estabilización en valores inferiores al máximo de saturación del equipo. Posibles explicaciones para este comportamiento radican en la formación de microburbujas observadas en proximidad al sensor de medición al finalizar el ensayo, lo cual sugiere una limitación en la capacidad del medio para mantener el oxígeno en fase disuelta, así como en la posibilidad de una baja disponibilidad de dióxido de carbono en el medio líquido utilizado como interfaz de medición o en la reducción de la actividad fotosintética de las microalgas ante el cambio en el entorno inmediato causado por rápida acumulación de oxígeno detectado. En este sentido, la liberación de oxígeno a la fase gaseosa, la baja disponibilidad de recursos disueltos para la fotosíntesis o la reducción de la eficiencia podrían haber contribuido a una subestimación de los valores reales de oxígeno producido por el sistema.

Para la segunda condición experimental, las estructuras de “tamal oxigénico” presentan un incremento en la concentración de oxígeno disuelto durante los periodos de iluminación y una disminución en condiciones de oscuridad, lo que indica que los valores máximos de oxígeno detectados fueron significativamente inferiores a los observados bajo luz continua. Este último punto puede explicarse a partir de la cinética de liberación de oxígeno previamente descrita para los sistemas recubiertos, en la que la presencia de la estructura descelularizada modula la difusión del oxígeno hacia el medio. En general, el patrón cíclico identificado es consistente con la dependencia de la fotosíntesis de la energía lumínica y respalda la viabilidad del sistema como plataforma bioactiva, lo que sugiere la predominancia de los procesos de respiración celular durante los ciclos de oscuridad.

Conclusiones

El presente proyecto de investigación abordó la generación de plataformas fotosintéticas basadas en la incorporación de sistemas vegetales, diseñadas como estrategias para promover la liberación localizada de oxígeno en ensayos de medición *in vitro*, bajo condiciones controladas. A partir de la metodología aplicada, es posible definir las conclusiones enumeradas en los siguientes párrafos.

1. Los sistemas de cloroplastos presentaron un periodo de estabilidad de 200 minutos, seguido de una disminución marcada de la pO_2 . Este comportamiento coincide con lo reportado en la literatura respecto a la limitada estabilidad temporal de los cloroplastos aislados y su pérdida progresiva de funcionalidad.
2. Las condiciones de estabilización implementadas permitieron conservar parcialmente la funcionalidad fotosintética de cloroplastos en suspensión, evidenciada por una pO_2 de 33.5%, durante el periodo de estabilidad identificado. Este resultado no es directamente comparable con los estudios de referencia debido a las diferencias en las condiciones experimentales y los indicadores empleados para evaluar la funcionalidad de los cloroplastos.
3. La integración del hidrogel con *Chlorella vulgaris* en la matriz vegetal descelularizada permitió mantener el sistema fotosintético contenido dentro de la estructura y alcanzar una pO_2 máxima detectable del 52.3%. Sin embargo, la incorporación de la matriz incrementó aproximadamente 2 horas el tiempo requerido para alcanzar este valor respecto al hidrogel sin recubrimiento.
4. Los hallazgos de este estudio demuestran que los andamios fotosintéticos desarrollados son capaces de generar y mantener una pO_2 del 52.3% durante 16 horas bajo las condiciones *in vitro* evaluadas, evidenciando su capacidad de generación localizada de oxígeno. No obstante, se requieren estudios posteriores con células animales para evaluar su efecto sobre sistemas celulares y determinar su aplicabilidad en estrategias de ingeniería tisular.

Recomendaciones y proyección a futuro

Modificación en la composición de hidrogeles de *Chlorella vulgaris*. Se recomienda el desarrollo de hidrogeles funcionales con una estructura central de mayor durabilidad mecánica, capaces de integrar microalgas junto con otros agentes con propiedades beneficiosas para la cicatrización de heridas, tales como carragenanos u otros compuestos con capacidad bioactiva. Esta modificación responde a las limitaciones observadas en la estabilidad estructural de la plataforma base del “tamal oxigénico”, particularmente durante su manipulación y evaluación prolongada. En este sentido, la literatura disponible señala que la incorporación de estos componentes no solo favorece una producción sostenida de oxígeno por parte de los sistemas fotosintéticos, sino que también mejora las propiedades fisicoquímicas del hidrogel. En conjunto, estas características contribuyen a generar un microambiente más adecuado para la regeneración tisular (Cui et al., 2025; Wu et al., 2024; H. Zhang et al., 2026).

Optimización del protocolo y de la solución de aislamiento para cloroplastos de *Spinacia oleracea*. Se sugiere la implementación de soluciones de aislamiento con composiciones optimizadas que incorporen agentes como el cloruro de manganeso, el buffer de MOPS y otros compuestos reportados como estabilizadores del sistema fotosintético (Aoki et al., 2024). Esta recomendación surge a partir de la limitada estabilidad observada en los cloroplastos aislados. La inclusión de estos componentes, así como el constante trabajo a bajas temperaturas, podría favorecer la preservación de la integridad de las membranas tilacoidales y la actividad de los complejos fotosintéticos, reduciendo el deterioro funcional posterior a la extracción mecánica. En consecuencia, esta optimización permitiría incrementar la viabilidad del organelo y mejorar su desempeño en términos de producción de oxígeno (Messant et al., 2023).

Optimización del protocolo y solución de estabilización para cloroplastos.

Como estrategia para prolongar el tiempo de vida funcional de los cloroplastos en suspensión, se recomienda el uso de glutaraldehído al 0,33% (v/v), dado que este valor ha sido reportado como óptimo para reducir la pérdida de funcionalidad oxigénica (Apostolova et al., 2011). El mecanismo de acción de este agente se basa en la estabilización de estructuras proteicas mediante enlaces cruzados, lo que contribuye a preservar la integridad del sistema fotosintético. No obstante, debido a la presencia de grupos aldehídicos residuales potencialmente citotóxicos, se propone la incorporación de glicina como agente de neutralización, con el fin de bloquear dichos grupos reactivos (Park, 1970). Esta estrategia permitiría no solo mejorar la estabilidad estructural de los cloroplastos, sino también aumentar la biocompatibilidad del sistema, aspecto clave para su futura aplicación.

Estandarización del sistema de medición de oxígeno utilizado. Se recomienda la estandarización rigurosa de las condiciones de medición al utilizar el sistema PreSens SDR, con el fin de minimizar fuentes de variabilidad experimental. En particular, se sugiere implementar mecanismos de fijación que aseguren la alineación consistente de la placa lectora y la correcta posición de los viales durante todo el ensayo. Asimismo, realizar las mediciones en un entorno con iluminación controlada o en sistemas cerrados que eviten la interferencia de la luz ambiental sobre la señal óptica del sensor y mantener condiciones de temperatura constantes mediante el uso de sistemas de incubación con regulación precisa, con el fin de evitar variaciones que puedan afectar tanto la respuesta del sensor como la actividad metabólica de los sistemas fotosintéticos evaluados. Adicionalmente, se sugiere la incorporación de un segundo sistema de medición de oxígeno para la evaluación de las mismas muestras, con el objetivo de realizar una validación cruzada de los datos obtenidos y aumentar la confiabilidad de las mediciones.

Caracterización avanzada de plataformas oxigénicas. Como parte de los estudios futuros, se plantea ampliar la caracterización de los hidrogeles mediante la evaluación de su comportamiento en condiciones que simulen de manera más realista el entorno de una herida, empleando soluciones de exudado para analizar su capacidad de absorción, retención y estabilidad estructural. Adicionalmente, se propone realizar un análisis cuantitativo de las propiedades ópticas mediante mediciones de transparencia con luxómetros, así como un seguimiento colorimétrico prolongado que permita evaluar posibles cambios asociados a procesos de degradación, oxidación o envejecimiento del material. La integración de estos estudios aportaría una comprensión más completa del desempeño funcional de los hidrogeles y fortalecería su potencial aplicación como plataformas biomédicas para la regeneración tisular y el tratamiento avanzado de heridas.

Evaluación de plataformas oxigénicas en cultivos celulares *in vitro*. Como proyección a futuro, se plantea la evaluación de los hidrogeles desarrollados en sistemas de cultivo celular *in vitro* bajo condiciones de hipoxia controlada, con el objetivo de validar su capacidad de oxigenación en entornos que simulen condiciones fisiopatológicas reales. Asimismo, se propone la implementación de ensayos de migración celular mediante sistemas Transwell, con el fin de evaluar la influencia de los hidrogeles y de los factores liberados desde estos sobre el reclutamiento y la respuesta celular, aportando información relevante sobre su potencial para favorecer procesos asociados a la cicatrización y regeneración de tejidos. Posteriormente, se sugiere la transición hacia modelos *in vivo*, donde se pueda evaluar de manera integral la eficacia, seguridad y respuesta biológica del sistema en organismos complejos. Este enfoque escalonado resulta fundamental para establecer el potencial traslacional de estas plataformas dentro del campo de la biomedicina orientada a la regeneración tisular.

Referencias

- Adamiec, M., Pietrowska-Borek, M., & Luciński, R. (2024). Editorial: The influence of environmental conditions on chloroplast functioning and development. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 15): Frontiers Media SA.
- Adams Quintana, C. (2025). Desarrollo de un apósito de submucosa intestinal descelularizada y microalgas como tratamiento para lesiones cutáneas crónicas. Universidad Latina de Panamá. <https://repositorio.ulatina.edu.pa/handle/001/364>
- Adamski, M., Fontana, G., Gershlak, J. R., Gaudette, G. R., Le, H. D., & Murphy, W. L. (2018). Two Methods for Decellularization of Plant Tissues for Tissue Engineering Applications. *J. Vis. Exp*(135), 57586–57586. <https://doi.org/10.3791/57586>
- Aher, A. A., Thitame, S. N., Viddyasagar, M., & Wabale, A. S. (2025). Bioactive Algae in Wound Healing: Natural Solutions for Modern Medicine. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 17(Suppl 1), S20–S23. https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_1639_24
- Ahmadian, M., Hosseini, S., Alipour, A., Jahanfar, M., Farrokhi, N., Homaeigohar, S., & Shahsavarani, H. (2023). *In vitro* modeling of hepatocellular carcinoma niche on decellularized tomato thorny leaves: a novel natural three-dimensional (3D) scaffold for liver cancer therapeutics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1189726>
- Andrade-Martínez, D., García-Barradas, O., Mendoza-López, M. R., & Jiménez-Fernández, M. (2026). Characterization, physicochemical properties and sensory influence of plant leaves used as natural wrappers for tamales. *Food Chemistry Advances*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2026.101225>
- Anirudh, V., Kamath, D. Y., Ghosh, S., Bhuvana, K. B., Sharma, S., Maruthy, K., Pais, P., & Xavier, D. (2021). Topical Controlled Warm Oxygen Therapy Delivered Through a Novel Device (KADAM™) to Treat Diabetic Foot Ulcers: A Randomized Controlled, Open, Pilot Trial. *Indian Journal of Surgery*, 83(S4), 907–914. <https://doi.org/10.1007/s12262-021-03057-w>

- Aoki, R., Inui, Y., Okabe, Y., Sato, M., Takeda-Kamiya, N., Toyooka, K., Sawada, K., Morita, H., Genot, B., Maruyama, S., Tomo, T., Sonoike, K., & Matsunaga, S. (2024). Incorporation of photosynthetically active algal chloroplasts in cultured mammalian cells towards photosynthesis in animals. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 100(9), 524–536. <https://doi.org/10.2183/pjab.100.035>
- Apostolova, E. L., Dobrikova, A. G., Rashkov, G. D., Dankov, K. G., Vladkova, R. S., & Misra, A. N. (2011). Prolonged sensitivity of immobilized thylakoid membranes in cross-linked matrix to atrazine. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 156(1), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.04.002>
- Bai, Q., Gao, Q., Hu, F., Zheng, C., Sun, N., Chen, W., Liu, J., Zhang, Y., Wu, X., & Lu, T. (2022). Reoxygenation Modulates the Adverse Effects of Hypoxia on Wound Repair. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24). <https://doi.org/10.3390/ijms232415832>
- Banavar, A., Sarkarat, R., Amirvaresi, A., Li, X., Nguyen, C., Kaplan, D. L., Nitin, N., & Ovissipour, R. (2024). *Decellularized banana leaves: eco-friendly scaffolds for cell-based seafood*.
- Barrón González, M. P., Eguiarte Lara, D. J., & Nájera Peña, M. C. (2023). Biopelícula de alginato de sodio funcionalizada con extracto etanólico de *Prosopis laevigata* y su uso como agente cicatrizante de heridas. In *Espacenet*.
- Berner, J. E., Vidal, P., Will, P., & Castillo, P. (2014). Uso de oxígeno hiperbárico para el manejo de heridas: bases físicas, biológicas y evidencia disponible. *Revista médica de Chile*, 142(12), 1575–1583. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014001200011>
- Bhutta, B. S., Alghoula, F., & Berim, I. (2025). *Hypoxia*.
- Britto, E. J., Nezwek, T. A., Popowicz, P., & Robins, M. (2025). *Wound Dressings*.
- Brouers, M., Sironval, C., Jeanfils, J., Collard, F., Jeanson, A., & Bellefroid, E. (1984). *Immobilization of chloroplasts, chloroplast membrane fractions and plant cells, and stabilization of the photosynthetic activities for the photoproduction of hydrogen*.
- Bugarín, R., & Martínez, J. B. (2000). La oxigenoterapia en situaciones graves. *Medicina Integral*, 36(5).

- Camci-Unal, G., Alemdar, N., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2013). Oxygen-releasing biomaterials for tissue engineering. *Polymer International*, 62(6), 843–848. <https://doi.org/10.1002/pi.4502>
- Cao, J., Wu, B., Yuan, P., Liu, Y., & Hu, C. (2025). Research Progress of Sodium Alginate-Based Hydrogels in Biomedical Engineering. *Gels*, 11(9), 758–758. <https://doi.org/10.3390/gels11090758>
- Carpentier, R. (2008). Immobilization of Photosynthetic Membranes in an Albumin-Glutaraldehyde Crosslinked Matrix. In *Immobilization of Enzymes and Cells* (pp. 109–116). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-386-4:109>
- Cartaxana, P., & Cruz, S. (2020). On the art of stealing chloroplasts. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.64057>
- Catrina, S. B., & Zheng, X. (2021). Hypoxia and hypoxia-inducible factors in diabetes and its complications. In *Diabetologia* (Vol. 64).
- Chadwick, P. (2014). Pilot study: haemoglobin spray in the treatment of chronic diabetic foot ulcers. *Wounds UK*, 10(4).
- Chang, D. K., Louis, M. R., Gimenez, A., & Reece, E. M. (2019). The Basics of Integra Dermal Regeneration Template and its Expanding Clinical Applications. *Seminars in Plastic Surgery*, 33(03), 185–189. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1693401>
- Chaput, B., Herlin, C., Grolleau, J. L., Bekara, F., Laloze, J., Boissière, F., Gandolfi, S., & Bertheuil, N. (2023). Tratamiento quirúrgico de las escaras. *EMC - Técnicas Quirúrgicas - Ortopedia y Traumatología*, 15(2), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S2211-033X\(23\)47716-X](https://doi.org/10.1016/S2211-033X(23)47716-X)
- Chávez, M. N., Moellhoff, N., Schenck, T. L., Egaña, J. T., & Nickelsen, J. (2020). Photosymbiosis for Biomedical Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.577204>
- Chávez, M. N., Schenck, T. L., Hopfner, U., Centeno-Cerdas, C., Somlai-Schweiger, I., Schwarz, C., Machens, H.-G., Heikenwalder, M., Bono, M. R., Allende, M. L., Nickelsen, J., & Egaña, J. T. (2016). Towards autotrophic tissue engineering: Photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials*, 75, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.014>

- Chen, G., Wang, F., Zhang, X., Shang, Y., & Zhao, Y. (2023). Living microecological hydrogels for wound healing. *Science Advances*, 9(21). <https://doi.org/10.1126/sciadv.adg3478>
- Chen, L., Yang, Z., & Liu, H. (2023). Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Where Are We Now in 2023? In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 59): MDPI.
- Chen, P., Liu, X., Gu, C., Zhong, P., Song, N., Li, M., Dai, Z., Fang, X., Liu, Z., Zhang, J., Tang, R., Fan, S., & Lin, X. (2022). A plant-derived natural photosynthetic system for improving cell anabolism. *Nature*, 612(7940), 546–554. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05499-y>
- Chennamsetty, A., Khourdaji, I., Burks, F., & Killinger, K. A. (2015). Contemporary diagnosis and management of Fournier's gangrene. In *Therapeutic Advances in Urology* (Vol. 7, pp. 203–215).
- Chirumbolo, S., Tirelli, U., Franzini, M., Pandolfi, S., Ricevuti, G., Vaiano, F., & Valdenassi, L. (2023). Ozone in the adjunct medical treatment. The round personality of a molecule with hormetic properties. *Human & Experimental Toxicology*, 42. <https://doi.org/10.1177/09603271231218926>
- Clavo, B., Pérez, J. L., López, L., Suárez, G., Lloret, M., Rodríguez, V., Macías, D., Santana, M., Hernández, M. A., Martín-Oliva, R., & Robaina, F. (2004). Ozone Therapy for Tumor Oxygenation: a Pilot Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1(1), 93–98. <https://doi.org/10.1093/ecam/neh009>
- Cocquempot, M.-F., & Thomas, D. (1984). *Immobilized chloroplast membranes: kinetic aspects of their continuous use in batch and chemostat*.
- Cocquempot, M. F., Aguirre, R., Lissolo, T., Monsan, P., Hatchikian, E. C., & Thomas, D. (1982). Co-immobilization effect on H₂ production by a chloroplast membranes-hydrogenase system. *Biotechnology Letters*, 4(5), 313–318. <https://doi.org/10.1007/BF00132832>
- Cocquempot, M. F., Thomasset, B., Barbotin, J. N., Gelfi, G., & Thomas, D. (1981). Comparative stabilization of biological photosystems by several immobilization procedures. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 193–198. <https://doi.org/10.1007/BF00505866>

- Contreras, L., Suárez, D., & Amin, M. (2024). Ozonoterapia como alternativa médica en tres condiciones dermatológicas humanas. Revisión sistemática. *Acta Bioclínica*, 14(28), 284–310. <https://doi.org/10.53766/AcBio/2024.14.28.17>
- Corrales-Orovio, R., Carvajal, F., Holmes, C., Miranda, M., González-Itier, S., Cárdenas, C., Vera, C., Schenck, T. L., & Egaña, J. T. (2023). Development of a photosynthetic hydrogel as potential wound dressing for the local delivery of oxygen and bioactive molecules. *Acta Biomaterialia*, 155, 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.11.036>
- Cui, B., Ren, C., Zhang, R., Ren, Y., Liu, J., Gou, Y., Zhao, T., Jiang, X., Cui, H., Wang, X., & Wang, L. (2025). Chlorella-encapsulated living hydrogel based on gelatin and carrageenan with oxygen production, hemostatic and antibacterial capacity for promoting wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 308, 142356–142356. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.142356>
- Cui, H., Su, Y., Wei, W., Xu, F., Gao, J., & Zhang, W. (2022). How Microalgae is Effective in Oxygen Deficiency Aggravated Diseases? A Comprehensive Review of Literature. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 17, 3101–3122. <https://doi.org/10.2147/IJN.S368763>
- de Jonge, E., Peelen, L., Keijzers, P. J., Joore, H., de Lange, D., van der Voort, P. H. J., Bosman, R. J., de Waal, R. A. L., Wesselink, R., & de Keizer, N. F. (2008). Association between administered oxygen, arterial partial oxygen pressure and mortality in mechanically ventilated intensive care unit patients. *Critical Care*, 12(6), R156–R156. <https://doi.org/10.1186/cc7150>
- Díaz, D. (2024). Apósitos de alta gama son utilizados en Clínica de Heridas. In *Caja de Seguro Social*. Panamá.
- Dikici, S. (2024). Enhancing wound regeneration potential of fibroblasts using ascorbic acid-loaded decellularized baby spinach leaves. *Polymer Bulletin*, 81(11), 9995–10016. <https://doi.org/10.1007/s00289-024-05185-1>
- Dikici, S., Claeysens, F., & MacNeil, S. (2019). Decellularised baby spinach leaves and their potential use in tissue engineering applications: Studying and

- promoting neovascularisation. *Journal of Biomaterials Applications*, 34(4), 546–559. <https://doi.org/10.1177/0885328219863115>
- Dirección Nacional de Planificación en Salud, D. (2024). *ANÁLISIS DE SITUACIÓN Y TENDENCIAS DE SALUD*. https://www.minsa.gob.pa/sites/default/files/publicacion-general/analisis_de_situacion_y_tendencias_desalud.asis_mortalidad_ago_sto_2024.pdf
- Droppa, M., Horvath, G., Mustardy, L. A., Demeter, S., & Faludi-Daniel, A. (1981). Structural and functional stability of isolated intact chloroplasts. *Photosynthesis Research*, 2(1), 31–38. <https://doi.org/10.1007/BF00036163>
- Eastwood, G., Bellomo, R., Bailey, M., Taori, G., Pilcher, D., Young, P., & Beasley, R. (2012). Arterial oxygen tension and mortality in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Medicine*, 38(1), 91–98. <https://doi.org/10.1007/s00134-011-2419-6>
- Emilia, P., & Jordá-Vargas, L. (2021). Bioquímica de la oxigenación hiperbárica. *Bioquímica y Patología Clínica*, 85(2).
- Escobar Chávez, J. J. (2022). Parche con microagujas, inyecta antibiótico en lesiones de la piel. In *DGCS - UNAM*.
- Espinosa-Barrera, L., & Chávez-Sahagún, E. (2019). El otro genoma de las plantas: los cloroplastos y su ADN. *Desde el Herbario CICY*, 11, 201–206.
- Farkas, D. L., & Malkin, S. (1979). *Cold Storage of Isolated Class C Chloroplasts OPTIMAL CONDITIONS FOR STABILIZATION OF PHOTOSYNTHETIC ACTIVITIES* (00320889/79/64/0). (Plant Physiol, Issue.
- Filiz, Y., Arslan, Y., Duran, E., Saglam-Metiner, P., Horozoglu, S., Paradiso, A., Martinez, D. C., Sabour-Takanlou, M., Heljak, M., Jaroszewicz, J., Biray-Avci, C., Swieszkowski, W., & Yesil-Celiktas, O. (2024). Decellularized plant-derived vasculature-on-a-chip interacting with breast cancer spheroids to evaluate a dual-drug therapy. *Applied Materials Today*, 36, 102015–102015. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2023.102015>
- Fontana, G., Gershlak, J., Adamski, M., Lee, J. S., Matsumoto, S., Le, H. D., Binder, B., Wirth, J., Gaudette, G., & Murphy, W. L. (2017). Biofunctionalized Plants

- as Diverse Biomaterials for Human Cell Culture. *Advanced Healthcare Materials*, 6(8). <https://doi.org/10.1002/adhm.201601225>
- Fornes Pujalte, B., Palomar Llantas, F., Muñoz Mañez, V., & Lucha Fernandez, V. (2008). Apósitos en el tratamiento de úlceras y heridas. *Enfermería Dermatológica*(4).
- Fromme, P., Yu, H. Q., DeRuyter, Y. S., Jolley, C., Chauhan, D. K., Melkozernov, A., & Grotjohann, I. (2006). Structure of photosystems I and II. *Comptes Rendus Chimie*, 9(2), 188–200. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2005.06.039>
- Frykberg, R. G. (2021). Topical wound oxygen therapy in the treatment of chronic diabetic foot ulcers. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 57): MDPI.
- Garoufalidis, M. (2025). Using Topical Intermittent Wound Oxygen TWO2® in Wound Healing. *Clinical Innovations in Wound Management*.
- Gershlak, J. R., Burgess, C. K., Fontana, G., Perreault, L. R., Thyden, R., Shrem, L. A., dos Santos, A. C. F., Weathers, P. J., Dominko, T., Murphy, W. L., & Gaudette, G. R. (2025). Biocompatibility of decellularized spinach leaves. *npj Biomedical Innovations*, 2(1), 23–23. <https://doi.org/10.1038/s44385-025-00028-8>
- Gershlak, J. R., Hernandez, S., Fontana, G., Perreault, L. R., Hansen, K. J., Larson, S. A., Binder, B. Y. K., Dolivo, D. M., Yang, T., Dominko, T., Rolle, M. W., Weathers, P. J., Medina-Bolivar, F., Cramer, C. L., Murphy, W. L., & Gaudette, G. R. (2017). Crossing kingdoms: Using decellularized plants as perfusable tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 125, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.011>
- Gill, A. L., & Bell, C. N. A. (2004). Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJM*, 97(7), 385–395. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hch074>
- Gorbenko, N., Rinaldi, G., Sanchez, A., & Merna, N. (2023). Small-Caliber Vascular Grafts Engineered from Decellularized Leaves and Cross-Linked Gelatin. *Tissue Engineering Part A*, 29(13-14), 397–409. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2022.0223>
- Gorham, P. R., & Clendenning, K. A. (1950). STORAGE OF ISOLATED CHLOROPLASTS WITHOUT LOSS OF PHOTOCHEMICAL ACTIVITY.

Canadian Journal of Research, 28c(5), 513–524.
<https://doi.org/10.1139/cjr50c-030>

- Grzegorzewski, W., Czerniecka-Kubicka, A., Gołda, K., Niedźwiedzka, A., Wollocko, H., Majewski, M. S., & Wojtkiewicz, J. (2025). Hemoglobin-Based Oxygen Carriers: Selected Advances and Challenges in the Design of Safe Oxygen Therapeutics (A Focused Review). *International Journal of Molecular Sciences*, 26(19), 9775–9775. <https://doi.org/10.3390/ijms26199775>
- Gutierrez, G. (1988). The Relationship of Tissue Oxygenation to Cellular Bioenergetics. In (pp. 183–205). https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5481-9_16
- Gyamfi, D., & Danquah, K. O. (2016). Nutrients and Liver Metabolism. In *Molecular Aspects of Alcohol and Nutrition* (pp. 3–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800773-0.00001-X>
- Han, X., Ju, L. S., & Irudayaraj, J. (2023). Oxygenated Wound Dressings for Hypoxia Mitigation and Enhanced Wound Healing. In *Molecular Pharmaceutics* (Vol. 20, pp. 3338–3355): American Chemical Society.
- Hardt, H., & Kok, B. (1976). *Stabilization by glutaraldehyde of high-rate electron transport in isolated chloroplast* (Biochimica et Biophysica Acta, Issue.
- Harris, A. F., Lacombe, J., Sanchez-Ballester, N. M., Victor, S., Curran, K. A. J., Nordquist, A. R., Thomas, B., Gu, J., Veuthey, J.-L., Soulairol, I., & Zenhausern, F. (2022). Decellularized Spinach Biomaterials Support Physiologically Relevant Mechanical Cyclic Strain and Prompt a Stretch-Induced Cellular Response. *ACS Applied Bio Materials*, 5(12), 5682–5692. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00721>
- Harris, A. F., Lacombe, J., & Zenhausern, F. (2021). The Emerging Role of Decellularized Plant-Based Scaffolds as a New Biomaterial. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22). <https://doi.org/10.3390/ijms222212347>
- Hasan, M. M., Swapon, A. R., Dipti, T. I., Choi, Y.-J., & Yi, H.-G. (2024). Plant-Based Decellularization: A Novel Approach for Perfusion-Compatible Tissue

- Engineering Structures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(5), 1003–1016. <https://doi.org/10.4014/jmb.2401.01024>
- He, X., Guo, W., Tang, Y., Xiong, J., Li, Y., Huang, R., & Miao, W. (2023). Chloroplast–boosted photodynamic therapy for effective drug-resistant bacteria killing and biofilm ablation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 238, 112622–112622. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2022.112622>
- Herrera Ballesteros, V. H. (2024). Valoración económica de los años de vida perdidos por muerte prematura por enfermedades crónicas no transmisibles en Panamá. Año 2022. *Cuadernos Nacionales*(35), 50–77. <https://doi.org/10.48204/j.cnacionales.n35.a5325>
- Hill, R. (1937). Oxygen Evolved by Isolated Chloroplasts. *Nature*, 139(3525), 881–882. <https://doi.org/10.1038/139881a0>
- Hill, R. (1939). Oxygen produced by isolated chloroplasts. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 127(847), 192–210. <https://doi.org/10.1098/rspb.1939.0017>
- Hilty, M. P., & Jung, C. (2023). Tissue oxygenation: how to measure, how much to target. *Intensive Care Medicine Experimental*, 11(1), 64–64. <https://doi.org/10.1186/s40635-023-00551-1>
- Ho, T.-C., Chang, C.-C., Chan, H.-P., Chung, T.-W., Shu, C.-W., Chuang, K.-P., Duh, T.-H., Yang, M.-H., & Tyan, Y.-C. (2022). Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(9). <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>
- Hochberg, C. H., Semler, M. W., & Brower, R. G. (2021). Oxygen Toxicity in Critically Ill Adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 204(6), 632–641. <https://doi.org/10.1164/rccm.202102-0417CI>
- Hopfner, U., Schenck, T.-L., Chávez, M.-N., Machens, H.-G., Bohne, A.-V., Nickelsen, J., Giunta, R.-E., & Egaña, J.-T. (2014). Development of photosynthetic biomaterials for *in vitro* tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 10(6), 2712–2717. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.055>

- Hua, Q., Meng, X., Chen, W., Xu, Y., Xu, R., Shi, Y., Li, J., Meng, X., Li, A., Chai, Q., Sheng, M., Yao, Y., Fan, Y., Qiao, R., Zhang, Y., Wang, T., Zhang, Y., Cui, X., Yu, Y.,...Zhu, T. (2025). Associations of Short-Term Ozone Exposure With Hypoxia and Arterial Stiffness. *Journal of the American College of Cardiology*, 85(6), 606–621. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2024.11.044>
- Hunt, S. D., & Elg, F. (2016). Clinical effectiveness of hemoglobin spray (Granulox®) as adjunctive therapy in the treatment of chronic diabetic foot ulcers. *Diabetic Foot & Ankle*, 7(1), 33101–33101. <https://doi.org/10.3402/dfa.v7.33101>
- Ibarra H, F. A. (2025). Estadísticas Vitales - Volumen III - Defunciones. In *Instituto Nacional de Estadística y Censo de Panamá*.
- Jang, S., Yoo, C., Kim, H. S., Kim, J., & Lee, D. Y. (2024). Oxygenating respiratoid biosystem for therapeutic cell transplantation. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53246-w>
- Jensent, R. G., Bassham, J. A., & Calvin, M. (1966). *PHOTOSYNTHESIS BY ISOLATED CHLOROPLASTS**. <https://www.pnas.org>
- Jiang, S., Zheng, Y., Xia, H., Liu, Z., Rao, S., Wang, Y., Sun, H., Lu, X., & Xie, C. (2024). Oxygen-Releasing Hydrogels for Tissue Regeneration. *Advanced NanoBiomed Research*, 4(6). <https://doi.org/10.1002/anbr.202300133>
- Jiang, Y., Yang, Z., Jiang, T., Shen, D., & Duan, J. (2022). Banana Leaf Surface's Janus Wettability Transition from the Wenzel State to Cassie–Baxter State and the Underlying Mechanism. *Materials*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/ma15030917>
- Johnson, & Johnson. (1980). OXYGEN-GENERATING SURGICAL DRESSING. In *Patent Scope*.
- Jones, J. D., Rebello, A. S., & Gaudette, G. R. (2021). Decellularized spinach: An edible scaffold for laboratory-grown meat. *Food Bioscience*, 41, 100986–100986. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100986>
- Jumaidin, R., Diah, N. A., Ilyas, R. A., Alamjuri, R. H., & Yusof, F. A. M. (2021). Processing and characterisation of banana leaf fibre reinforced thermoplastic

cassava starch composites. *Polymers*, 13(9).

<https://doi.org/10.3390/polym13091420>

Karube, I., Matsunaga, T., Otsuka, T., Kayano, H., & Suzuki, S. (1981). Hydrogen evolution by co-immobilized chloroplasts and *Clostridium butyricum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 637(3), 490–495. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(81\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0005-2728(81)90055-4)

Khalid, N., & Azimpouran, M. (2025). *Necrosis*.

Kierstan, M., & Bucke, C. (1977). The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in calcium alginate gels. *Biotechnology and Bioengineering*, 19(3), 387–397. <https://doi.org/10.1002/bit.260190309>

Kim, J. H., Jung, E. A., & Kim, J. E. (2024). Perfluorocarbon-based artificial oxygen carriers for red blood cell substitutes: considerations and direction of technology. In *Journal of Pharmaceutical Investigation* (Vol. 54, pp. 267–282): Springer.

Kim, S. W. (2025). *Decellularized Canola Leaves as a Bioscaffold for Cardiac Repair*.

Kitajima, M., & Butler, W. L. (1976). Microencapsulation of Chloroplast Particles. *Plant Physiology*, 57(5), 746–750. <https://doi.org/10.1104/pp.57.5.746>

Krzywinska, E., & Stockmann, C. (2018). Hypoxia, Metabolism and Immune Cell Function. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020056>

Ksouri, R., Aksel, H., Saghrouchni, H., & Saygideger, Y. (2024). Biocompatible and Safe Decellularized Spinach With Antibacterial and Wound Healing Activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 112(10). <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35489>

Kulandaivelu, G., & Hall, D. O. (1976). Stabilization of the Photosynthetic Activities of Isolated Spinach Chloroplasts during Prolonged Ageing. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 31(7-8), 452–455. <https://doi.org/10.1515/znc-1976-7-820>

Kumar, J., Mutra, R., Jujjavarapu, S. E., Patel, P., Giridhar, N., & Rama, S. (2023). Parameter Optimization of Plant-based Decellularized Scaffold for Biomedical Applications Using Response Surface Methodology. *ResearchSquare*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2550040/V1>

- Lacombe, J., Harris, A. F., Zenhausern, R., Karsunsky, S., & Zenhausern, F. (2020). Plant-Based Scaffolds Modify Cellular Response to Drug and Radiation Exposure Compared to Standard Cell Culture Models. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00932>
- Ladin, D. (1998). Oxygen generating wound dressing. In *Patent Scope*.
- Lairret, K. F., Baer, D., Leas, M. L., Renz, E. M., & Cancio, L. C. (2014). Evaluation of an Oxygen-Diffusion Dressing for Accelerated Healing of Donor-Site Wounds. *Journal of Burn Care & Research*, 35(3), 214–218. <https://doi.org/10.1097/BCR.0b013e31829b3338>
- Leiva-Mora, M., Alvarado-Capó, Y., Acosta-Suárez, M., Cruz-Martín, M., Sánchez-García, C., Roque, B., & Para Correspondencia, A. (2010). *Protocolo para el aislamiento de cloroplastos intactos de hojas de plantas de Musa spp. obtenidas por cultivo in vitro y evaluación de la actividad fotosintética* (Protocolo Biotecnología Vegetal, Issue.
- Leslie, S. W., & Foreman, J. (2025). *Fournier Gangrene*.
- Li, C., & Jackson, R. M. (2002). Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. In *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (Vol. 282).
- Lima-Junior, E. M., de Moraes Filho, M. O., Costa, B. A., Fachine, F. V., de Moraes, M. E. A., Silva-Junior, F. R., Soares, M. F. A. d. N., Rocha, M. B. S., & Leontsinis, C. M. P. (2019). Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. *Journal of Surgical Case Reports*, 2019(6). <https://doi.org/10.1093/jscr/rjz181>
- Liu, Y., Zhong, D., He, Y., Jiang, J., Xie, W., Tang, Z., Qiu, J., Luo, J., & Wang, X. (2022). Photoresponsive Hydrogel-Coated Upconversion Cyanobacteria Nanocapsules for Myocardial Infarction Prevention and Treatment. *Advanced Science*, 9(30). <https://doi.org/10.1002/advs.202202920>
- Loh, C., Tan, Q. Y., Eng, D. L. K., Walsh, S. R., Chong, T. T., & Tang, T. Y. (2021). Granulox—The Use of Topical Hemoglobin to Aid Wound Healing: A Literature Review and Case Series From Singapore. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 20(2), 88–97. <https://doi.org/10.1177/1534734620910318>

- Long, J. A., Locke, C. B., & Waite, A. (2024). Wound dressings and systems with remote oxygen generation for topical wound therapy and related methods. In *Patent Scope*.
- López-Herce, J., & Carrillo, Á. (2008). Ventilación mecánica: indicaciones, modalidades y programación y controles. *Anales de Pediatría Continuada*, 6(6), 321–329. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(08\)75597-5](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(08)75597-5)
- Lucero Ortega, K. E., & Ortega, L. (2022). *Hyperbaric Oxygen Therapy and Wound Healing*.
https://cupola.gettysburg.edu/student_scholarship://cupola.gettysburg.edu/student_scholarship/1029
- Lv, Y., Zhu, D., Li, J., Li, Y., Lu, C., Bi, J., Huang, K., Hu, S., Liu, S., Yan, N., Cheng, K., & Wang, J. (2025). Plant-derived hydrogel and photosynthetic nano-units for myocardial infarction therapy. *Nature Communications*, 16(1), 7678–7678. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41467-025-62020-5>
- Maharjan, S., Bonilla-Ruelas, D. P., Orive, G., & Zhang, Y. S. (2022). Photosymbiotic tissue engineering and regeneration. *Progress in Biomedical Engineering*, 4(4), 043001–043001. <https://doi.org/10.1088/2516-1091/ac8a2f>
- Maiya, G. A., Nataraj, M., K, G., Hande, M., Rodrigues, G. S., Shenoy, R., & Prasad, S. S. (2022). KADAM topical warm oxygen therapy device for diabetic foot ulcer-a novel approach. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 22(1), 507–514. <https://doi.org/10.1007/s40200-022-01172-3>
- Martin, H., & Beck, E. (1977). *Oxygen Concentration in Isolated Chloroplasts during Photosynthesis* (Plant Physiol, Issue. <https://academic.oup.com/plphys/article/60/6/903/6075604>
- Mayo, C. (2023). Síntomas: Hipoxemia. In <https://www.mayoclinic.org/es/symptoms/hypoxemia/basics/causes/sym-20050930>.
- Messant, M., Hani, U., Hennebelle, T., Guérard, F., Gakière, B., Gall, A., Thomine, S., & Krieger-Liszkay, A. (2023). Manganese concentration affects chloroplast structure and the photosynthetic apparatus in *Marchantia polymorpha*. *Plant Physiology*, 192(1), 356–369. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad052>

- Meunier, C. F., Van Cutsem, P., Kwon, Y. U., & Su, B. L. (2009). Thylakoids entrapped within porous silica gel: Towards living matter able to convert energy. *Journal of Materials Chemistry*, 19(11), 1535–1542. <https://doi.org/10.1039/b817172f>
- Miller, T. E., Beneyton, T., Schwander, T., Diehl, C., Girault, M., McLean, R., Chotel, T., Claus, P., Cortina, N. S., Baret, J.-C., & Erb, T. J. (2020). *Light-powered CO₂ fixation in a chloroplast mimic with natural and synthetic parts*. <https://www.science.org>
- Ministerio de Salud, M. (2022). Enfermedades no transmisibles dominan estadísticas. In.
- Ministerio de Salud, M. (2023a). Clínica de heridas en Chilibre, un alivio para los pacientes. In. Panamá.
- Ministerio de Salud, M. (2023b). Diabetes: Un enemigo silencioso que aumenta dentro de la población. In.
- Ministerio de Salud, M. (2023c). Enfermedades no transmisibles son analizadas en Panamá. In.
- Ministerio de Salud, M. (2023d). Inauguran Clínica de Heridas y Hospital de Día en el Hospital San Miguel Arcángel. In. Panamá.
- Ministerio de Salud, M. (2024). Jornada nacional de capacitación técnica centrada en el registro, seguimiento y monitoreo de pacientes dentro de la estrategia HEARTS. In.
- Ministerio de Salud, M. (2026). Minsa alerta: 42 % de los panameños padece hipertensión y aumentan los casos de diabetes. In. Panamá.
- Minjeong, J., Hongjun, K. I. M., Insoo, J., & Dong Jin, L. I. M. (2023). SUSTAINED OXYGEN-GENERATING WOUND DRESSING. In *Patent Scope*.
- Morales Cudello, S. (2003). El oxígeno en la bioenergética celular. *ACTA MEDICA*, 11.
- Moreno, N., & Arosemena, A. (2025). Clínica de Heridas. In.
- Morris, P., Nash, G. V., & Hall, D. O. (1982). The stability of electron transport in *in vitro* chloroplast membranes. *Photosynthesis Research*, 3(3), 227–240. <https://doi.org/10.1007/BF00032259>

- Nagarsheth, K., Kankaria, A., Marsella, J., Dunlap, E., Hawkins, S., Ucuzian, A., & Lal, B. K. (2024). Systematic review of the effects of topical oxygen therapy on wound healing. *JVS-Vascular Insights*, 2, 100051–100051. <https://doi.org/10.1016/j.jvsvi.2023.100051>
- Neuman, C. (2023). Pomada cicatrizante del Instituto Butantan. In. Brasil.
- O'Leary, B. (2019). *Measuring Leaf O₂ Consumption Rates with the SDR® SensorDish Reader Adapted SDR Set-Up with Tubes and O₂ Sensor Spots in Screw Caps*. www.PreSens.de
- Obaíd, M. L., Camacho, J. P., Brenet, M., Corrales-Orovio, R., Carvajal, F., Martorell, X., Werner, C., Simón, V., Varas, J., Calderón, W., Guzmán, C. D., Bono, M. R., San Martín, S., Eblen-Zajjur, A., & Egaña, J. T. (2021). A First in Human Trial Implanting Microalgae Shows Safety of Photosynthetic Therapy for the Effective Treatment of Full Thickness Skin Wounds. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.772324>
- Ochiai, H., Shibata, H., Matsuo, T., Hashinokuchi, K., & Yukawa, M. (1977). Immobilization of chloroplast photosystems. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(4), 721–722. <https://doi.org/10.1080/00021369.1977.10862573>
- Ochiai, H., Tanaka, A., & Fukui, S. (1983). Immobilized Organelles. *Applied biochemistry and Bioengineering*, 4, 153–187. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-041104-7.50010-5>
- Olejniczak, S. A., Łojewska, E., Kowalczyk, T., & Sakowicz, T. (2016). Chloroplasts: state of research and practical applications of plastome sequencing. *Planta*, 244(3), 517–527. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2551-1>
- Organización Mundial de la Salud, O. (2021). Economía de las ENT. In.
- Organización Mundial de la Salud, O. (2024). Un nuevo informe de la OMS revela que los gobiernos están restando prioridad al gasto en salud. In.
- Organización Panamericana de la Salud, O. (2021). Enfermedades no transmisibles. In <https://rb.gy/854ssz>.

- Organización Panamericana de la Salud, O. (2023). UMBRALES DE COSTO-EFECTIVIDAD: Optimizando la asignación de recursos en salud en las Américas. In.
- Oropallo, A., & Andersen, C. A. (2023). Topical Oxygen. In *StatsPearls*.
- Pan American Health Association, P. (2024). Perfil de País - Panamá. In <https://rb.gy/1brgr5>.
- Park, R. B. (1970). *Chloroplast (and Grana): Photosynthetic Electron Transport in Aldehyde-fixed Material*.
- Pathan, A. K., Bond, J., & Gaskin, R. E. (2010). Sample preparation for SEM of plant surfaces. In *Materials Today* (Vol. 12, pp. 32–43): Elsevier.
- Pei, J., Kanwal, S., Sivaramakrishnan, R., & Katelakha, K. (2025). Therapeutic potential of microalgae-derived natural compounds in diabetic wound healing: A comprehensive review. *Heliyon*, 11(4), e42723–e42723. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42723>
- Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Dadashpour, M., Mohajeri, A., Fattahi, A., Sheervalilou, R., & Zarghami, N. (2018). An Overview on Application of Natural Substances Incorporated with Electrospun Nanofibrous Scaffolds to Development of Innovative Wound Dressings. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(5), 414–427. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170308112147>
- Pírez, C., Peluffo, G., Giachetto, G., Menchaca, A., Pérez, W., Machado, K., Cristoforone, N., Alamilla, M., Acosta, V., Bruneto, M., Assandri, M., Toscano, B., Telechea, H., Rompani, E., Morosini, F., Taboada, R., Notejane, M., Pacaluk, M., Pujadas, M.,...Varela, A. (2020). Oxigenoterapia. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 91. <https://doi.org/10.31134/AP.91.S1.1>
- Punnett, T. (1959). Stability of Isolated Chloroplast Preparations and its Effect on Hill Reaction Measurements. *Plant Physiology*, 34(3), 283–289. <https://doi.org/10.1104/pp.34.3.283>
- Quesada Núñez, B. (2011). *"La respiración celular: Representaciones y conceptos"*.
- Rahane, D., Dhingra, T., Chalavady, G., Datta, A., Ghosh, B., Rana, N., Borah, A., Saraf, S., & Bhattacharya, P. (2024). Hypoxia and its effect on the cellular system. In *Cell Biochemistry and Function* (Vol. 42).

- Ratcliffe, P. J., & Semenza, G. L. (2025). Hypoxia. *Britannica*.
- Raundal, K., Kharat, A., Sanap, A., Kheur, S., Potdar, P., Sakhare, S., & Bhonde, R. (2024). Decellularized leaf-based biomaterial supports osteogenic differentiation of dental pulp mesenchymal stem cells. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 60(8), 926–934. <https://doi.org/10.1007/s11626-024-00937-9>
- Regueira, T., & Andresen, M. A. X. (2010). Manipulación del transporte y consumo de oxígeno en la sepsis. *Revista médica de Chile*, 138(2). <https://doi.org/10.4067/S0034-98872010000200014>
- Ren, Y., Wang, Q., Xu, W., Yang, M., Guo, W., He, S., & Liu, W. (2024). Alginate-based hydrogels mediated biomedical applications: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 279, 135019–135019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135019>
- Robbins, E. R., Pins, G. D., Laflamme, M. A., & Gaudette, G. R. (2020). Creation of a contractile biomaterial from a decellularized spinach leaf without ECM protein coating: An *in vitro* study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(10), 2123–2132. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36971>
- Rodas-Gaitán, H. A., Rodríguez-Fuentes, H., Flores-Mendiola, G., Vidales-Contreras, J. A., Aranda-Ruiz, J., Luna-Maldonado, A. I., Villa, F., Ex, H., El, C., Municipio, De Ge-Neral Escobedo, N., León, M., & Para Correspondencia, A. (2012). *EFFECT OF INOCULATION CELLULAR DENSITY ON Chlorella Vulgaris (CLV2) GROWTH CULTIVATED UNDER MIXOTROPHIC CONDITIONS* (Rev. Fitotec. Mex, Issue.
- Sajjan, V., Lunge, S., Swamy, M., & Pandit, A. (2015). Livedo reticularis: A review of the literature. *Indian Dermatology Online Journal*, 6(5), 315–315. <https://doi.org/10.4103/2229-5178.164493>
- Salehi, A., Mobarhan, M. A., Mohammadi, J., Shahsavarani, H., Shokrgozar, M. A., & Alipour, A. (2020). Efficient mineralization and osteogenic gene overexpression of mesenchymal stem cells on decellularized spinach leaf scaffold. *Gene*, 757, 144852–144852. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144852>

- Salehi, A., Mobarhan, M. A., Mohammadi, J., Shahsavarani, H., Shokrgozar, M. A., & Alipour, A. (2021). Cabbage-derived three-dimensional cellulose scaffold-induced osteogenic differentiation of stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 236(7), 5306–5316. <https://doi.org/10.1002/jcp.30239>
- Sánchez-Cruz, L. Y., Martínez-Villarreal, A. A., Lozano-Platonoff, A., Cárdenas-Sánchez, A., & Contreras-Ruiz, J., II. (2016). *Epidemiology of cutaneous ulcers in Latin America* (Med Cutan Iber Lat Am, Issue. www.medigraphic.com/medicinacutaneawww.medigraphic.org.mx
- Sanchez, J. E. (2022). CSS destina más de B/.600 millones al año para el tratamiento de enfermedades crónicas. In.
- Sánchez, J. E. (2022). Clínica de Heridas, 21 años al servicio de la población. In *Caja de Seguro Social (CSS)*. Panamá.
- Sánchez, J. E. (2022). Clínica de Heridas en Juan Díaz, dos décadas de atención. In. *Caja de Seguro Social (CSS)*. Panamá.
- Santiago, R., Velázquez, R., Becerra, H., Jiménez, G., & Villarreal, V. (2019). *Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco*.
- Sarkar, M., Niranjana, N., & Banyal, P. K. (2017). Mechanisms of hypoxemia. *Lung India*, 34(1), 47–47. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.197116>
- Sayadi, L. R., Banyard, D. A., Ziegler, M. E., Obagi, Z., Prussak, J., Klopfer, M. J., Evans, G. R. D., & Widgerow, A. D. (2018). Topical oxygen therapy micro/nanobubbles: a new modality for tissue oxygen delivery. *International Wound Journal*, 15(3), 363–374. <https://doi.org/10.1111/iwj.12873>
- Schenck, T. L., Hopfner, U., Chávez, M. N., Machens, H.-G., Somlai-Schweiger, I., Giunta, R. E., Bohne, A. V., Nickelsen, J., Allende, M. L., & Egaña, J. T. (2015). Photosynthetic biomaterials: A pathway towards autotrophic tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 15, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.12.012>
- Schjørring, O. L., Jensen, A. K. G., Nielsen, C. G., Ciubotariu, A., Perner, A., Wetterslev, J., Lange, T., & Rasmussen, B. S. (2020). Arterial oxygen tensions in mechanically ventilated ICU patients and mortality: a retrospective,

- multicentre, observational cohort study. *British Journal of Anaesthesia*, 124(4), 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.12.039>
- Schmitt, M., & Frank, M. (2013). Notes on the ecology of rolled-leaf hispines (Chrysomelidae, Cassidinae) at La Gamba (Costa Rica). *ZooKeys*(332), 55–69. <https://doi.org/10.3897/zookeys.332.5215>
- Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Joyard, J., & Rolland, N. (2008). Purification of Intact Chloroplasts from Arabidopsis and Spinach Leaves by Isopycnic Centrifugation. In *Current Protocols in Cell Biology*: John Wiley and Sons Inc.
- Sen, C. K. (2009). Wound healing essentials: Let there be oxygen. *Wound Repair and Regeneration*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00436.x>
- Serena, T. (2021). The Effect of Natrox® Oxygen Wound Therapy on the Healing Rate of Chronic Diabetic Foot Ulcers. In *National Library of Medicine*.
- Serrano Moreno, A. A. (2023). *Isquemia arterial crónica: abordaje de una lesión complicada*.
- Shang, L., Wang, S., & Mao, Y. (2024). Recent advances in plant-derived polysaccharide scaffolds in tissue engineering: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 277, 133830–133830. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.133830>
- Somers, V. K., Mark, A. L., Zavala, D. C., & Abboud, F. M. (1989). Influence of ventilation and hypocapnia on sympathetic nerve responses to hypoxia in normal humans. *Journal of Applied Physiology*, 67(5), 2095–2100. <https://doi.org/10.1152/jappl.1989.67.5.2095>
- Su, J., Song, Y., Zhu, Z., Huang, X., Fan, J., Qiao, J., & Mao, F. (2024). Cell–cell communication: new insights and clinical implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 196–196. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01888-z>
- Tang, T. Y., Mak, M. Y. Q., Yap, C. J. Q., Boey, J. E. C., Chan, S. L., Soon, S. X. Y., Ishak, I. A. B., Lee, R. W. L., Soh, X. J., & Goh, W. X. (2024). An Observational Clinical Trial Examining the Effect of Topical Oxygen Therapy (Natrox™) on the Rates of Healing of Chronic Diabetic Foot Ulcers (OTONAL Trial). *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 23(2), 326–337. <https://doi.org/10.1177/15347346211053694>

- Tarpy, S. P., & Celli, B. R. (1995). Long-Term Oxygen Therapy. *New England Journal of Medicine*, 333(11), 710–714. <https://doi.org/10.1056/NEJM199509143331107>
- Tarsitano, M., Liu Chung Ming, C., Bennar, L., Mahmodi, H., Wyllie, K., Idais, D., Al Shamery, W., Paolino, D., Cox, T. R., Kabakova, I., Ralph, P., & Gentile, C. (2025). Chlorella-enriched hydrogels protect against myocardial damage and reactive oxygen species production in an *in vitro* ischemia/reperfusion model using cardiac spheroids. *Biofabrication*, 17(1), 015006–015006. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ad8266>
- Teguh, D. N., Bol Raap, R., Koole, A., Knippenberg, B., Smit, C., Oomen, J., & van Hulst, R. A. (2021). Hyperbaric oxygen therapy for nonhealing wounds: Treatment results of a single center. *Wound Repair and Regeneration*, 29(2), 254–260. <https://doi.org/10.1111/wrr.12884>
- Tello, N. (2024). Clínica de Heridas: conoce los diagnósticos que atienden. In *Caja de Seguro Social (CSS)*. Panamá.
- Tello, N. (2025). Más del 50% de los panameños padece de alguna enfermedad crónica. In.
- Toker, M., Rostami, S., Kesici, M., Gul, O., Kocaturk, O., Odabas, S., & Garipcan, B. (2020). Decellularization and characterization of leek: a potential cellulose-based biomaterial. *Cellulose*, 27(13), 7331–7348. <https://doi.org/10.1007/s10570-020-03278-4>
- UNAL. (2018). Parche de colágeno para cicatrizar heridas participará en rueda de innovación. In *Connect*. Bogotá.
- UNC. (2023). Desarrollan membranas regenerativas para el tratamiento de heridas. In *Unciencia*.
- Usanma Koban, B., & Coşgun Tahsildaroğlu, A. (2023). Livedo reticularis related to physical activity: A case report. *The Journal of Turkish Family Physician*, 14(4), 252–259. <https://doi.org/10.15511/tjtfp.23.00452>
- Vaca-Oviedo, A., Causse, J., & Sommer-Marquez, A. (2020). Immobilization of chloroplasts from grass within a silica matrix synthesized by HIPE method. *MRS Advances*, 5(14-15), 727–733. <https://doi.org/10.1557/adv.2020.46>

- Van Sint Jan D, N., Ferre, A., & Fajardo J, C. (2024). Generalidades de fisiología de la oxigenación extracorpórea (ECMO): entendiendo desde la comparación. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 35(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2023.11.004>
- Vargas-Ovalle, M. I., Demitri, C., & Madaghiele, M. (2025). Plant-Based Scaffolds for Tissue Engineering: A Review. *Polymers*, 17(19), 2705–2705. <https://doi.org/10.3390/polym17192705>
- Wahyudi, R. S., Huboyo, H. S., Sutrisno, E., & Zaman, B. (2022). Characteristics of Banana Leaves as Gaseous Biosorbent. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Walawalkar, S., & Almelkar, S. (2021). Fabricating a pre-vascularized large-sized metabolically-supportive scaffold using Brassica oleracea leaf. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(1), 165–178. <https://doi.org/10.1177/0885328220968388>
- Wang, H., Yang, L., & Yang, Y. (2025). A review of sodium alginate-based hydrogels: Structure, mechanisms, applications, and perspectives. *International Journal of Biological Macromolecules*, 292, 139151–139151. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.139151>
- Wang, L.-H., Ernst, A. U., An, D., Datta, A. K., Epel, B., Kotecha, M., & Ma, M. (2021). A bioinspired scaffold for rapid oxygenation of cell encapsulation systems. *Nature Communications*, 12(1), 5846–5846. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26126-w>
- Wang, S., Ma, Q., Li, C., Zhang, S., & Liu, X. (2025). Chloroplast Responses to Drought: Integrative Mechanisms and Mitigation Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(24), 11872–11872. <https://doi.org/10.3390/ijms262411872>
- Wang, X., Yang, C., Yu, Y., & Zhao, Y. (2022). In Situ 3D Bioprinting Living Photosynthetic Scaffolds for Autotrophic Wound Healing. *Research*, 2022. <https://doi.org/10.34133/2022/9794745>
- Wasserman, A. R., & Fleischer, S. (1968). *THE STABILIZATION OF CHLOROPLAST FUNCTION*.

- Whatley, F. R. (1995). Photosynthesis by isolated chloroplasts: The early work in Berkeley. *Photosynthesis Research*, 46(1-2), 17–26.
<https://doi.org/10.1007/BF00020411>
- Whatley, F. R., & Arnon, D. I. (1963). Photosynthetic Phosphorylation in Plants. *Methods in Enzymology*, 6, 308–313.
- Wu, Y., Li, M., He, R., Xiao, L., Liu, S., Chen, K., Qiang, H., Ji, K., Li, L., Yin, Y., Yuan, X., Li, M., Gao, J., & Li, Y. (2024). Photosynthetic live microorganism-incorporated hydrogels promote diabetic wound healing via self-powering and oxygen production. *Chemical Engineering Journal*, 485, 149545–149545.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.149545>
- Xing, X., Liu, C., & Zheng, L. (2025). Preparation of photo-crosslinked microalgae-carboxymethyl chitosan composite hydrogels for enhanced wound healing. *Carbohydrate Polymers*, 348, 122803–122803.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.122803>
- Yanchu, L., Rong, P., Rong, C., Li, Z., Xiaoyan, Y., & Feng, W. (2023). Ozone therapy for high-grade glioma: an overview. *Frontiers in Oncology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1161206/FULL>
- Yovira, W. (2024). Enfermedades crónicas comunes en Panamá. In *Noticias Caja de Seguro Social (CSS)*.
- Yu-Hong, C., & Shih-Wei, C. (2017). Oxygen-generating wound dressing. In *Patent Scope*.
- Yun, Y.-R., Won, J. E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J.-H., Shin, U. S., & Kim, H.-W. (2010). Fibroblast Growth Factors: Biology, Function, and Application for Tissue Regeneration. *Journal of Tissue Engineering*, 1(1).
<https://doi.org/10.4061/2010/218142>
- Zhang, C., Han, Z.-Y., Chen, K.-W., Wang, Y.-Z., Bao, P., Ji, P., Yan, X., Rao, Z.-Y., Zeng, X., & Zhang, X.-Z. (2024). In Situ Formed Microalgae-Integrated Living Hydrogel for Enhanced Tumor Starvation Therapy and Immunotherapy through Photosynthetic Oxygenation. *Nano Letters*, 24(12), 3801–3810.
<https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.4c00471>
- Zhang, H., Liu, D., Lv, Y., Liu, C., Cao, X., Dai, J., Chai, Y., & Chen, W. (2026). Nutrient Matrix-Supplying Hydrogel for *Chlorella vulgaris* Promotes Diabetic

- Wound Healing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 12(2), 889–905. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5c01857>
- Zhang, L. E. I. H. A. N. Q. 韩., Zhu, L., Lu, Y. I., Han, Y. U., Xi, H., & Han, Q. (2023). Portable oxygen generating device for wound oxygen therapy. In *Patent Scope*.
- Zhang, S., Huang, Y., Gong, N., Zhang, G., Wang, J., Li, J., Fan, X., Zeng, X., Zhang, J., & Yu, Z. (2026). 3D-printable reinforced photosynthetic living hydrogel patches for accelerated wound healing. *Chemical Engineering Journal*, 528, 172656–172656. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2026.172656>
- Zhao, J., Zhou, C., Xiao, Y., Zhang, K., Zhang, Q., Xia, L., Jiang, B., Jiang, C., Ming, W., Zhang, H., Long, H., & Liang, W. (2024). Oxygen generating biomaterials at the forefront of regenerative medicine: advances in bone regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1292171>
- Zhao, M., Liu, H., & Jahr, J. S. (2024). Perfluorocarbon-based oxygen carriers: What is new in 2024? In *Journal of Anesthesia and Translational Medicine* (Vol. 3, pp. 10–13): Elsevier B.V.
- Zilinskas, B. A., & Govindjee. (1976). Stabilization by Glutaraldehyde Fixation of Chloroplast Membranes Against Inhibitors of Oxygen Evolution. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 77(4), 302–314. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(76\)80003-7](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(76)80003-7)
- Zoneff, E., Wang, Y., Jackson, C., Smith, O., Duchi, S., Onofrillo, C., Farrugia, B., Moulton, S. E., Williams, R., Parish, C., Nisbet, D. R., & Caballero-Aguilar, L. M. (2024). Controlled oxygen delivery to power tissue regeneration. *Nature Communications*, 15(1), 4361–4361. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48719-x>
- Zulkarnain, A., Wibowo, H., & Wirawan, W. A. (2025). Enhancement of the chemical, physical, mechanical and thermal properties of NaOH-treated natural cellulosic fibers from *Calathea lutea*. *Cleaner Waste Systems*, 12. <https://doi.org/10.1016/j.clwas.2025.100427>

Anexos

Anexo 1: Detalles de ensayo de hinchamiento

Tabla 12. Valores registrados durante el ensayo de hinchamiento para hidrogeles con microalgas				
Muestras	Tiempo (horas)	Masa pesada (g)	Masa real (g)	Relación de hinchamiento
Hidrogel 1	0	0.246	0.059	1.00
	0.25	0.289	0.102	1.73
	0.5	0.323	0.136	2.31
	1	0.351	0.164	2.78
	2	0.381	0.194	3.29
	3	0.382	0.195	3.31
	4	0.384	0.197	3.34
	5	0.386	0.199	3.37
	6	0.388	0.201	3.41
	7	0.388	0.201	3.41
	8	0.388	0.201	3.41
	24	0.386	0.199	3.37
	25	0.386	0.199	3.37
	26	0.382	0.195	3.31
	27	0.382	0.195	3.31
	28	0.382	0.195	3.31
	29	0.382	0.195	3.31
	30	0.382	0.195	3.31
Hidrogel 2	0	0.351		
	0	0.404	0.053	1.00
	0.25	0.535	0.184	3.47
	0.5	0.543	0.192	3.62
	1	0.566	0.215	4.06
	2	0.595	0.244	4.60
	3	0.602	0.251	4.74
	4	0.606	0.255	4.81
	5	0.606	0.255	4.81
	6	0.602	0.251	4.74
	7	0.602	0.251	4.74
	8	0.602	0.251	4.74
	24	0.585	0.234	4.42
	25	0.584	0.233	4.40
	26	0.584	0.233	4.40
	27	0.584	0.233	4.40
	28	0.586	0.235	4.43
	30	0.586	0.235	4.43
Hidrogel 3	0	0.352		
	0	0.42	0.068	1.00
	0.25	0.537	0.185	2.72
	0.5	0.547	0.195	2.87
	1	0.569	0.217	3.19
	2	0.572	0.22	3.24
	3	0.578	0.226	3.32
	4	0.579	0.227	3.34
	5	0.578	0.226	3.32
	6	0.578	0.226	3.32
	7	0.577	0.225	3.31
	8	0.577	0.225	3.31
	24	0.578	0.226	3.32
	25	0.578	0.226	3.32
	26	0.578	0.226	3.32
	27	0.579	0.227	3.34
	28	0.578	0.226	3.32
	30	0.578	0.226	3.32

Tabla 13. Valores registrados durante el ensayo de hinchamiento para hidrogeles control				
Muestras	Tiempo (horas)	Masa pesada (g)	Masa real (g)	Relación de hinchamiento
Hidrogel 1	0	0.904		
	0	0.952	0.048	1.00
	0.25	1	0.096	2.00
	0.5	1.045	0.141	2.94
	1	1.049	0.145	3.02
	2	1.076	0.172	3.58
	3	1.076	0.172	3.58
	4	1.098	0.194	4.04
	5	1.098	0.194	4.04
	6	1.098	0.194	4.04
	7	1.101	0.197	4.10
	8	1.104	0.2	4.17
	24	1.103	0.199	4.15
	25	1.103	0.199	4.15
	26	1.103	0.199	4.15
	27	1.103	0.199	4.15
	28	1.103	0.199	4.15
	29	1.103	0.199	4.15
	30	1.103	0.199	4.15
Hidrogel 2	0	0.352		
	0	0.42	0.068	1.00
	0.25	0.537	0.185	2.72
	0.5	0.547	0.195	2.87
	1	0.569	0.217	3.19
	2	0.572	0.22	3.24
	3	0.578	0.226	3.32
	4	0.579	0.227	3.34
	5	0.578	0.226	3.32
	6	0.578	0.226	3.32
	7	0.577	0.225	3.31
	8	0.577	0.225	3.31
	24	0.578	0.226	3.32
	25	0.578	0.226	3.32
	26	0.578	0.226	3.32
	27	0.579	0.227	3.34
	28	0.578	0.226	3.32
	29	0.577	0.225	3.31
	30	0.577	0.225	3.31

Figura 34. Registro de dimensiones en muestras previo y posterior al ensayo de hinchamiento

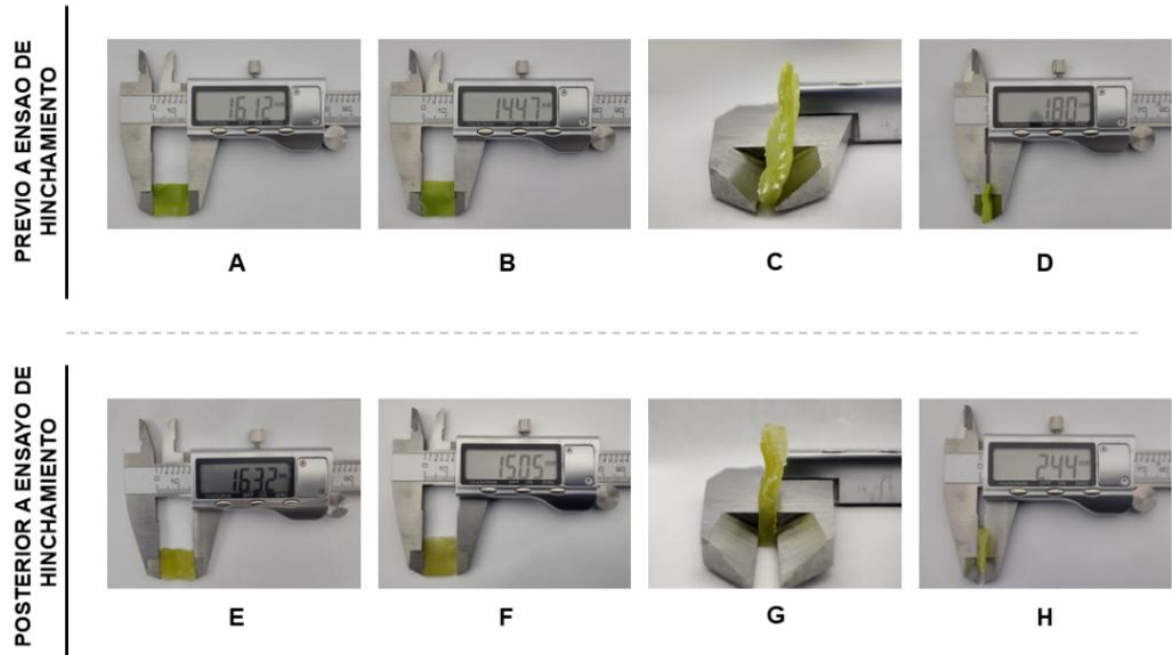
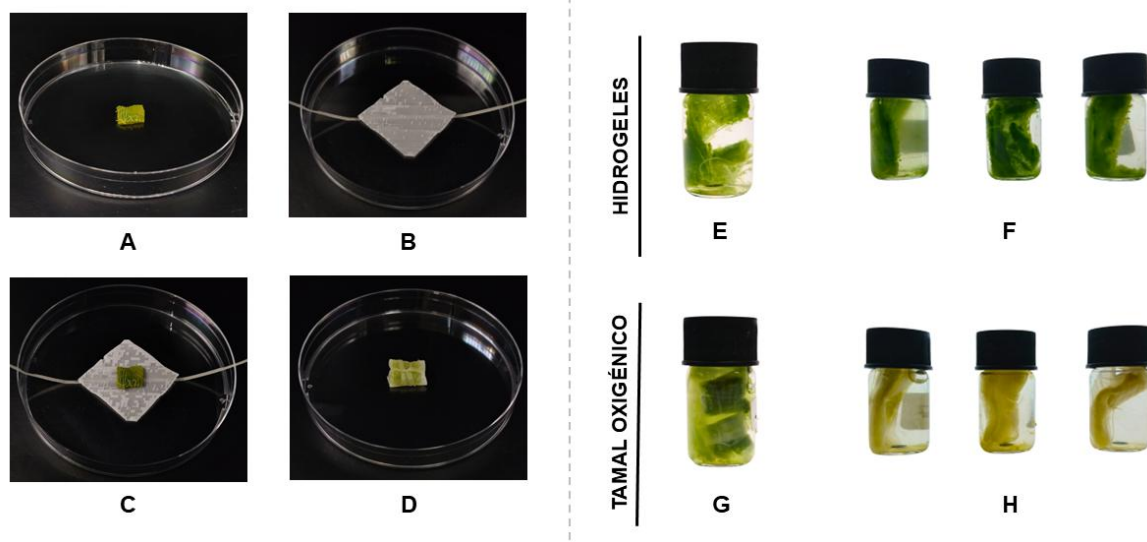


Tabla 14. Cambio registrado en las dimensiones de los hidrogeles durante el ensayo de hinchamiento			
Estado	Largo (mm)	Ancho (mm)	Espesor (mm)
Previo	16.12	14.47	1.8
Posterior	16.32	15.05	2.44
Aumento	0.2	0.58	0.64

En la figura (**Figura 34**) y tabla anterior (**Tabla 14**) se registran los cambios en las dimensiones de los hidrogeles con microalgas, tras el desarrollo de los ensayos de hinchamiento. De forma que los hidrogeles presentaron los siguientes aumentos en su morfología: el largo aumentó 0.2 mm, su ancho aumentó en 0.58 mm y en espesor las muestras aumentaron 0.64 mm, tras el desarrollo del ensayo.

Anexo 2: Elaboración de hidrogeles de alginato en hoja descelularizada para mediciones

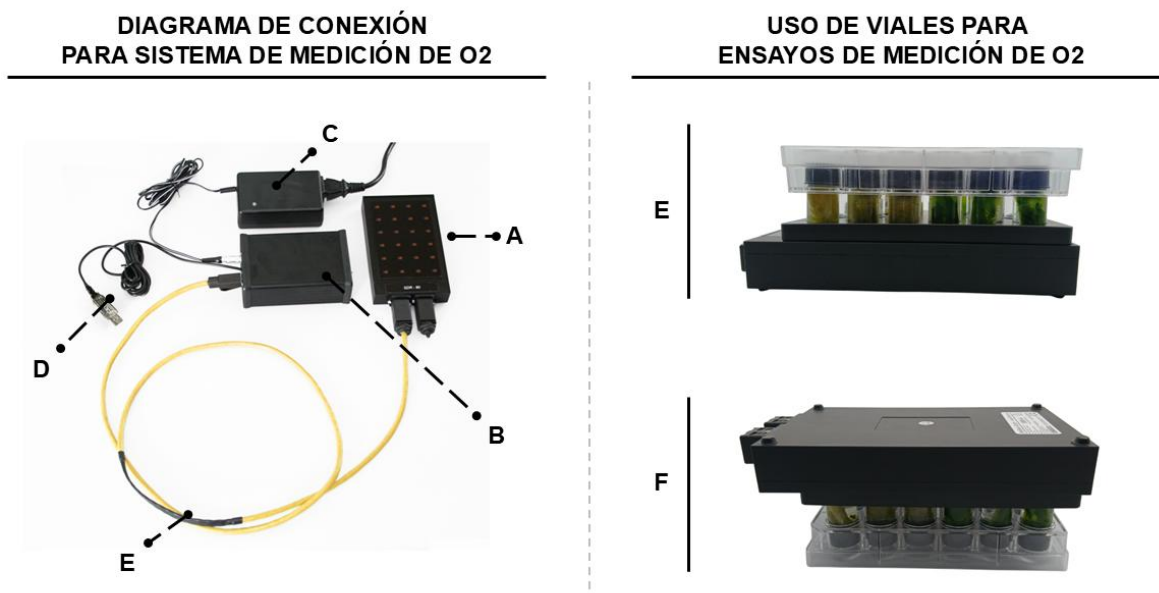
Figura 35. Etapas de montaje de muestras de tamal oxigénico para medición en sistema PreSens.



En la figura se describe el proceso de elaboración, a pequeña escala (1 cm x 1cm), de tamales siguiendo: ubicación de base y biopelícula (**Figura 35 – A y Figura 35 – B**), colocación de hidrogel sobre hoja descelularizada (**Figura 35 – C**) y amarre de tamal siguiendo el anudado tradicional (**Figura 35 – D**). Además, es ilustrado el montaje de hidrogel y tamal oxigénico en viales de medición: colocación de muestras de hidrogel (**Figura 35 – E**) y tamal oxigénico (**Figura 35 – G**) sin obstruir el sensor inferior de cada vial. Finalmente, se registra el cambio colorimétrico en muestras posterior a iluminación por 12 horas, seguido de almacenamiento en oscuridad por 8 horas para muestras de hidrogel (**Figura 35 – F**) y muestras de tamal oxigénico (**Figura 35 – H**).

Anexo 3: Detalles respecto al sistema de medición de oxígeno, PreSens SDR.

Figura 36. Diagrama de conexión de sistema de medición PreSens SDR y método utilizado para mediciones.



Para las mediciones desarrolladas con el sistema de medición PreSens SDR (Sensor Dish Reader) se requiere de la conexión de todas sus partes conforme lo establece el fabricante: la placa SDR (**Figura 36 – A**) se conecta al divisor o “*splitter*” (**Figura 36 – B**) a través del cable SDR – RJ45 (**Figura 36 – E**). Del “*splitter*” salen las conexiones hacia el adaptador de alimentación (**Figura 36 – C**) y hacia la computadora con un cable USB (**Figura 36 – D**). En la placa SDR se coloca el cobertor de luz con los viales a utilizar ubicados en cada pocillo y encima de estos viales se coloca un soporte uniforme, en este caso se utilizó una placa con Wells de 12 pocillos (**Figura 36 – E**). Durante cada ensayo de medición, se colocó de forma inversa, de manera que los viales quedan por debajo de la placa SDR y se requirió de la aplicación de iluminación lateral (**Figura 36 – F**), adaptando lo indicado por el ensayo fotosintético de O'leary (O'Leary, 2019).