

**Fabricación de hidrogeles de celulosa bacteriana funcionalizados con factores de crecimiento derivados de plasma pobre en plaquetas con potencial uso en el tratamiento de úlceras crónicas de pie diabético**

**Presentado por:**

Neider Yesid Cabrera Santamaria

Daniel Santiago Correa Suarez

Manuel Andrés Corredor Diaz

**Director:**

Ph.D. Silvia Milena Becerra Bayona

**Co-Director:**

Ph.D. Víctor Alfonso Solarte David

Universidad Autónoma de Bucaramanga

Facultad de Ingeniería

Programa de Ingeniería Biomédica

Bucaramanga

2022

## **Agradecimientos**

En primer lugar, queremos agradecerle a Dios y a todas las personas que estuvieron de cierta manera involucradas en nuestro proceso académico. También le agradecemos a todos los docentes del programa de Ingeniería Biomédica de la Universidad Autónoma de Bucaramanga, en especial a nuestros directores de tesis de grado, Ph.D Silvia Milena Becerra y Ph.D Víctor Alfonso Solarte, quienes fueron parte de este proceso, ya que gracias a su dedicación, conocimientos y experiencia pudimos adquirir un excelente aprendizaje a lo largo del desarrollo de este proyecto y de nuestra formación profesional.

### **Dedicatoria**

Dedico la finalización de este proyecto y de mi carrera universitaria a mis padres, quienes con su amor y apoyo incondicional han sido desde siempre uno de los motivos principales para luchar por mis sueños y convertirlos en realidad. Gracias por ayudarme a llegar hasta donde ahora estoy. Gracias por ser mi refugio en este camino.

*Daniel Santiago Correa Suarez*

Le dedico este libro a mi mamá, Janeth, quien ha sido la persona más incondicional, leal, amorosa e indispensable en mi vida. Gracias por siempre estar, prometo que yo siempre estaré.

*Manuel Andrés Corredor Díaz*

Este libro se lo dedico a mi familia, amigos y personas que estuvieron apoyándome cada día a ser mejor persona e incluso cuando ni si quiera yo mismo me entendía. Y por razones obvias, no puede faltar la dedicatoria a Taylor Swift, alguien que desde una extremada distancia lleva alentándome a través de su música por más de 10 años, mi gratitud, respeto y amor hacia ella.

*Neider Yesid Cabrera Santamaría*

## Resumen

Las úlceras crónicas de pie diabético (UCPD) son heridas que presentan alteración celular y desequilibrio bioquímico llevando a un retraso en la cicatrización y, en un 40% de los casos, a estadios de necrosis y amputación. Los tratamientos convencionales para las UCPD usualmente son efectivos en un 50% de las veces; no obstante, en el caso de coberturas tipo apósito, su efectividad se reduce dada la ausencia de una matriz para la proliferación celular, además de alterar la humedad en la herida, por tanto, surge la necesidad de formular tratamientos con mayor eficacia en la cicatrización. En este proyecto se fabricaron hidrogeles de celulosa bacteriana (CB) funcionalizados con factores de crecimiento derivados de plasma pobre en plaquetas (PPP), con el fin de aprovechar las propiedades estructurales y biocompatibles de la CB, además de las ventajas en la cicatrización de heridas proporcionadas por los factores de crecimiento. Los hidrogeles de CB se obtuvieron después de 7 días de cultivo del inóculo de bacterias *Gluconacetobacter-xylinus* bajo condiciones estáticas en 3 medios de cultivo distintos (HS, MC y HSMC). Después de esto, las muestras de dichos hidrogeles se impregnaron con soluciones de PPP a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75 y 100%) durante períodos de 6, 12 y 24 h, y se estimó la capacidad de inmovilización ( $C_i$ ) de factores de crecimiento para cada uno de estos tiempos. Posteriormente se estudió la liberación de factores de crecimiento inmovilizados en las muestras mediante su incubación a 37 °C en solución de PBS durante 48 h, y se estimó la capacidad de liberación ( $C_l$ ) a las 4 y 48 h. Adicionalmente, se calculó el módulo de compresión de los hidrogeles de CB funcionalizados con PPP, mediante ensayos de compresión. Los resultados de la  $C_i$  indican que las muestras de hidrogeles cultivados en medio HS inmovilizan una mayor cantidad de factores de crecimiento en comparación con las muestras producidas en los medios MC y HSMC, estas últimas presentan valores de  $C_i$  similares. De igual manera, los hidrogeles de CB que presentan una mejor  $C_l$  corresponden a

los obtenidos en medio HS. La  $C_i$  y la  $C_l$  de los hidrogeles de CB funcionalizados se relacionan directamente entre sí, por lo cual los hidrogeles con mayor  $C_i$ , consecuentemente son aquellos que presentan una mayor  $C_l$ . A su vez, la  $C_i$  y la  $C_l$  son directamente proporcionales a la concentración de PPP y al tiempo de inmovilización. En cuanto al módulo de compresión se encontraron valores en los rangos de 0.27 - 2.77 MPa, 0.89 - 1.18 MPa y 0.51 - 1.21 MPa para las muestras obtenidas en los medios de HS, MC y HSMC, respectivamente. Se concluye que los hidrogeles de CB funcionalizados con PPP, en especial los producidos en medio HS, podrían ser usados a futuro como potencial tratamiento para las UCDP debido a su comportamiento de inmovilización y liberación de biomoléculas benéficas para la cicatrización de heridas y su similitud en cuanto al comportamiento mecánico en comparación con valores del módulo de compresión del tejido nativo.

**Palabras clave:** Capacidad de inmovilización, capacidad de liberación, celulosa bacteriana, factores de crecimiento, hidrogeles.

## Abstract

Chronic diabetic foot ulcers (CDFUs) are wounds that present cellular alteration and biochemical imbalance leading to delayed healing and, in 40% of cases, to stages of necrosis and amputation. Conventional treatments for CDFUs are usually effective 50% of the time; however, in the case of dressing-type coverage, its effectiveness is reduced given the absence of a matrix for cell proliferation, in addition to altering the humidity in the wound, therefore, the need arises to formulate treatments with greater effectiveness in healing. In this project, bacterial cellulose (BC) hydrogels functionalized with growth factors derived from platelet-poor plasma (PPP) were made, in order to take advantage of the structural and biocompatible properties of BC, in addition to its advantages in wound healing. provided by growth factors. The BC hydrogels were obtained after 7 days of cultivation of the Gluconacetobacter-xylinus bacteria inoculum under static conditions in 3 different culture media (HS, MC and HSMC). After this, the samples of said hydrogels were impregnated with PPP solutions at different concentrations (0, 25, 50, 75 and 100%) for periods of 6, 12 and 24 h, and the immobilization capacity ( $C_i$ ) was estimated. of growth factors for each of these times. Subsequently, the release of immobilized growth factors in the samples was studied by incubating them at 37 °C in PBS solution for 48 h, and the release capacity ( $C_l$ ) was estimated at 4 and 48 h. Additionally, the compression modulus of the BC hydrogels functionalized with PPP was calculated by means of compression tests. The  $C_i$  results indicate that the hydrogel samples cultured in HS medium immobilize a greater amount of growth factors compared to the samples produced in MC and HSMC media, the latter showing similar  $C_i$  values. Similarly, the BC hydrogels that present a better  $C_l$  correspond to those obtained in HS medium. The  $C_i$  and  $C_l$  of the functionalized BC hydrogels are directly related to each other, so the hydrogels with the highest  $C_i$  are consequently those with the highest  $C_l$ . In turn, the  $C_i$  and  $C_l$  are directly proportional to the concentration of PPP and at the time of immobilization.

Regarding the compression modulus, values were found in the ranges of 0.27 - 2.77 MPa, 0.89 - 1.18 MPa and 0.51 - 1.21 MPa for the samples obtained in the HS, MC and HSMC media, respectively. It is concluded that BC hydrogels functionalized with PPP, especially those produced in HS medium, could be used in the future as a potential treatment for CDFUs due to their behavior of immobilization and release of beneficial biomolecules for wound healing and their similarity in terms of mechanical behavior compared to values of the compressive modulus of the native tissue.

**Key Words:** Immobilization capacity, release capacity, bacterial cellulose, growth factors, hydrogels.

**Tabla de Contenido**

Capítulo 1. Problema u Oportunidad .....	14
Introducción .....	14
Planteamiento del Problema .....	16
Justificación .....	17
Pregunta Problema .....	18
Objetivo General .....	18
Objetivos Específicos.....	18
Capítulo 2. Marco Teórico .....	19
La Piel humana y el Proceso de Cicatrización .....	19
Úlceras Crónicas de Pie Diabético.....	21
Sistemas de Clasificación de las UCPD.....	21
Alternativas Terapéuticas para las UCPD.....	23
Apósitos Implementados en UCPD .....	23
Hidrogeles y Celulosa Bacteriana .....	24
Factores de Crecimiento y el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP) .....	27
Inmovilización de Biomoléculas en Hidrogeles .....	28
Capacidad de Inmovilización de Moléculas en Redes Tridimensionales .....	29
Capacidad de Liberación de Moléculas Inmovilizadas en Redes Tridimensionales ...	29
Capítulo 3. Estado del Arte .....	31
Capítulo 4. Metodología .....	35

Extracción de PPP a partir de Muestras Sanguíneas Humanas.....	35
Síntesis de CB .....	35
Inmovilización de Factores de Crecimiento Derivados de PPP en Hidrogeles de CB	36
Caracterización Mecánica de los Hidrogeles Funcionalizados de CB.....	38
Liberación de Factores de Crecimiento Inmovilizados en los Hidrogeles de CB .....	39
Cuantificación de la Concentración Total de Factores de Crecimiento.....	40
Análisis Estadísticos .....	41
Capítulo 5. Resultados y Análisis de los Resultados .....	42
Resultados .....	42
Síntesis y Fabricación de Hidrogeles de CB .....	42
Inmovilización de Factores de Crecimiento Derivados de PPP en hidrogeles de CB .....	44
Liberación de Factores de Crecimiento Inmovilizados en los Hidrogeles de CB .....	48
Caracterización Mecánica de los Hidrogeles de CB .....	55
Análisis de Resultados .....	59
Capítulo 6. Conclusiones y Recomendaciones .....	63
Referencias.....	64
Anexos .....	74

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> Composición de la piel humana .....	20
<b>Figura 2</b> Unidades de glucosa unidas por enlaces 1,4- $\beta$ -glucosídicos.....	25
<b>Figura 3</b> Biosíntesis molecular UDP-glucosa de CB .....	26
<b>Figura 4</b> Métodos de inmovilización de biomoléculas .....	28
<b>Figura 5</b> Distribución de concentraciones de PPP .....	37
<b>Figura 6</b> Hidrogeles de CB obtenidos en los diferentes medios de cultivo .....	42
<b>Figura 7</b> Espesor de los hidrogeles de CB producidos en medios HS, MC y HSMC .....	43
<b>Figura 8</b> C <sub>i</sub> de PPP para los diferentes tiempos de inmovilización de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSCM .....	46
<b>Figura 9</b> C <sub>l</sub> de PPP de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSCM después de 4 h y 48 h de liberación .....	49
<b>Figura 10</b> C <sub>l</sub> de PPP de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC después de 48 h de liberación.....	54
<b>Figura 11</b> Curva esfuerzo vs deformación de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC .....	56
<b>Figura 12</b> Módulo de compresión de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC para los diferentes tiempos de inmovilización .....	57

## Índice de Tablas

**Tabla 1** Clasificación de UCPD Sistema Meggit-Wagner ..... 22

**Tabla 2** Clasificacion de UCPD Sistema Texas ..... 22

## Índice de Anexos

<b>Anexo 1</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza por un periodo de 6 h .....	74
<b>Anexo 2</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza por un periodo de 12 h .....	77
<b>Anexo 3</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza por un periodo de 24 h .....	80
<b>Anexo 4</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HS para los diferentes tiempos de inmovilización.....	83
<b>Anexo 5</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo MC para los diferentes tiempos de inmovilización .....	86
<b>Anexo 6</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HSMC para los diferentes tiempos de inmovilización .....	89
<b>Anexo 7</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 6 y 4 h, respectivamente.....	92
<b>Anexo 8</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 12 y 4 h, respectivamente.....	95
<b>Anexo 9</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 24 y 4 h, respectivamente.....	98
<b>Anexo 10</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 6 y 48 h, respectivamente.....	101

<b>Anexo 11</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 12 y 48 h, respectivamente.....	104
<b>Anexo 12</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 24 y 48 h, respectivamente.....	107
<b>Anexo 13</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HS para los diferentes tiempos de inmovilización con 48 h de liberación .....	110
<b>Anexo 14</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo MC para los diferentes tiempos de inmovilización con 48 h de liberación .....	113
<b>Anexo 15</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HSMC para los diferentes tiempos de inmovilización con 48 h de liberación .....	116
<b>Anexo 16</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HS cuando se realizan las pruebas de compresión en los diferentes tiempos de inmovilización.....	119
<b>Anexo 17</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo MC cuando se realizan las pruebas de compresión en los diferentes tiempos de inmovilización.....	122
<b>Anexo 18</b> Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HSMC cuando se realizan las pruebas de compresión en los diferentes tiempos de inmovilización.....	125

## Capítulo 1. Problema u Oportunidad

### Introducción

La diabetes es una enfermedad no transmisible de carácter metabólico, en la cual los niveles de insulina secretados por el páncreas no son adecuados, o son utilizados de manera ineficiente por el organismo (García Bello et al., 2016). La más reciente proyección realizada en Colombia estimó que para el año 2018 alrededor de 3.3 millones de personas padecerían de diabetes mellitus tipo II, cifra que muestra una prevalencia de la enfermedad a nivel nacional (López et al., 2017).

Las úlceras crónicas de pie diabético (UCPD) corresponden a la principal complicación en pacientes con diabetes mellitus, este tipo de lesiones son causadas por pérdida de sensibilidad y disminución en la irrigación sanguínea de los miembros inferiores (Sangiovanni et al., 2018). La complicación de las UCPD conlleva al desarrollo de gangrena y por consiguiente a procesos de amputación, los cuales generan un incremento entre el 50 y 68% en la posibilidad de muerte de los pacientes, transcurrido un período de 5 años desde la intervención (Sangiovanni et al., 2018).

Dentro de los tratamientos comunes para combatir las UCPD se encuentra el desbridamiento quirúrgico, terapia de presión negativa, alivianamiento de la presión en la zona, productos tópicos, antibióticos, coberturas tipo apósito, entre otros. No obstante, en la mayoría de los pacientes, los tratamientos convencionales presentan una eficacia que no supera el 50% (Ribeiro et al., 2014), particularmente para el caso de las coberturas tipo apósito, su efectividad es limitada debido a la alteración que pueden producir en la humedad de la herida y la carencia de un andamiaje que permita una anclaje y proliferación celular durante el proceso de cicatrización (Moffatt et al., 2004).

Teniendo en cuenta los limitantes de las tradicionales coberturas tipo apósito, una posible alternativa terapéutica para el tratamiento de las UCPD, corresponde a la

implementación de apósitos tipo hidrogel a base de biomateriales con características estructurales y biológicas óptimas y funcionalizados con moléculas bioactivas. Por tales motivos, la CB resulta ser un llamativo biomaterial gracias a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, cristalinidad, capacidad de hinchamiento y nanoestructura, en la cual puede darse la inmovilización de moléculas bioactivas dentro su red tridimensional, tales como factores de crecimiento que estimulan la cicatrización (Dutta et al., n.d.; Fijul Kabir et al., 2018).

En cuanto a las moléculas bioactivas para funcionalización de los apósitos tipo hidrogel, resulta llamativo traer a consideración el plasma pobre en plaquetas (PPP), el cual constituye un reservorio de moléculas bioactivas a pesar de su reducido nivel plaquetario (Chellini et al., 2019). Dentro de dichas moléculas bioactivas se contemplan factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF- 1) y otro tipo de moléculas como la fibrina y el fibrinógeno (Chellini et al., 2019), los cuales actúan de manera conjunta en la promoción de la migración y adhesión celular durante procesos de cicatrización en los tejidos (Cáceres et al., 2012).

En consecuencia, este proyecto buscó la fabricación de hidrogeles funcionalizados de CB mediante la inmovilización de factores de crecimiento derivados de PPP, como posible alternativa terapéutica a futuro en el tratamiento de las UCPD.

## Planteamiento del Problema

La diabetes es una enfermedad metabólica, crónica y no transmisible, que se caracteriza por una secreción insuficiente de insulina en el páncreas o por la incapacidad del organismo de utilizarla con eficacia (García Bello et al., 2016). De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, se estima que 62 millones de personas en las Américas padecen de diabetes mellitus tipo II (Diabetes - Organización Panamericana de La Salud, n.d.). En el caso de Colombia, la proyección más reciente estimó cerca de 3.3 millones de personas diabéticas para el año 2018. Teniendo en consideración estas cifras, es posible afirmar que la diabetes representa un problema de salud pública en incremento y con poca conciencia de prevención (López et al., 2017).

Una de las principales complicaciones de la diabetes es la aparición de úlceras crónicas en sus miembros inferiores, conocidas como úlceras crónicas de pie diabético (UCPD), producidas por la disminución de sensibilidad e irrigación sanguínea en los tejidos debido a la vasculopatía y neuropatía periférica (Sangiovanni et al., 2018). Asimismo, el 40% de los pacientes con UCPD desarrollan gangrena (Arroyo LD & Burbaro JI., 2019), razón por la cual deben someterse a procesos de amputación, que incrementan la posibilidad de muerte entre un 50 y 68% en los cinco años posteriores a dicho procedimiento (Sangiovanni et al., 2018).

En la última década se ha avanzado en el manejo clínico de las UCPD, utilizando métodos convencionales como los antibióticos, coberturas tipo apósito, terapia de presión negativa, procedimientos quirúrgicos, entre otros. No obstante, estos tratamientos pueden llegar a fallar hasta en un 50% de las veces (Ribeiro et al., 2014). En el caso del uso de apósitos tradicionales, la efectividad del tratamiento se reduce debido a la ausencia de una matriz que permita la proliferación celular durante la epitelización y sustituya la matriz extracelular (MEC) nativa. De igual forma, los recubrimientos tipo apósito alteran el

equilibrio en la humedad de la herida, con lo cual se limita la migración de fibroblastos, queratinocitos y el proceso de angiogénesis en el tejido (Moffatt et al., 2004). En respuesta a lo anterior, recientemente se han implementado diversos hidrogeles como posibles apóositos (Pozo, 2019); sin embargo, las características de porosidad, biocompatibilidad y degradación de los materiales usados no garantizan la formación de una estructura que permita una adecuada proliferación celular. Como resultado, teniendo en consideración la baja tasa de efectividad de los tratamientos actuales para las UCPD (Cáceres et al., 2012), resulta indispensable el desarrollo de alternativas terapéuticas que contribuyan eficazmente al proceso de cicatrización de dichas lesiones.

### **Justificación**

Una alternativa para el tratamiento de las UCPD corresponde a los apóositos tipo hidrogel funcionalizados con moléculas bioactivas, cuya elaboración requiere de un material biocompatible, no tóxico, biodegradable y de fácil disponibilidad; características con las cuales cuenta la CB, que a su vez podría actuar como un soporte para las células del tejido (Dutta et al., n.d.). Distintos estudios han demostrado que la CB es un biomaterial que permite la adhesión, crecimiento y proliferación celular, debido a que presenta características morfológicas similares a las de proteínas involucradas en procesos de cicatrización, como el colágeno (Dutta et al., n.d.). En cuanto a la funcionalización de apóositos, es importante mencionar que diferentes agentes biológicos, como los factores de crecimiento que promueven la cicatrización, pueden ser inmovilizados en la estructura reticulada de los hidrogeles de CB (Saad Setta et al., 2011, Fijul Kabir et al., 2018).

En relación con dichos agentes biológicos, el PPP se ha utilizado recientemente en varios tratamientos de cicatrización de heridas (Saad Setta et al., 2011). A pesar de la baja concentración de plaquetas y un limitado número de factores de crecimiento, el PPP contiene un reservorio de moléculas bioactivas, incluyendo el factor de crecimiento derivado de

plaquetas (PDGF), y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), que generalmente ayudan en la cicatrización de las lesiones (Chellini et al., 2019). Adicionalmente, el PPP presenta niveles elevados de fibrina, la cual promueve la formación de coágulos y la adhesión celular (Chellini et al., 2019), destacando así la efectividad del PPP en generar respuestas biológicas en diferentes tipos de células, como fibroblastos, proosteoblastos y precondrocitos, encargadas de estimular el proceso de curación en varios tejidos y en la respectiva remodelación de la MEC (Cáceres et al., 2012). Por consiguiente, se planteó la fabricación de hidrogeles de CB funcionalizados con factores de crecimiento derivados de PPP, como una posible alternativa terapéutica para el futuro tratamiento de las UCPD.

### **Pregunta Problema**

¿Cuáles son las condiciones para fabricar hidrogeles a partir de CB, que contengan factores de crecimiento derivados de PPP con potencial uso para el tratamiento de UCPD?

### **Objetivo General**

Fabricar hidrogeles de CB funcionalizados con factores de crecimiento derivados de PPP con potencial uso en el tratamiento de UCPD.

### **Objetivos Específicos**

1. Establecer un método para la inmovilización de factores de crecimiento derivados de PPP en hidrogeles de CB, mediante la variación de la concentración de PPP y el tiempo de inmovilización.
2. Evaluar la concentración de proteínas totales inmovilizadas en los hidrogeles de CB funcionalizados, al igual que sus propiedades mecánicas, para la validación de su uso a futuro en el desarrollo de alternativas terapéuticas para UCPD.

## Capítulo 2. Marco Teórico

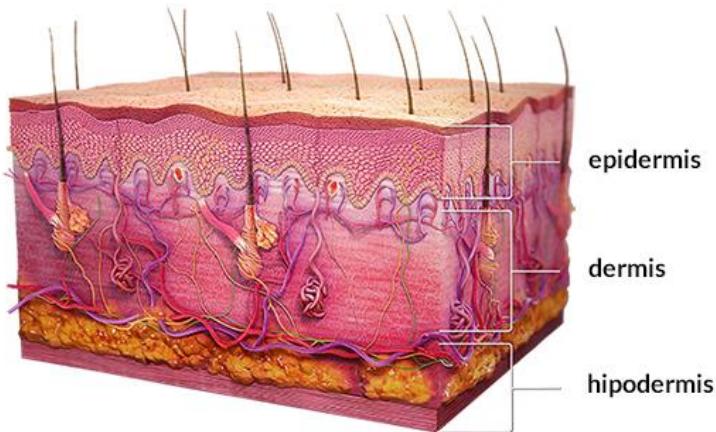
### La Piel humana y el Proceso de Cicatrización

La piel es el órgano de mayor extensión en el cuerpo humano, su principal función es actuar como una barrera de protección ante factores externos, tales como los agentes microbianos, la temperatura, agentes químicos, entre otros (Wong et al., 2016). Este órgano está formado por tres capas conocidas como epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1). La primera de ellas corresponde a la capa más superficial de la piel y se encuentra compuesta por queratinocitos y otorga al cuerpo protección frente a toxinas, bacterias y pérdida de líquidos (Carmichael, 2014). La segunda capa es la dermis, la cual confiere elasticidad y firmeza a la piel gracias a la presencia de colágeno y elastina. Adicionalmente, debido a su alto flujo sanguíneo permite el transporte de gran cantidad de nutrientes a la epidermis (Wong et al., 2016). La dermis, proporciona la mayor parte de la resistencia mecánica a la piel, presentando una fuerza de cizallamiento y resistencia a la rotura que van desde 5 a 15 MPa en la cara y hasta 27 MPa en la espalda (Gallagher et al., 2012). Finalmente, la hipodermis, compuesta en gran medida por adipocitos, tiene un papel importante en el almacenamiento de energía y en la homeostasis adiposa, ya que es particularmente rica en receptores acoplados a proteínas G, que regulan la lipólisis, la secreción de adiponectina y leptina (Amisten et al., 2015). Con respecto a las propiedades mecánicas, la hipodermis presenta una resistencia a la tracción de 1 a 5 MPa (Saulis et al., 2002).

En términos generales, la piel se caracteriza por comportarse de manera anisotrópica y viscoelástica, presentando un módulo de elasticidad que oscila entre los 5 kPa y 140 MPa (Kaira et al., 2016). En cuanto a otras características, diferentes estudios de proteómica han demostrado la presencia de un diverso grupo de proteínas en la piel (entre 155 y 174 proteínas), dentro de las cuales es posible destacar diferentes tipos de colágeno, elastina, queratinas, vimentina, actina, miosina, entre otras (Mikesh et al., 2013).

## Figura 1

### *Composición de la piel humana*



*Nota.* Adaptado de *Todo lo que tienes que saber sobre la piel*, de ABS® Bimedica, n.d.

Cuando se produce una herida, la piel se regenera gracias a un mecanismo de cicatrización compuesto de cuatro fases secuenciales, las cuales permiten reparar el tejido cutáneo lesionado. Dicho mecanismo de cicatrización se inicia con la fase de hemostasia e inflamación, donde el vaso sanguíneo se estrecha, causando una acumulación de plaquetas que forman un coágulo, y, por consiguiente, dan origen a la MEC. Luego comienza la fase de proliferación, en la cual se forma el tejido conectivo nuevo, dando paso así a una fase final de remodelación, donde el colágeno se remoldela para el cierre completo de la herida (Alven & Aderibigbe, 2020). En los pacientes diabéticos, sin embargo, este proceso de cicatrización está limitado debido a la enfermedad vascular, la reducción del suministro de sangre y la baja sensibilidad, por lo que las úlceras pueden ser crónicas, es decir permanecen abiertas durante largos períodos de tiempo. Es por ello que una de las complicaciones más frecuentes son las UCPD, donde la posibilidad de que la herida sea infectada por bacterias es mayor, impidiendo el debido proceso de cicatrización de la lesión. En particular, la producción de proteasas por parte de las bacterias conlleva a la degradación de elementos proteicos y, por tanto, impide la acción de elementos polipeptídicos como los factores de crecimiento, que promueven la regeneración celular en el tejido (Paolini et al., 2006).

## Úlceras Crónicas de Pie Diabético

Las UCPD son una complicación frecuente de la diabetes mellitus derivada de la neuropatía y posible vasculopatía coexistente, la cual representa una morbilidad, mortalidad y gastos sanitarios significativos. Las UCPD son heridas con alteración celular y desequilibrio bioquímico caracterizadas por presentar retraso en la cicatrización. Se estima que entre el 19 y el 34% de los pacientes con diabetes se ven afectados por una UCPD a lo largo de su vida; acorde a la Federación Internacional de Diabetes, se estima que 9.1 a 26.1 millones de personas desarrollarán UCPD anualmente (Armstrong et al., 2017).

### Sistemas de Clasificación de las UCPD

Actualmente, existe una gran cantidad de sistemas que se utilizan para clasificar las UCPD. Sin embargo, tanto la clasificación de Meggit-Wagner como la clasificación de Texas son los sistemas de estadiaje más utilizados para determinar el tratamiento a realizar, en donde es posible obtener información y datos sobre la gravedad, profundidad e infección de la herida y, en lo posible, un pronóstico del paciente respecto a posibles amputaciones (Gonzalez de la Torre et al., 2012).

La clasificación de Meggit-Wagner (Tabla 1) incluye el uso de 6 categorías o grados, que describen los tipos de lesiones con una serie de características, que pueden ayudar al clínico a establecer el estadiaje. Los primeros tres niveles clasifican la herida de acuerdo con su profundidad, el cuarto al grado de infección y los dos últimos al grado de necrosis. Por otro lado, el Sistema de Clasificación de Texas (Tabla 2) es un sistema que estudia el daño con base en dos criterios principales: la profundidad y la presencia de infección o isquemia. De esta forma, la columna “estadio” de la matriz otorga una clasificación a la herida de acuerdo con el parámetro de profundidad, asignando las letras: A) No presencia de infección o isquemia, B) Presencia de infección, C) Presencia de isquemia, D) Presencia de infección e

isquemia. Igualmente, las filas corresponden a la clasificación con base al grado de infección (0, I, II y III) (González de la Torre et al., 2012).

**Tabla 1**

*Clasificación de UCPD Sistema Meggit-Wagner*

<b>Clasificación de Meggit-Wagner</b>		
<b>Grado</b>	<b>Lesión</b>	<b>Características</b>
<b>0</b>	Ninguna, pie de riesgo	Callos gruesos, cabezas de metatarsianos prominentes, dedos en garra, deformidades óseas
<b>I</b>	Úlceras superficiales	Destrucción del espesor total de la piel
<b>II</b>	Úlceras profundas	Penetra la piel grasa, ligamentos, pero sin afectar hueso, infectada
<b>III</b>	Úlcera profunda más absceso (osteomielitis)	Extensa y profunda, secreción, mal olor
<b>IV</b>	Gangrena limitada	Necrosis de una parte del pie o de los dedos, talón o planta
<b>V</b>	Gangrena extensa	Todo el pie afectado, efectos sistémicos

Nota. Adaptado de “Clasificaciones de lesiones en pie diabético. Un problema no resuelto” (p. 75-87), por H. Gonzales de la Torre et al., 2012, *Gerokomos*, 23(2).

**Tabla 2**

*Clasificación de UCPD Sistema Texas*

<b>Estadio</b>	<b>Clasificación de Texas</b>			
	<b>Grado</b>	<b>0</b>	<b>I</b>	<b>II</b>
<b>A</b>	Lesiones pre o postulcerosas completamente e epitelizadas	Herida superficial, no involucra tendón, capsula o hueso	Herida a tendón o capsula	Herida penetrante a hueso o articulación
<b>B</b>	Infectada	Infectada	Infectada	Infectada
<b>C</b>	Isquémica	Isquémica	Isquémica	Isquémica
<b>D</b>	Infectada e isquémica	Infectada e isquémica	Infectada e isquémica	Infectada e isquémica

Nota. Adaptado de “Clasificaciones de lesiones en pie diabético. Un problema no resuelto” (p. 75-87), por H. Gonzales de la Torre et al., 2012, *Gerokomos*, 23(2).

## **Alternativas Terapéuticas para las UCPD**

En la actualidad, existen múltiples alternativas terapéuticas disponibles e incluso en proceso de investigación, tales como terapias complementarias, que se han implementado como práctica estándar en el manejo de la UCPD. Estos incluyen: agentes de desbridamiento no quirúrgicos, apóritos y productos tópicos, terapias de oxígeno, terapia de heridas con presión negativa, bioproductos acelulares, injertos de piel, terapias energéticas y terapias sistémicas (Westby et al., 2017).

## **Apóritos Implementados en UCPD**

Un apórito es una compresa estéril que se aplica en una herida con el principal propósito de brindar protección y actuar como una barrera contra las fuerzas externas y contaminantes, al tiempo de promover la absorción del exudado alrededor del sitio de la úlcera (Hilton et al., 2004).

En la actualidad, gran variedad de tipos de apóritos se encuentran disponibles para promover la cicatrización de heridas. Primeramente, se destacan los apóritos de alginato, los cuales se derivan de las algas marinas y se presentan en forma de alginato de calcio o alginato de sodio y calcio o ácido algínico. Estos forman un gel que puede absorber un gran volumen de exudado de la herida a fin de evitar la maceración de la piel y mantener un ambiente húmedo en la lesión. Por otro lado, existen apóritos no adherentes o poco adherentes que se utilizan con antibióticos para proporcionar un ambiente húmedo con propiedades hipoalergénicas en la herida. En cuanto a los apóritos hidrocoloides, estos crean un ambiente húmedo e hipóxico que puede facilitar la autolisis del material necrótico. Sin embargo, son apóritos que principalmente se utilizan para prevenir, en lugar de tratar las infecciones dentro de la herida. En el caso de los apóritos impregnados de antisépticos, como las preparaciones de yodo, generalmente se usan por ser altamente absorbentes y, por lo tanto, ayudan a prevenir la excoriación de la piel en las úlceras que supuran moderadamente. Los apóritos de

espuma son otra opción muy común para las UCPD, se aplican a heridas infectadas localmente en combinación con antibióticos sistémicos. Este tipo de apósito tiene un amplio rango de absorción, proporciona aislamiento térmico y es fácil de usar. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las soluciones de yodo son tóxicas para los fibroblastos y los queratinocitos (Damour et al., 1992; Balin & Pratt, 2002). Finalmente, están los apósitos impregnados de plata, los cuales son antisépticos, absorbentes y se destacan por sus efectos antimicrobianos o bactericidas sobre las heridas (Hilton et al., 2004).

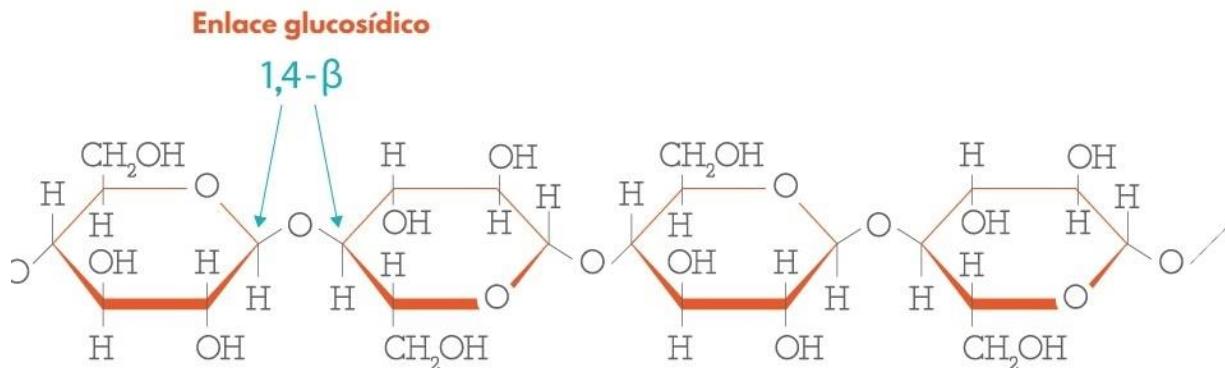
### **Hidrogeles y Celulosa Bacteriana**

Los hidrogeles son redes tridimensionales formados por una estructura polimérica reticulada, que presentan propiedades de elasticidad, baja rigidez, alta capacidad de absorción y retención de agua en sus estructuras intersticiales (Fijul Kabir et al., 2018). Los hidrogeles son utilizados en la ingeniería de tejidos como apósitos para heridas debido a su buena porosidad, además de su capacidad para permitir el desbridamiento y proporcionar un ambiente húmedo. Estos pueden ser diseñados a partir de polímeros sintéticos o biopolímeros, en donde se destaca el uso reciente de la celulosa, a causa de sus propiedades y diferentes fuentes de obtención, tales como la CB (Alven & Aderibigbe, 2020).

La CB es un polímero formado por unidades de glucosa unidas por enlaces 1,4- $\beta$ -glucosídicos (Figura 2), la cual es obtenida mediante métodos de cultivo estáticos o con agitación utilizando bacterias Gram-negativas como la *Acetobacter xylinum*. La estructura microfibrilar fina de la CB le confiere propiedades altamente benéficas en aplicaciones médicas, entre las que se encuentra la alta resistencia a la tracción, el alto índice de cristalinidad, el alto grado de polimerización y la biocompatibilidad. De igual forma, la similitud de su nanoestructura y morfología con la del colágeno la posicionan como una opción de soporte para la inmovilización de biomoléculas (Dutta et al., n.d.).

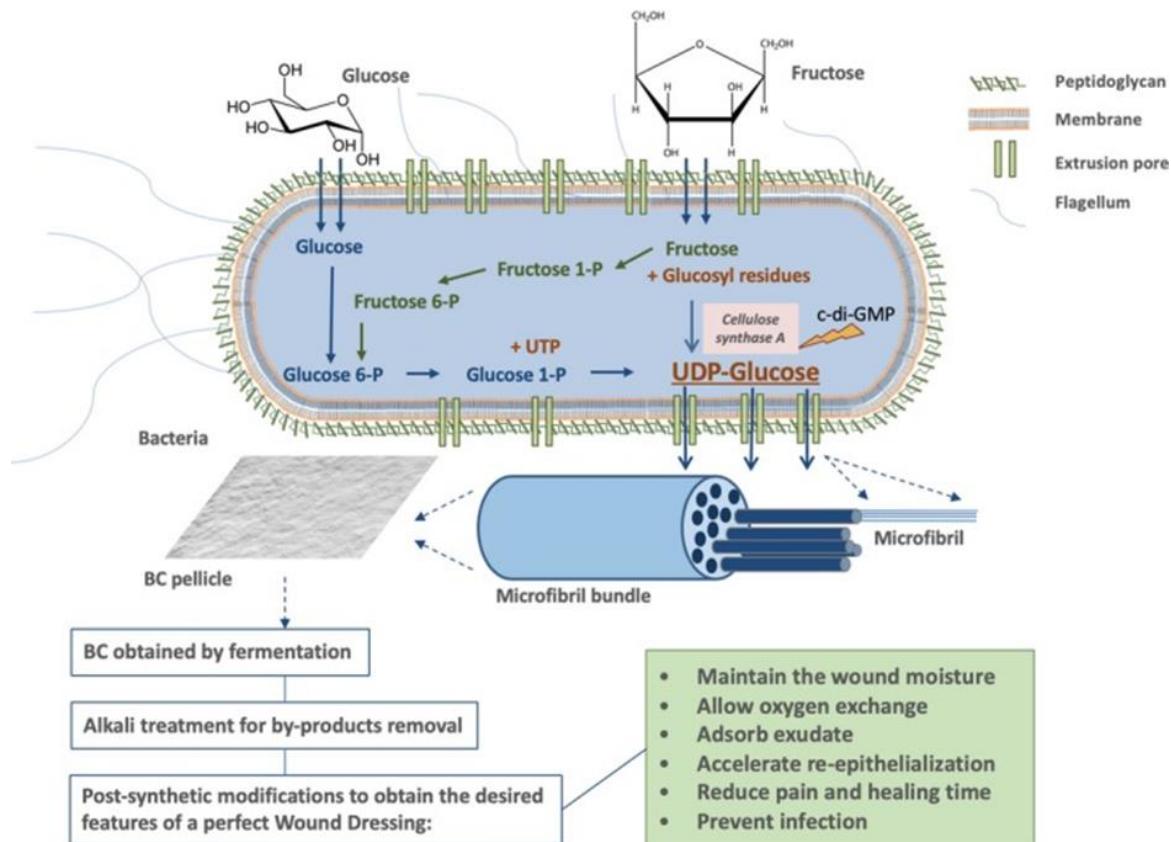
**Figura 2**

*Unidades de glucosa unidas por enlaces 1,4- $\beta$ -glucosídicos*



*Nota.* En el esquema se unen dos grupos hidroxilos (OH) de diferentes monosacáridos para formar el enlace glucosídico. Modificado de *Representación de la celulosa*, por Portal Académico del CCH, Universidad Nacional Autónoma de México, 2016.

La síntesis microbiana de celulosa involucra genes individuales y un operón llamado bcs ABCD, el cual codifica productos proteicos y enzimáticos asociados a la polimerización lineal de la glucosa y la formación de estructuras tridimensionales (Ross et al., 1991). En la figura 3 se muestra el proceso de síntesis de la CB.

**Figura 3***Biosíntesis molecular UDP-glucosa de CB*

*Nota.* Adaptado de “Celulosa bacteriana: un biopolímero versátil para aplicaciones de apóositos para heridas” (p. 586), por R. Portela et al., 2019, *Microbial Biotechnology*, 12 (4).

La vía de síntesis del exopolisacárido de celulosa, parte de la isomerización de una molécula de glucosa 6-fosfato en glucosa 1-fosfato, la cual reacciona con la uridina trifosfato (UTP) dando origen a la uridina-5'-difosfato-alfa-D-glucosa (UDP-glucosa) y, posteriormente, a cadenas lineales de 1,4 glucano gracias a la polimerización catalizada por la celulosa sintasa A. Las cadenas de celulosa lineales sintetizadas se secretan a través de poros de extrusión de la pared celular, que se encuentran alineados longitudinalmente (Krasteva et al., 2017). Fuera de la célula, las cadenas lineales de celulosa se ensamblan en nanofibras, posteriormente en microfibrillas y luego en haces de microfibrillas. Estos haces de microfibrillas se asocian dando origen a cintas de celulosa de 3 a 4 nm de grosor y 70 a 80

nm de ancho, las cuales conforman una red tridimensional que se estabiliza mediante la formación de puentes de hidrógeno entre las láminas, como se muestra en la figura 3.

### **Factores de Crecimiento y el Plasma Pobre en Plaquetas (PPP)**

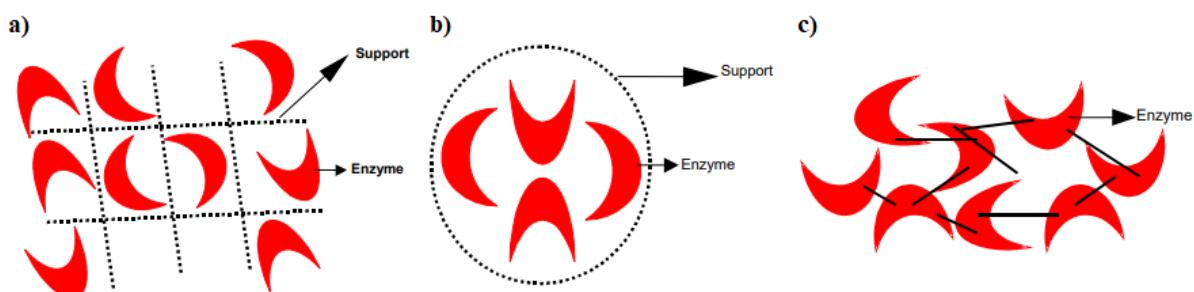
Los factores de crecimiento son biomoléculas que actúan como señales bioquímicas que afectan las respuestas celulares del organismo; por ejemplo, participan en el control del crecimiento y la diferenciación celular, ejerciendo así múltiples efectos en los procesos de reparación y cicatrización de los tejidos (Escotto Sánchez et al., 2001). La mayoría de estos factores son obtenidos del plasma presente en la sangre, el cual puede ser plasma rico o pobre en plaquetas (PRP o PPP, respectivamente) (Deuel & Chang, 2013). En específico, el PRP presenta una concentración plaquetaria de aproximadamente  $6 \times 10^{11}$  plaquetas/mL, mientras que la concentración de plaquetas en el PPP es de aproximadamente  $0.5 \times 10^8$  plaquetas/mL, la cual puede ser hasta 5 veces menor a la encontrada en el PRP (Zhang et al., 2020, Li et al., 2020). El PPP, considerado tiempo atrás como una sustancia de desecho, actualmente se ha reportado que tiene un efecto en diferentes respuestas biológicas tales como el proceso de cicatrización, la remodelación de la ECM y la migración de fibroblastos (Chellini et al., 2019b). Es importante destacar que el PPP, aunque carezca significativamente de plaquetas, posee grandes cantidades de otras moléculas como la fibrina, la cual es ampliamente utilizada en la fabricación de hidrogeles, debido a que favorece procesos de adhesión celular y da soporte estructural (Rodríguez Flores et al., 2012). Asimismo, el PPP también contiene: i) fibrinógeno, una proteína soluble del plasma que participa en la formación de coágulos sanguíneos, siendo precursora de la fibrina, ii) fibronectina, una glicoproteína adhesiva que constituye uno de los principales componentes de la MEC, y iii) trombina, una enzima peptidasa, la cual contribuye a que el factor de coagulación fibrinógeno se convierta en fibrina y así lleve a la formación de coágulos (Zhang et al., 2020).

## Inmovilización de Biomoléculas en Hidrogeles

Una molécula inmovilizada corresponde a aquella cuyo desplazamiento en el espacio ha sido delimitado total o parcialmente a una región establecida de la estructura sólida a la cual se ha unido (Zhang et al., 2004). Los principales métodos de inmovilización relacionados con los hidrogeles corresponden al de atrapamiento, encapsulación y entrecruzamiento (Figura 4). En el primero de ellos, la técnica de atrapamiento, las moléculas están libres en solución, pero restringidas en movimiento por la estructura reticular del gel, en donde existe un control de la porosidad para garantizar que la estructura sea lo suficientemente compacta para evitar alguna fuga de los mismos. En la técnica de encapsulación, generalmente se construyen microcápsulas semipermeables de 10-100  $\mu\text{m}$ , mediante un proceso de gelificación, para inmovilizar las moléculas. Por último, en la técnica de entrecruzamiento se utilizan diversos procesos químicos y/o físicos para formar una gran estructura tridimensional a través de la unión de un conjunto de moléculas (Elnashar, 2010).

**Figura 4**

*Métodos de inmovilización de biomoléculas*



*Nota.* Métodos de inmovilización. **a)** Inmovilización mediante la técnica de atrapamiento, **b)**

Inmovilización mediante la técnica de encapsulación, **c)** Técnica de entrecruzamiento.

Adaptado de “Moléculas inmovilizadas utilizando biomateriales y nanobiotecnología” (p. 61-76), por M. Elnashar, 2010, *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 1 (1).

### **Capacidad de Inmovilización de Moléculas en Redes Tridimensionales**

La cantidad de moléculas inmovilizadas en la estructura reticulada de un hidrogel puede ser estimada matemáticamente mediante el cálculo de la capacidad de inmovilización ( $C_i$ ), definida como la masa de la molécula de interés inmovilizada en el hidrogel respecto a la masa de dicho hidrogel. Esta  $C_i$  se calcula a partir de la diferencia de concentraciones de la solución que contiene la molécula de interés en el tiempo cero y en el de finalización del período de inmovilización, y la masa del hidrogel, multiplicado por el volumen de la solución de inmersión, como se presenta continuación (Ecuación 1)(Cargnин et al., 2020):

$$C_i = \left( \frac{c_0 - c_f}{m} \right) * v \quad (1)$$

Donde  $C_i$ : Capacidad de inmovilización,  $c_0$ : Concentración inicial de la solución que contiene la molécula de interés,  $c_f$ : Concentración final de la solución que contiene molécula de interés,  $m$ : masa del hidrogel y  $v$ : volumen de la solución que contiene la molécula de interés.

### **Capacidad de Liberación de Moléculas Inmovilizadas en Redes Tridimensionales**

El proceso de liberación de moléculas previamente inmovilizadas en una estructura reticulada puede estimarse mediante el cálculo de la capacidad de liberación del hidrogel ( $C_l$ ), la cual se define como la masa de las moléculas liberadas respecto a la masa del hidrogel. Para calcular dicha capacidad, se multiplica la concentración de la solución que contiene la molécula de interés finalizado el periodo de liberación por el volumen de dicha solución, y se divide entre la masa del hidrogel, como se muestra a continuación (Ecuación 2)(Cargnин et al., 2020):

$$C_l = \frac{c_f}{m} * v \quad (2)$$

Donde  $C_l$ : Capacidad de liberación,  $C_f$ : Concentración final de la solución que contiene la molécula de interés,  $m$ : masa del hidrogel y  $v$ : volumen de la solución que contiene la molécula de interés.

### Capítulo 3. Estado del Arte

Los tratamientos utilizados en pacientes con UCPD, en especial los apósisos convencionales, generalmente no promueven la construcción de una MEC con optimas propiedades que permitan la proliferación celular e incluso pueden producir alteraciones del equilibrio de la humedad en la herida a lo largo del proceso de cicatrización. De igual forma la carencia de moléculas bioactivas en la estructura de los materiales utilizados en los apósisos, limita su contribución en la regeneración del tejido (Moffatt et al., 2004), motivos por los que actualmente se trabaja en el desarrollo de nuevos apósisos tipo hidrogel que resuelvan las limitantes de los apósisos convencionales y así favorezcan la cicatrización de las heridas. En la ingeniería de tejidos, los hidrogeles son los andamios más utilizados debido a que brindan un entorno tridimensional (3D) altamente hinchado, que es muy similar al de los tejidos blandos y permiten la difusión de nutrientes, factores de crecimiento y desechos celulares a través de la red porosa que presentan (K. Y. Lee & Mooney, 2001).

Aunque los apósisos para heridas a base de hidrogeles se caracterizan por ayudar en la regeneración de tejidos, en el área de curación de heridas, aún se requiere de un desbridamiento quirúrgico o mecánico de la lesión, provocando así una nueva herida, infecciones o retrasos en el tiempo de curación (Stoica et al., 2020). Con la finalidad de proponer una alternativa que solucione este problema, Yue Zhao et al. diseñaron y construyeron un hidrogel supramolecular multifuncional, basado en enlaces multihidrógeno entre polímeros hidrófilos, para tratar heridas de pie diabético. Los hidrogeles resultantes presentaron excelentes propiedades como, buena transparencia, capacidad antibacteriana y propiedades conductoras y autocurativas, concluyendo así, que los hidrogeles supramoleculares mejoran de manera significativa la formación de tejido nuevo y proporcionan un efecto terapéutico en las UCPD al inducir la angiogénesis, aumentar la deposición de colágeno y prevenir la infección bacteriana (Zhao et al., 2020).

De igual forma, con relación al desarrollo y funcionalización de hidrogeles para su aplicación en el tratamiento de heridas, algunos autores se centran en el mejoramiento de sus propiedades, como su efecto antimicrobiano. Abhishek et al. desarrollaron hidrogeles de CB cargados con nanopartículas de plata, los cuales se destacaron por su alta biocompatibilidad y la presencia de actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida auris*, tres agentes bacterianos comunes en la infección de heridas. La síntesis de las nanopartículas de plata se realizó mediante el uso de curcumina acuosa, y su inmovilización en los hidrogeles se ejecutó mediante su inmersión en un medio coloidal acuoso que contenía a las nanopartículas de plata producidas con curcumina (Gupta et al., 2020). En este sentido, el carácter microbiano de los hidrogeles depende del compuesto que se inmovilice en estos, y su efectividad varía de acuerdo con el tipo de agente microbiano que se presente en la herida. En particular, Zmejkosk et al. diseñaron hidrogeles de CB, combinados con el polímero deshidrogenante de alcohol coniferílico (DHP), los cuales mostraron un efecto bactericida, especialmente contra bacterias formadoras de biopelículas *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, logrando así obtener un agente cicatrizante adecuado para su aplicación en forma de apósito con un efecto positivo en la curación de las heridas (Zmejkoski et al., 2018).

Por otra parte, otros autores han incluido diferentes factores de crecimiento en los hidrogeles con el propósito de mejorar su efectividad en la cicatrización de las UCPD. Yu-Hsiang et al. desarrollaron un hidrogel sintético a base de quitosano, incorporando iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) encapsulado en nanopartículas. Según los estudios realizados, este novedoso hidrogel brindó una mayor eficiencia en la cicatrización al alcanzar un grado de cierre del 97% en la herida, y una recuperación más rápida de la integridad y funcionalidad de los tejidos recién formados en comparación con otros tratamientos, como el uso de lavado con PBS, gasa y aderezos comerciales. La alta

eficiencia en la cicatrización mediante el uso de dicho hidrogel se debe a la liberación sostenida de Ag<sup>+</sup> y EGF, además de su óptima capacidad de hidratación e hinchamiento en medios de alta fuerza iónica (Y. H. Lee et al., 2021).

En cuanto al uso de biomateriales con adecuadas características de biocompatibilidad y nanoestructura para la funcionalización de apósoitos, Niédja et al. utilizaron CB oxidada de membrana heterofuncional para la inmovilización de papaína mediante la metodología de superficie de respuesta (MRS), generando así un apósoito bioactivo con alta actividad proteolítica para heridas cutáneas agudas y crónicas con una eficiencia de inmovilización de 49.4% y una actividad enzimática de papaína del 53% (Vasconcelos et al., 2020).

Otros autores como Xi Loh et al., aprovechan las características mecánicas y de biocompatibilidad proporcionadas por la CB para la cicatrización de heridas. En el trabajo realizado, los autores desarrollaron un hidrogel a base de CB y evaluaron su capacidad para entregar queratinocitos epidérmicos y fibroblastos dérmicos humanos para el tratamiento de lesiones cutáneas. En el estudio se trabajó con hidrogeles de CB/ácido acrílico (AA), los cuales proporcionaron un ambiente favorable para la viabilidad celular, pero desfavorable para su migración. Adicionalmente, la implementación de los hidrogeles en un modelo *in vivo* de roedores permitió cuantificar un porcentaje de cierre de una herida cutánea en el último día del experimento del  $99.2 \pm 1.3\%$ . De esta forma se concluye que, aunque la migración celular en el hidrogel de CB/AA es limitada, es posible implementarlo como posible apósoito para promover la cicatrización de heridas debido a su alta eficiencia en el aporte de queratinocitos y fibroblastos (Loh et al., 2018).

Hasta la fecha, los factores de crecimiento derivados de plaquetas se han utilizado como una nueva alternativa de tratamiento en pro de estimular y ayudar en el proceso de cicatrización de las heridas de las úlceras crónicas, promoviendo la restauración del tejido (Cross & Mustoe, 2003). Autores como (Steed et al., 1992), (O'Meara et al., 2001) y (Kantor

& Margolis, 2001), han demostrado que la liberación de plaquetas mejora significativamente la tasa de cicatrización de la herida. En particular, Saad et al. realizaron un estudio del efecto que tenían los factores de crecimiento liberados por las plaquetas presentes en el PRP tras su activación, en la curación de las UCPD en comparación con el PPP. Dicho estudio tuvo como objetivo principal evaluar e interpretar la tasa de curación de las úlceras mediante el análisis de las características del exudado de la herida, el tejido necrótico, la infección y el tejido de granulación cuando se aplica directamente PRP o PPP a la lesión. En esta investigación se destaca el efecto del PRP en la restauración del tejido; no obstante, es necesario la realización de estudios adicionales que analicen a profundidad sus propiedades y sus beneficios en relación con el tratamiento de heridas (Saad Setta et al., 2011).

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica realizada, se evidencian avances significativos en el desarrollo de apósitos de hidrogel para el tratamiento de cicatrización de heridas crónicas. De igual forma, es importante destacar las propiedades que caracterizan a la CB en cuanto a su estructura, propiedades químicas y mecánicas, además de sus características de biocompatibilidad. La funcionalización de dichos hidrogeles mediante la incorporación de moléculas bioactivas como enzimas y otros componentes biológicos, son de interés en el desarrollo de alternativas terapéuticas con alta eficacia en el cierre de heridas; sin embargo, se continúa en la búsqueda de componentes que mejoren el proceso de cicatrización y cumplan con características que no afecten el microambiente de la herida y perjudiquen el tejido. Finalmente, cabe destacar que en la revisión realizada no se encontraron estudios en los cuales se hayan funcionalizado hidrogeles de CB mediante la inmovilización de factores de crecimiento derivados de PPP.

## Capítulo 4. Metodología

### **Extracción de PPP a partir de Muestras Sanguíneas Humanas**

Para la obtención del PPP, se realizó venopunción a un individuo sano en la vena cefálica media a nivel del antebrazo con una aguja 21G y un tubo vacutainer tapa azul que contenía 1,3 mL de solución anticoagulante de citrato dextrosa (ACD). Posterior a ello, la muestra se sometió a un ciclo de centrifugado de 300 x g, a 18 °C por 5 minutos. Concluido el primer ciclo de centrifugado, la capa superior, correspondiente al plasma, se transfirió a un tubo falcón y se sometió a un segundo ciclo de centrifugado a 700 x g durante 17 minutos. Finalizado el ciclo, se obtuvo el PPP y un botón plaquetario, donde el PPP se mantuvo a -80 °C hasta su uso final (Woo et al., 2013).

### **Síntesis de CB**

Para la síntesis de CB se llevó a cabo la activación del inóculo de bacterias *Gluconacetobacter xylinus* que se encontraban criopreservadas. Para este proceso, se transfirió un vial de células a un frasco con 50 mL de medio de cultivo Hestrin – Scharamm (HS), y se incubó durante 24 h con agitación orbital, a una velocidad de 150 rpm y temperatura de 30 °C. Posteriormente, se realizó un pre-cultivo en 225 mL de medio HS, usando una concentración del 15% del inóculo activado y se sometió nuevamente a agitación orbital con las mismas condiciones establecidas previamente (Ji et al., 2016).

A continuación, se inocularon los medios de cultivo a estudiar (medio HS, medio a base de mucílago de café sin suplementar (MC) y medio a base de mucílago de café suplementado con peptona, extracto de levadura, ácido cítrico y fosfato disódico (HSMC)) con una concentración del 15% (v/v) del pre-cultivo, en un frasco de 250 mL y se incubaron bajo condiciones estáticas durante un período de 7 días. Transcurrido el tiempo de incubación, la CB se purificó usando una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% (v/v) por 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, los hidrogeles de CB se lavaron con agua

destilada y desionizada hasta obtener un pH neutro, se esterilizaron por vapor sumergidas en agua, y se almacenaron a 4 °C hasta su uso final (Ji et al., 2016).

Es importante mencionar que esta tesis se encuentra anidada a un proyecto de la convocatoria N° 771 de la Gobernación de Santander y MinCiencias: “Convocatoria para la formación de capital humano de alto nivel para el departamento de Santander”.

### **Inmovilización de Factores de Crecimiento Derivados de PPP en Hidrogeles de CB**

Para los experimentos de inmovilización de factores de crecimiento, se evaluaron tres períodos de inmovilización (6, 12 y 24 h), uno para cada experimento, y cinco concentraciones de PPP (0, 25, 50, 75 y 100%) para todos los experimentos.

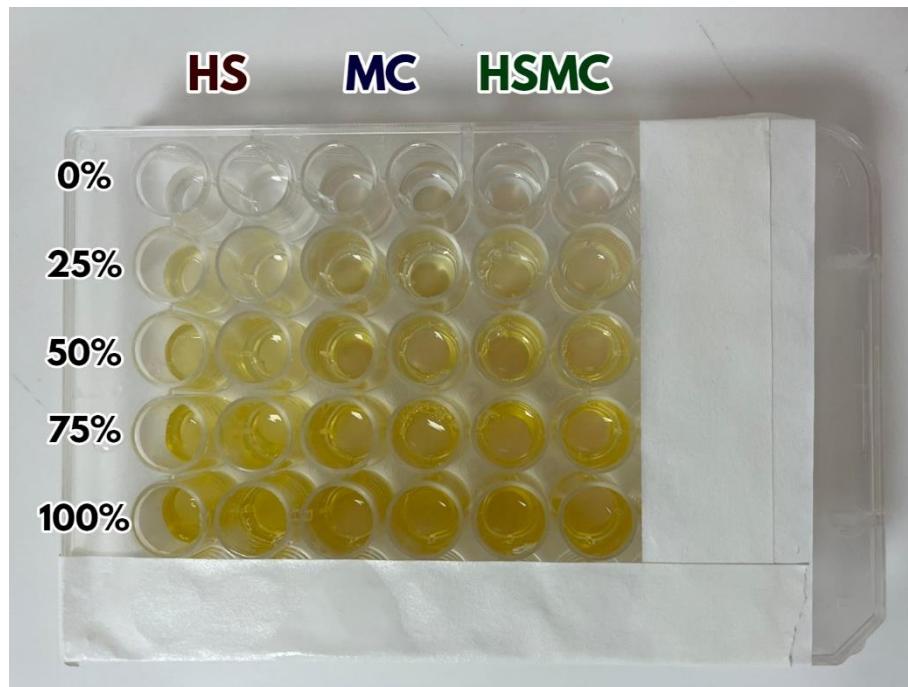
Los hidrogeles de CB utilizados se produjeron en tres tipos de medio de cultivo (HS, MC y HSMC) de acuerdo con lo descrito en la sección síntesis de CB (Capítulo 4), y las diferentes concentraciones de PPP se obtuvieron a partir de la dilución con PBS de la solución stock resultante de la extracción del PPP, dando origen a soluciones con porcentajes de PPP del 0, 25, 50, 75 y 100%. Las concentraciones de factores de crecimiento de dichas soluciones se cuantificaron acorde a lo descrito en la sección cuantificación de la concentración total de factores de crecimiento (Capítulo 4). En cada uno de los experimentos se utilizaron 12 hidrogeles de CB, cuatro por cada medio de cultivo (Kim et al., 2011).

En primer lugar, los hidrogeles de CB de cada experimento se dejaron hinchar en PBS durante 18 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, mediante el uso de un punch de 8 mm, se extrajeron 10 muestras por cada hidrogel (5 muestras para cuantificación de factores de crecimiento y 5 para caracterización mecánica), las cuales se depositaron transitoriamente en pozos de platos de 48, previamente cargados con 400 µL de PBS.

Una vez transferidas las muestras a los platos, el PBS se removió de los pozos y se reemplazó por PPP a concentraciones del 0%, 25%, 50%, 75% y 100% de acuerdo con la distribución mostrada en la figura 5.

## Figura 5

*Distribución de concentraciones de PPP*



*Nota.* Los porcentajes en la figura hacen referencia a la concentración del PPP para cada fila de pozos. Las iniciales HS, MC y HSMC corresponden al medio de cultivo en que se produjeron las muestras ubicadas en cada columna, por lo tanto, cada medio tiene dos columnas de muestras, donde la primera se empleó para la cuantificación de factores de crecimiento y la segunda para la caracterización mecánica de los hidrogeles de CB funcionalizados.

Se replicó el diagrama de la figura 5, dando como resultado 4 platos de muestras organizados con la misma distribución en cada uno de los experimentos realizados. Finalmente, las muestras se incubaron a una temperatura de 4 °C para cada período de inmovilización. Cabe destacar que todos los procesos previos a la incubación de las muestras fueron realizados bajo condiciones estériles en una cabina de bioseguridad.

Finalizado el tiempo de inmovilización en cada experimento, se cuantificó la concentración de factores de crecimiento de las soluciones de acuerdo con lo descrito en la

sección cuantificación de la concentración total de factores de crecimiento (Capítulo 4), y se registraron los valores obtenidos. Posteriormente, al finalizar los experimentos de liberación (ver sección liberación de factores de crecimiento inmovilizados en los hidrogeles de CB del capítulo 4), se retiró el exceso de líquido de cada una de las muestras y se obtuvo su masa mediante el uso de una balanza digital. Teniendo en cuenta la masa de las muestras, el volumen de las soluciones de los pozos y la diferencia entre la concentración inicial de factores de crecimiento (concentraciones de las soluciones obtenidas a partir de la dilución de la solución stock de PPP) y la concentración de factores de crecimiento finalizado el período de inmovilización, se calculó el valor de  $C_i$  para cada una de las muestras, según ecuación 1.

### **Caracterización Mecánica de los Hidrogeles Funcionalizados de CB**

Para cada uno de los experimentos, se utilizaron las muestras destinadas en la sección inmovilización de factores de crecimiento derivados de PPP en hidrogeles de CB (Capítulo 4), para caracterización mecánica de los hidrogeles funcionalizados de CB, es decir, en cada uno de ellos se utilizó un  $n = 4$  muestras por concentración de PPP (0, 25, 50, 75 y 100%) producidas en los diferentes medios de cultivo (HS, MC y HSMC).

En primer lugar, mediante el uso de un calibrador digital se obtuvo el diámetro y la altura de las diferentes muestras y se registraron los respectivos valores. A continuación, cada una de las muestras se sometió a un ensayo de compresión empleando el banco de carga ElectroForce 3200 con una celda de carga de 45 N. Para esto, cada muestra se dispuso en los platos del banco de carga y se comprimió el 40% de su altura inicial a una velocidad de 0.05 mm/s. Con los datos almacenados en el equipo, se procedió a realizar la gráfica de esfuerzo vs deformación de cada una de las muestras y se analizó para determinar el respectivo módulo de compresión.

Los valores de deformación ( $\varepsilon$ ) de las muestras se obtuvieron al calcular el cociente entre el desplazamiento final del equipo y la longitud de la muestra, tal como se presenta a continuación (Ecuación 3).

$$\varepsilon = \frac{(longitud\ final - longitud\ inicial)}{longitud\ inicial} \quad (3)$$

Los valores de esfuerzo ( $\sigma$ ) se calcularon al establecer la relación entre la fuerza (F) en Newtons (N) aplicada sobre la muestra y su área transversal (A) en ( $mm^2$ ). La fórmula correspondiente se muestra a continuación (Ecuación 4).

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (4)$$

Partiendo de los cálculos previos, se realizó la gráfica de esfuerzo vs deformación para cada muestra y se obtuvo el valor de la pendiente de la sección lineal para determinar el valor del módulo de compresión.

### **Liberación de Factores de Crecimiento Inmovilizados en los Hidrogeles de CB**

Finalizado el tiempo de inmovilización para cada experimento se procedió a analizar la liberación de factores de crecimiento inmovilizados en los hidrogeles de CB, para lo cual, las muestras destinadas a cuantificación de factores de crecimiento de cada plato, según lo especificado la sección inmovilización de factores de crecimiento derivados de PPP en hidrogeles de CB (Capítulo 4), se transfirieron a nuevos pozos de platos de 48, cargados previamente con 400  $\mu L$  de PBS. En total se tuvo un  $n = 4$  muestras por concentración de PPP (0, 25, 50, 75 y 100%) producidas en los diferentes medios de cultivo (HS, MC y HSMC). Después de esto, las muestras en los nuevos pozos se colocaron a incubar durante 48 h a 37 °C.

Durante el período de incubación de las muestras se realizó la cuantificación de la concentración de factores de crecimiento de las soluciones de los pozos a las 4 y 48 h, de acuerdo con lo descrito en la sección cuantificación de la concentración total de factores de

crecimiento (Capítulo 4). Partiendo de los valores obtenidos en las cuantificaciones de los factores de crecimiento realizadas, el volumen de la solución en los pozos y la masa de cada muestra (valor obtenido de acuerdo con lo descrito en la sección inmovilización de factores de crecimiento derivados de PPP en hidrogeles de CB del capítulo 4), se estimó la  $C_l$  de las muestras a las 4 y 48 h de incubación.

### **Cuantificación de la Concentración Total de Factores de Crecimiento**

Durante la ejecución de cada uno de los experimentos, se requirió de la cuantificación de la concentración total de factores de crecimiento de distintas soluciones en cuatro instantes específicos: i) cuando se llevó a cabo la dilución con PBS de la solución stock de PPP para obtener nuevas soluciones con las diferentes concentraciones de PPP (0, 25, 50, 75 y 100%); ii) finalizado el período de inmovilización de factores de crecimiento de las muestras; iii) transcurridas 4 h desde el comienzo del período de incubación de las muestras a 37 °C, para análisis de liberación de factores de crecimiento; y iv) culminado el período de incubación (48 h) de las muestras a 37 °C, para análisis de liberación de factores de crecimiento.

Para la cuantificación de la concentración total de factores de crecimiento de las distintas soluciones en cualquiera de los instantes específicos, se configuró el equipo de espectrofotometría Nanodrop con una absorbancia de 280 nm y se utilizó PBS como blanco de medición. Posteriormente, con ayuda de una micropipeta, se tomaron 2 µL de cada una de las soluciones y se realizaron las respectivas mediciones por duplicado en el equipo para obtener un valor de concentración en mg/mL.

Para el caso de las soluciones resultantes al diluir la solución stock de PPP, se tomó una muestra de aproximadamente 6 µL de cada una de las soluciones con diferente concentración de PPP (0, 25, 50, 75 y 100%), y se transfirió a un tubo eppendorf. continuación, las muestras recolectadas se utilizaron para realizar la cuantificación con el equipo Nanodrop. Respecto a la cuantificación total de factores de crecimiento de las

soluciones de los pozos finalizado el período de inmovilización, las soluciones contenidas en cada pozo se transfirieron a tubos eppendorf usando una micropipeta y se centrifugaron a 5000 x g durante 5 minutos, y se realizaron las respectivas mediciones en el equipo.

Finalmente, para la cuantificación total de factores de crecimiento de las soluciones de los pozos transcurridas 4 y 48 h desde el comienzo del período de incubación de las muestras a 37 °C, se tomaron los platos de pozos y se agitaron suavemente, a continuación, con ayuda de una micropipeta se extrajeron directamente de cada pozo 2 µL de la solución y se llevaron al equipo para realizar la cuantificación.

*Nota.* El PPP es reservorio de un conjunto de moléculas proteicas dentro de las cuales se encuentran principalmente factores de crecimiento; sin embargo, también se albergan allí otro tipo de proteínas en menor proporción. Para cuestiones del presente proyecto se asumió la concentración total de proteínas presente en el PPP como la concentración total de factores de crecimiento que se cuantifican en las diferentes soluciones de interés.

### **Análisis Estadísticos**

Para cada una de las actividades de la metodología en que se requirió de un análisis estadístico, se presentaron los resultados como el promedio de los valores ± su respectivo error estándar. Para la comparación entre grupos se llevó a cabo análisis de varianza de dos vías (ANOVA), acompañado de la prueba post hoc de Tukey. Para todos los análisis estadísticos, los valores de p < 0.05 se consideraron significativos. Se utilizó un n = 4 por cada condición de estudio.

## Capítulo 5. Resultados y Análisis de los Resultados

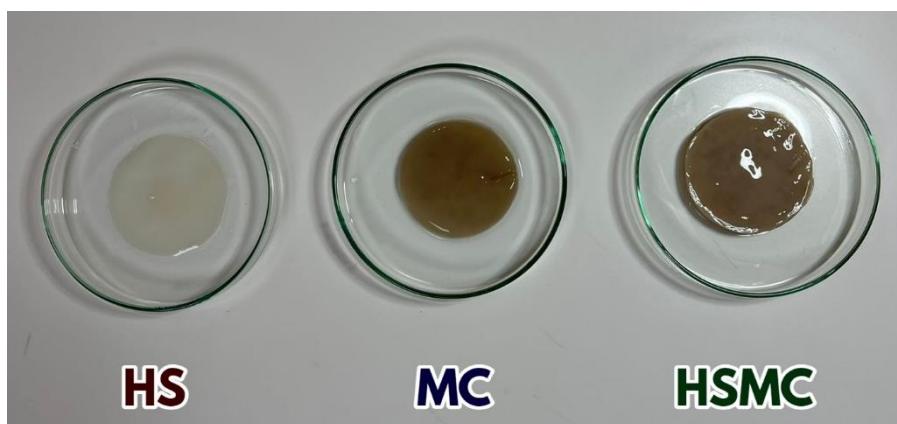
### Resultados

#### Síntesis y Fabricación de Hidrogeles de CB

Con el objetivo de inmovilizar factores de crecimiento derivados de PPP en hidrogeles de CB, estos hidrogeles se obtuvieron después de 7 días de cultivo del inóculo de bacterias *Gluconacetobacter-xylinus* bajo condiciones estáticas en 3 medios de cultivo distintos (HS, MC y HSMC). Dichos hidrogeles se purificaron usando hipoclorito de sodio al 0.5% (v/v) y se esterilizaron con vapor sumergidos en agua. Los hidrogeles obtenidos se expusieron a PBS por un periodo de 18 h con el fin de lograr su hincharamiento (Figura 6).

#### Figura 6

*Hidrogeles de CB obtenidos en los diferentes medios de cultivo*

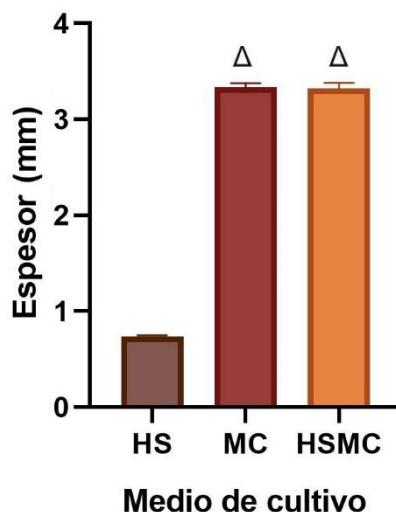


*Nota.* Hidrogeles de CB obtenidos en los medios: Medio Hestrin – Scharamm (HS), medio a base de mucílago de café sin suplementar (MC) y medio a base de mucílago de café suplementado con peptona, extracto de levadura, ácido cítrico y fosfato disódico (HSMC).

Transcurridas las 18 h de hincharamiento, se midió el espesor de los hidrogeles de CB con un calibrador digital. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 7, la cual muestra el valor promedio del espesor de los hidrogeles de CB cultivados en los diversos medios en estudio.

**Figura 7**

*Espesor de los hidrogeles de CB producidos en medios HS, MC y HSMC*



*Nota.* Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  error estándar.  $\Delta$  Diferencia significativa entre los hidrogeles producidos en el medio MC y HSMC respecto al medio HS ( $p < 0.0001$ ).

Los hidrogeles obtenidos en el medio HS presentaron un espesor de alrededor de 0.74 mm  $\pm$  0.01, siendo este el más pequeño en comparación a los demás hidrogeles cultivados en los medios MC y HSMC, lo que hizo más difícil su manipulación. Adicionalmente, la superficie de estos hidrogeles presentó una mayor viscosidad en comparación con los demás. En cuanto a los hidrogeles obtenidos en los medios MC y HSMC, se encontraron características similares; en particular, los hidrogeles de MC presentaron un espesor aproximado de 3.33 mm  $\pm$  0.045, mientras que los hidrogeles de HSMC presentaron un espesor de 3.32 mm  $\pm$  0.058. Estos hidrogeles, debido a sus dimensiones, en comparación a los hidrogeles obtenidos en el medio HS, presentaron mayor rigidez, consistencia y deformación al contacto.

De manera general se puede afirmar que: i) el espesor de los hidrogeles de CB obtenidos en los medios MC y HSMC es alrededor 4.48 veces superior a la de los producidos en medio HS ( $p < 0.0001$ ), ii) el espesor de los hidrogeles de CB obtenidos en los medios MC y HSMC son muy similares (no se encontraron diferencias significativas).

## **Inmovilización de Factores de Crecimiento Derivados de PPP en hidrogeles de CB**

Con el propósito de inmovilizar los factores de crecimiento derivados de PPP en los hidrogeles de CB, obtenidos según lo descrito en la sección síntesis de CB (Capítulo 4), se empleó PPP proveniente de las muestras del proyecto al cual se anida esta tesis, titulado: Diseño de una biotinta tipo hidrogel a base de polietilenglicol diacrilado con plasma rico en plaquetas, dirigida a la fabricación de apósitos para úlceras crónicas de pie diabético por bioimpresión en 3D. Proyecto aprobado en la convocatoria interna extemporánea 2019 - 2020, con fecha de inicio del 3 de agosto de 2020.

En breve, una vez hinchados los hidrogeles, se tomaron punches de 8 mm de diámetro y se expusieron a las diferentes soluciones de PPP (0%, 25%, 50%, 75% y 100%) durante 6, 12 y 24 h, a una temperatura de 4 °C. La figura 8 presenta los valores de  $C_i$  de PPP estimados para las diferentes muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC, para cada una de las condiciones bajo estudio. El panel A de la figura 8 muestra la  $C_i$  para un periodo de inmovilización de 6 h. En particular, las concentraciones de PPP de las muestras obtenidas en los medios MC y HSMC, no presentaron diferencias significativas al ser comparadas entre sí. Asimismo, se observó que en las muestras del medio HS, para las concentraciones de PPP de 50, 75 y 100%, la  $C_i$  incrementó de forma significativa aproximadamente un 2.18, 4.13 y 4.95 veces en comparación a la concentración de 25% de PPP, respectivamente. De igual forma, las muestras de los medios MC y HSMC presentaron un aumento significativo en las concentraciones de 50, 75 y 100% de PPP respecto a la concentración de 25% de PPP, incrementando aproximadamente 2.78, 4.39 y 5.92 veces para las muestras obtenidas en medio MC, y un aumento aproximado de 2.54, 4.68 y 5.50 veces en las muestras obtenidas en medio HSMC, respectivamente.

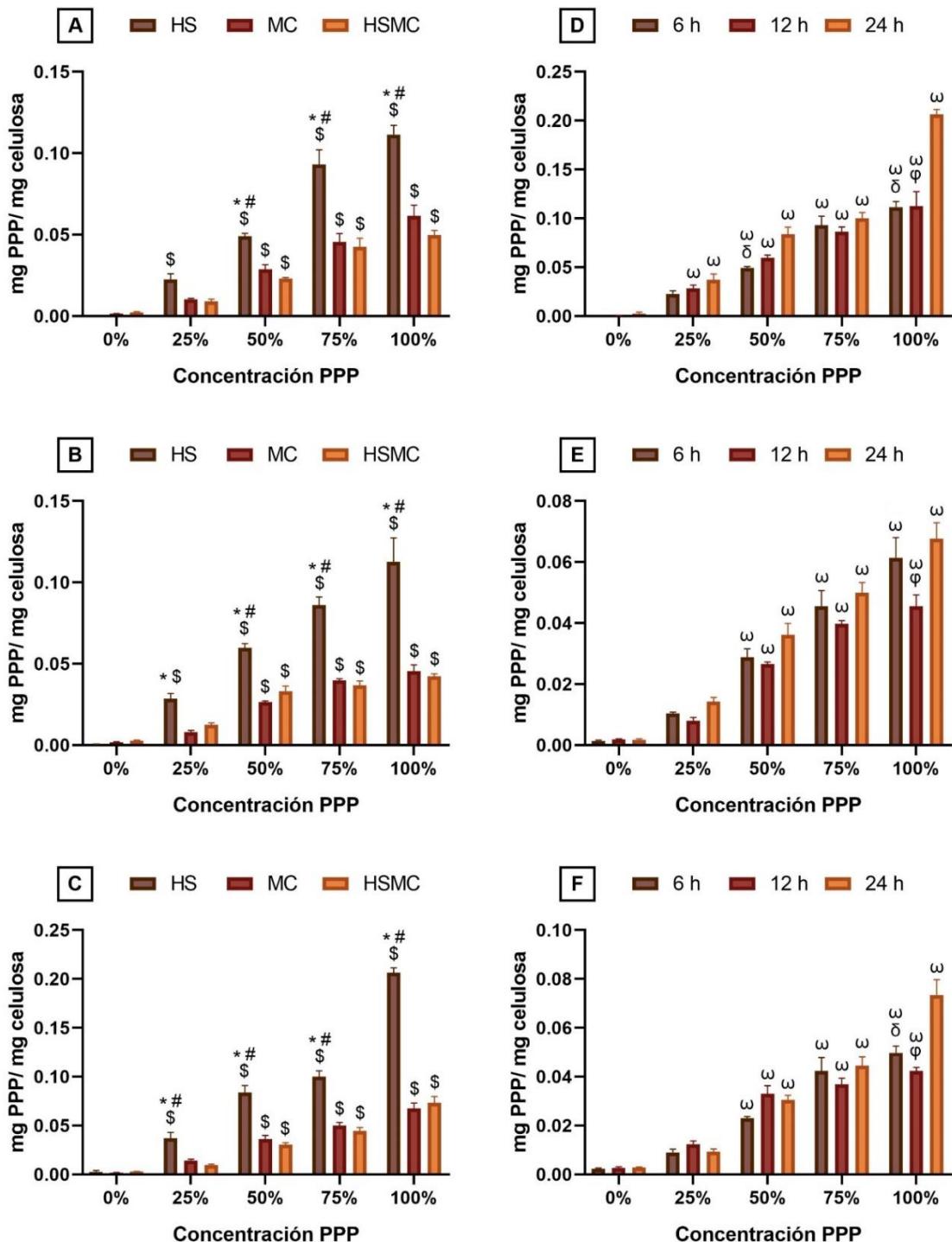
Respecto al tiempo de inmovilización de 12 horas (Figura 8B), se encontró que las muestras de HS a una concentración de PPP de 25% presentaron diferencias significativas

respecto a las muestras del 50, 75 y 100%. Por ejemplo, la  $C_i$  en la concentración de 50% de PPP del medio HS con respecto a la obtenida en la concentración de 25% del mismo medio, aumentó aproximadamente 2.10 veces. De manera similar, la  $C_i$  encontrada en las muestras de los medios MC y HSMC presentaron un incremento significativo en las concentraciones de 75% de PPP con respecto a la concentración de 25% de PPP, aumentando aproximadamente 4.97 y 2.97 veces para MC y HSMC, respectivamente. No obstante, las muestras obtenidas en los medios MC y HSMC no presentaron diferencias significativas entre ellas.

Por otra parte, en la figura 8C se presentan los resultados de la  $C_i$  obtenida para un periodo de inmovilización de 24 h. En cuanto a los valores obtenidos para el medio HS, se evidenció un aumento similar en las concentraciones de 50 y 75% respecto a la concentración de 25%, aumentando aproximadamente 2.25 y 2.68 veces, respectivamente. Por el contrario, la concentración de 100% de PPP para el mismo medio, presentó un aumento de alrededor de 5.54 veces con respecto a la concentración de 25%. Para las muestras de los medios MC y HSMC se obtuvo un comportamiento similar a los de HS; por ejemplo, la  $C_i$  obtenida en concentraciones de 50% en comparación a aquella obtenida en concentraciones de 25% de PPP, aumentó aproximadamente 2.53 veces para MC y 3.25 veces para HSMC.

**Figura 8**

*C<sub>i</sub> de PPP para los diferentes tiempos de inmovilización de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSCM*



Nota. A) Tiempo de inmovilización de 6 h, B) Tiempo de inmovilización de 12 h, C) Tiempo de inmovilización de 24 h, D) Muestras cultivadas en el medio HS para los diferentes

periodos de inmovilización, E) Muestras cultivadas en el medio MC para los diferentes periodos de inmovilización, F) Muestras cultivadas en el medio HSMC para los diferentes periodos de inmovilización. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  error estándar, y las diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) están representadas por los siguientes símbolos:

\* Cualquier concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio HS respecto a la misma concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio MC, # Cualquier concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio HS respecto a la misma concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio HSMC, \$ Concentración de PPP del 25, 50, 75 y 100% respecto a la concentración de PPP del 0% de las muestras cultivadas para cualquier medio, δ Cualquier concentración de PPP para un periodo de inmovilización de 6 h respecto a la misma concentración de PPP para un periodo de inmovilización de 24 h, φ Cualquier concentración de PPP para un periodo de inmovilización de 12 h respecto a la misma concentración de PPP para un periodo de inmovilización de 24 h, ω Concentración de PPP del 25, 50, 75 y 100% respecto a la concentración de PPP del 0% para todos los tiempos de inmovilización.

Las figuras 8D, 8E y 8F contienen los resultados del  $C_i$  de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC para los diferentes periodos de inmovilización. Respecto a la figura 8D, la cual representa los valores de  $C_i$  para el medio HS, se observó que la  $C_i$  obtenida en un tiempo de inmovilización de 24 h presentó un aumento significativo en la concentración de 100% de PPP con respecto a la concentración de 75%, aumentando 2.06 veces aproximadamente. Para las muestras obtenidas en el medio MC (figura 8E), se pudo observar que, a mayor tiempo de inmovilización, se obtuvo un valor mayor para la  $C_i$ ; de igual forma, para cualquier concentración de PPP se observó el valor más alto para  $C_i$  a un tiempo de inmovilización de 24 h. Particularmente, en concentraciones de 100% de PPP en un periodo de 24 h, se encontró un aumento de 4.75 veces mayor al de la concentración de

25% de PPP. Finalmente, para el medio HSMC (figura 8F), se evidenció que la  $C_i$  no presentó gran variabilidad a un tiempo de inmovilización de 12 h en comparación al tiempo de 6 h, independiente de la concentración de PPP. Sin embargo, en un periodo de inmovilización de 24 h, se observó un aumento aproximado de 1.65 veces en la concentración de 100% de PPP, respecto a la concentración de 75% para un tiempo de inmovilización de 6 h.

De manera general, los resultados obtenidos muestran que: i) las muestras obtenidas en el medio de cultivo HS presentaron un mayor valor de  $C_i$  en comparación a las obtenidas en MC y HSMC para todos los tiempos de inmovilización, ii) la  $C_i$  obtenida en las muestras de los medios MC y HSMC es similar, iii) a mayor tiempo de inmovilización, la  $C_i$  tiende a aumentar en la mayoría de las muestras obtenidas en los tres medios en estudio, y iv) no se presentan diferencias significativas de  $C_i$  entre los periodos de inmovilización de 6 y 12 h.

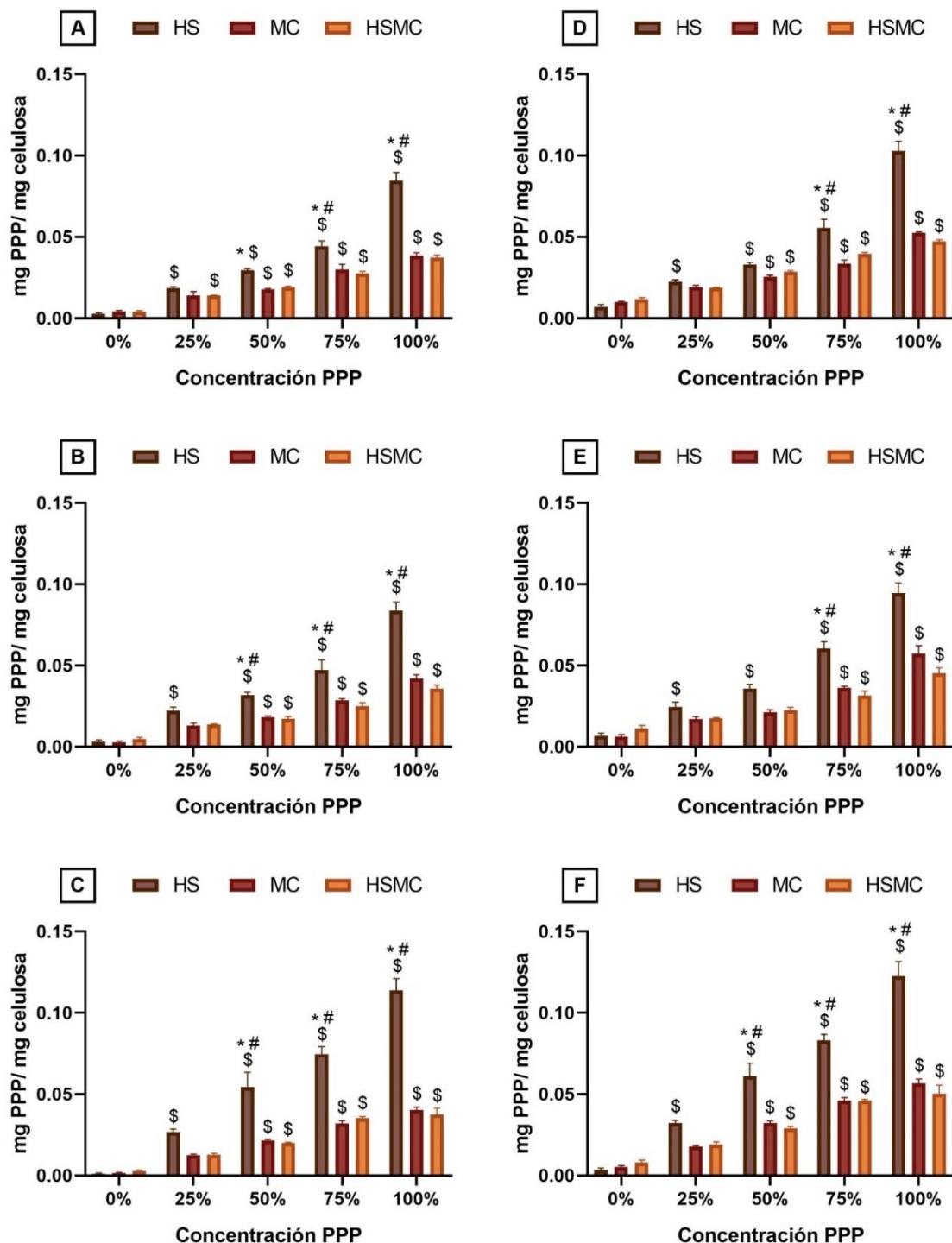
*Nota.* Los valores de p obtenidos al realizar el análisis estadístico por ANOVA de dos vías y la prueba Tukey se incluyen de forma detallada en las tablas anexas del documento (Figura 8A; Anexo 1, Figura 8B; Anexo 2, Figura 8C; 3, Figura 8D; Anexo 4, Figura 8E; Anexo 5, Figura 8F; Anexo 6).

### **Liberación de Factores de Crecimiento Inmovilizados en los Hidrogeles de CB**

Para evaluar la concentración total de los factores de crecimiento liberados por los hidrogeles de CB funcionalizados, se estimó el valor de la  $C_l$  de las distintas muestras después de 4 h y 48 h de liberación. La figura 9 contiene los resultados computados para las muestras obtenidas en cada uno de los medios (HS, MC y HSMC) cuando se i) inmoviliza PPP a concentraciones del 0, 25, 50, 75 y 100%, durante 6, 12 y 24 h, y ii) se exponen a un tiempo de liberación de 4 y 48 h.

**Figura 9**

C<sub>1</sub> de PPP de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSCM después de 4 h y 48 h de liberación



Nota. A) Tiempo de inmovilización de 6 h y 4 h de liberación, B) Tiempo de inmovilización de 12 h y 4 h de liberación, C) Tiempo de inmovilización de 24 h y 4 h de liberación, D)

Tiempo de inmovilización de 6 h y 48 h de liberación, E) Tiempo de inmovilización de 12 h y 48 h de liberación, F) Tiempo de inmovilización de 24 h y 48 h de liberación. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  error estándar, y las diferencias estadísticas están representadas por los siguientes símbolos: \* Cualquier concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio HS respecto a la misma concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio MC, # Cualquier concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio HS respecto a la misma concentración de PPP de muestras cultivadas en el medio HSMC, \$ Concentración de PPP del 25, 50, 75 y 100% respecto a la concentración de PPP del 0% de las muestras cultivadas para cualquier medio.

Los datos obtenidos para un periodo de inmovilización de 6 h y liberación de 4 h (Figura 9A), demostraron que, para las concentraciones de PPP de 25, 50, 75 y 100%, se obtuvo un valor mayor de la  $C_l$  en los hidrogeles obtenidos en el medio HS con respecto a los medios MC y HSMC. Específicamente, se evidenciaron valores de  $C_l$  aproximadamente de 1.33, 1.66, 1.48 y 2.19 veces mayor con relación al medio MC para el PPP al 25, 50, 75 y 100%, respectivamente, y de 1.33, 1.56, 1.61 y 2.27 veces mayor respecto a HSMC, para el PPP al 25, 50, 75 y 100%, respectivamente. Adicionalmente, se observó que, para las concentraciones de PPP de 50, 75 y 100% con respecto a la concentración de PPP del 25%, la  $C_l$  aumentó 1.59, 2.38 y 4.55 veces en HS, 1.28, 2.15 y 2.77 veces en MC y, 1.35, 1.96 y 2.66 veces en HSMC, respectivamente.

Para el caso de los hidrogeles de CB con un tiempo de liberación de 4 h y un tiempo de inmovilización de 12 h (Figura 9B) y 24 h (Figura 9C), se encontró un comportamiento similar al anterior; donde los datos para el medio HS demostraron ser más altos en comparación con los de los medios MC y HSMC, a partir de una concentración de PPP del 25%. En específico, las muestras obtenidas en el medio HS presentaron incrementos de hasta 3.8 y 4.3 veces mayor para el PPP al 100% con relación a la concentración de 25%, cuando

se inmoviliza durante 12 y 24 h, respectivamente. De igual forma, al comparar el tiempo de inmovilización de 12 h y 24 h para el medio HS, se encontró que la  $C_l$  para los de 24 h incrementó alrededor de 1.2, 1.71, 1.58 y 1.36 con respecto al de 12 h, para las concentraciones de PPP de 25, 50, 75 y 100%, respectivamente. Adicionalmente, no se encontraron diferencias significativas entre los hidrogeles de CB obtenidos en los medios de MC y HSMC.

Por otra parte, en las figuras 9D, 9E y 9F se reporta la  $C_l$  de las muestras después de 48 h de liberación para los diferentes tiempos de inmovilización (6, 12 y 24 h). Para todas las concentraciones de PPP se observó un valor similar y/o un aumento en los valores de la  $C_l$  respecto a los resultados del tiempo de liberación de 4 h (Figuras 9A, 9B y 9C).

En particular, para los hidrogeles inmovilizados por un periodo de 6 h (Figura 9D), el medio HS presentó valores de  $C_l$  mayores en comparación a los hidrogeles obtenidos en el medio MC y HSMC; sin embargo, es importante mencionar que la diferencia entre ellos es significativa a partir de una concentración de PPP del 75% (hasta 2.2 veces mayor), dado que a menor concentración de PPP ( $\leq 50\%$ ) la diferencia porcentual entre ellos no sobrepasó un 23%. Adicionalmente, se observó que, para las muestras de HS en las concentraciones de PPP de 50, 75 y 100%, la  $C_l$  incrementó aproximadamente 1.5, 2.5 y 4.6 veces en comparación a la concentración de 25% PPP, respectivamente. Respecto a los medios MC y HSCM, los resultados de  $C_l$  se encontraron similares para todas las concentraciones de PPP (0, 25, 50, 75 y 100%). En el caso de las muestras inmovilizadas durante 12 h (Figura 9E), el medio HS presentó incrementos significativos de alrededor de 1.7 y 2.1 veces respecto a los medios MC y HSMC, respectivamente, para la concentración de 100% PPP. Asimismo, se encontraron aumentos significativos de los valores  $C_l$  para las muestras de 50, 75 y 100% PPP vs la del PPP al 25%, en donde las muestras obtenidas en el medio HS para una

concentración de 100% PPP, presentaron los incrementos más altos (3.9 veces mayor) en comparación con los demás medios de cultivo.

Finalmente, los resultados para las muestras con periodo de inmovilización de 24 h (Figura 9F) indicaron que los datos obtenidos para el medio HS fueron significativamente diferentes en relación con los de MC y HSMC a partir de una concentración de 50% PPP. Es importante resaltar que, en todos los medios en estudio, la  $C_l$  incrementó al aumentar la concentración de PPP, hasta 3.8, 3.2 y 2.6 veces con respecto a la concentración de 25% PPP en el medio HS, MC y HSMC respectivamente. Sin embargo, al comparar los resultados de los cultivos MC y HSMC con los de HS, se observó una reducción en la  $C_l$  (hasta 2.2 veces menor en MC y 2.4 veces menor en HSMC) para las concentraciones de PPP de 25, 50, 75 y 100%.

En términos generales, estos resultados demostraron que: i) la  $C_l$  en cualquier medio de cultivo es directamente proporcional a la concentración de PPP, ii) a mayor periodo de inmovilización y liberación, la  $C_l$  aumenta para todas las muestras obtenidas en los tres medios en estudio, iii) en el medio HS se presenta mayor  $C_l$  en comparación con MC y HSMC, y iv) la  $C_l$  es similar en las muestras cultivadas en los medios MC y HSMC.

Con el fin de detallar los resultados obtenidos para el comportamiento de  $C_l$  después de 48 h de liberación, se incluye la figura 10, donde se reportan los valores para cada medio de cultivo y los diferentes porcentajes de PPP. Respecto al medio HS (Figura 10A), al comparar los valores de  $C_l$  para los tres tiempos de inmovilización entre las concentraciones de plasma de 25% y 100%, se encontró que la  $C_l$  incrementó 4.6, 3.87 y 3.78 veces en el PPP al 100% vs 25%, para los tiempos de inmovilización de 6, 12 y 24 h, respectivamente. Similarmente, para el medio MC (Figura 10B) se observó un incremento de la  $C_l$  de 2.7, 3.6 y 3.3 veces en el PPP 100% en comparación al de 25%, para los tiempos de inmovilización de 6, 12 y 24 h, respectivamente. Para el medio HSMC (Figura 10C), los valores de  $C_l$  se

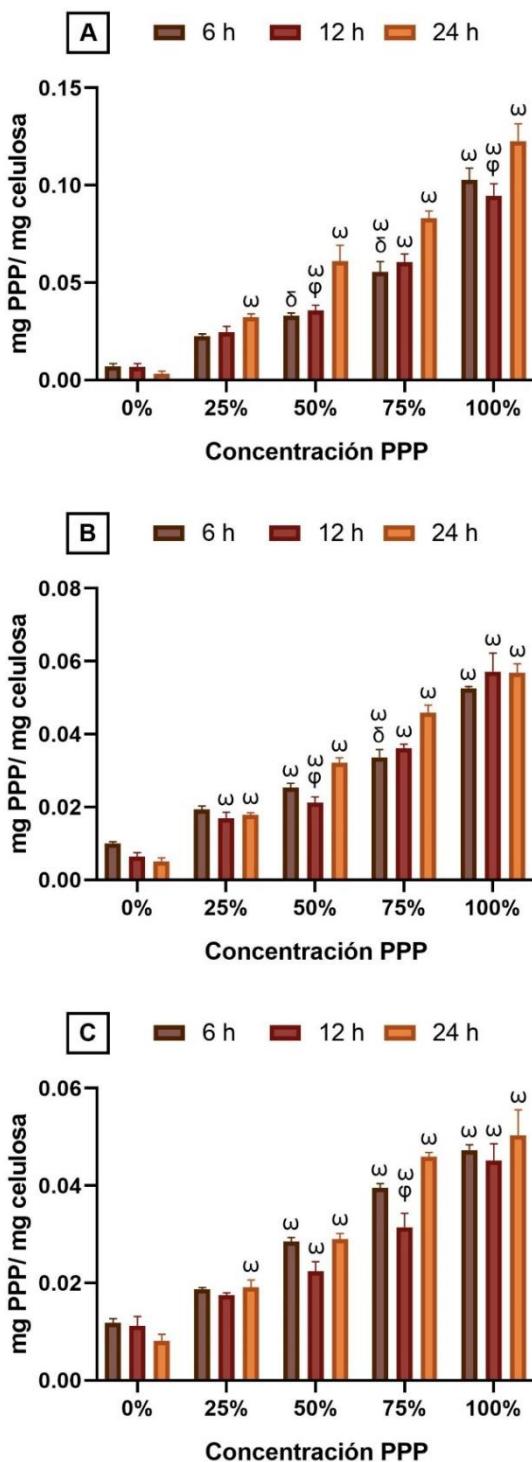
incrementaron aproximadamente 2.6 veces para los tres tiempos de inmovilización en el PPP al 100% vs el PPP al 25%.

Teniendo en cuenta los resultados descritos, es posible mencionar de manera general que: i) existe una relación directamente proporcional entre la  $C_1$  y la concentración de PPP, ii) no se encontraron diferencias significativas al comparar entre sí los valores de  $C_1$  para los tiempos de inmovilización de 6, 12 y 24 h de una misma concentración de PPP, iii) en todas las gráficas, al comparar los valores de la  $C_1$  para concentraciones de PPP del 25% con las del 100%, es posible establecer que el incremento de  $C_1$  es mayor para las muestras obtenidas en medio HS respecto a los medios MC y HSMC.

*Nota.* Los valores de p obtenidos al realizar el análisis estadístico por ANOVA de dos vías y la prueba Tukey se incluyen en las tablas anexas del documento (Figura 9A; Anexo 7, Figura 9B; Anexo 8, Figura 9C; Anexo 9, Figura 9D; Anexo 10, Figura 9E; Anexo 11, Figura 9F; Anexo 12; Figura 10A; Anexo 13, Figura 10B; Anexo 14, Figura 10C; Anexo 15).

**Figura 10**

*C<sub>t</sub> de PPP de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC después de 48 h de liberación*



Nota. A) Medio de cultivo HS, B) Medio de cultivo MC, C) Medio de cultivo HSMC. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  error estándar, y las diferencias estadísticas están

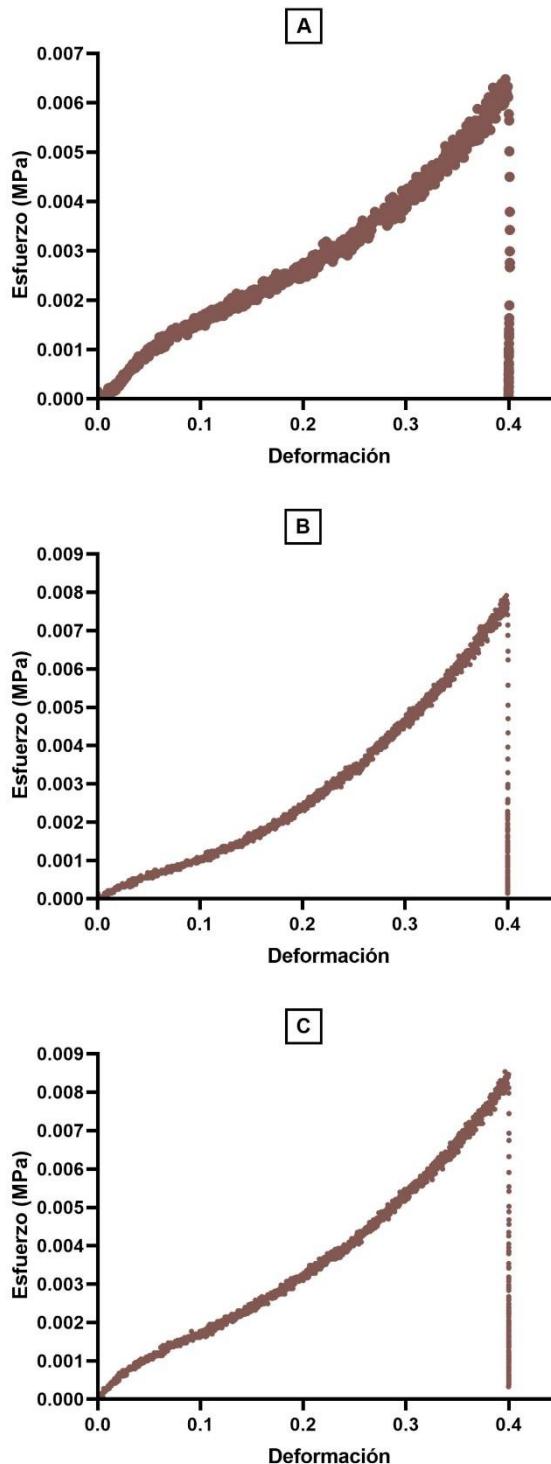
representadas por los siguientes símbolos:  $\delta$  cualquier concentración de PPP para un tiempo de inmovilización de 6 h respecto a la misma concentración de PPP para un tiempo de inmovilización de 24 h,  $\phi$  cualquier concentración de PPP para un tiempo de inmovilización de 12 h respecto a la misma concentración de PPP para un tiempo de inmovilización de 24 h,  $\omega$  concentración de PPP del 25, 50, 75 y 100% respecto a la concentración de PPP del 0% para todos los tiempos de inmovilización.

### **Caracterización Mecánica de los Hidrogeles de CB**

Con el fin de llevar a cabo la caracterización mecánica de los hidrogeles de CB funcionalizados con factores de crecimiento derivados de PPP, para cada una de las condiciones en estudio, se realizaron ensayos de compresión usando un  $n = 4$ . Para la ejecución de dichos ensayos, se obtuvo el diámetro y espesor de cada muestra y se comprimieron un 40% de su espesor inicial. Los datos resultantes se procesaron para determinar los valores de deformación y esfuerzo mediante las ecuaciones 3 y 4, y se realizaron las respectivas gráficas de esfuerzo vs deformación. En la figura 11 se reporta una gráfica representativa de las curvas esfuerzo vs deformación obtenidas para las muestras provenientes de los diferentes medios. A partir de este comportamiento, se determinó el módulo de compresión usando la parte lineal de la curva. Estos resultados se incluyen en la figura 12 para los hidrogeles obtenidos en los medios HS, MC y HSCM y las diferentes concentraciones de PPP (0, 25, 50, 75 y 100%), para los tres tiempos de inmovilización (6, 12 y 24 h). En particular, la figura 12A presenta los módulos de compresión de las muestras obtenidas en el medio HS, donde se observó que estos módulos se encuentran entre 0.27 y 0.82 MPa, 0.33 y 1.8 MPa, y 1.4 y 2.77 MPa, para los tiempos de inmovilización de 6, 12 y 24 h, respectivamente. En específico, las muestras del tiempo de 24 h presentaron módulos alrededor de 4.5 a 2.7 veces mayores a los módulos de las muestras con tiempos de inmovilización de 6 y 12 h, respectivamente. No obstante, no se encontraron diferencias significativas.

**Figura 11**

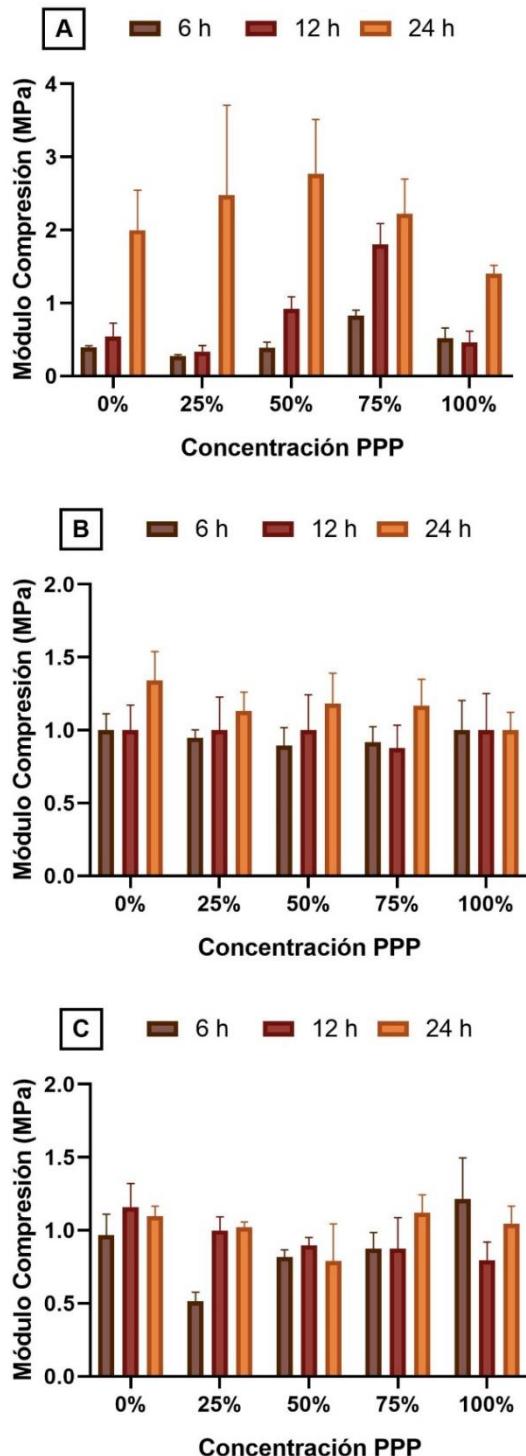
*Curva esfuerzo vs deformación de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC*



*Nota.* A) Medio de cultivo HS, B) Medio de cultivo MC, C) Medio de cultivo HSMC.

**Figura 12**

*Módulo de compresión de las muestras obtenidas en los medios HS, MC y HSMC para los diferentes tiempos de inmovilización*



Nota. A) Medio de cultivo HS, B) Medio de cultivo MC, C) Medio de cultivo HSMC. Los datos se reportan como el promedio  $\pm$  error estándar.

Respecto a la figura 12B, la cual corresponde a los valores del módulo de compresión de las muestras obtenidas en el medio MC, se encontró un comportamiento similar al comparar las diferentes concentraciones de PPP o los tiempos de inmovilización. Los rangos de los módulos de compresión corresponden a 0.89 - 1 MPa, 0.87 - 1 MPa y 1 - 1.18 MPa para los tiempos de inmovilización de 6, 12 y 24 h, respectivamente. Por el contrario, para el medio HSMC (Figura 12C), los rangos de los módulos de compresión se encontraron entre 0.51 MPa y 1.21 MPa, 0.79 - 1.15 MPa y 0.79 - 1.12 MPa, para los tiempos de inmovilización de 6, 12 y 24 h, respectivamente. No obstante, no se detectaron diferencias significativas entre los grupos de comparación debido a la variabilidad de los datos obtenidos para el módulo de compresión.

A partir de estos resultados, es posible mencionar de manera general que: i) los módulos de compresión para las muestras obtenidas en medio el HS y expuestas a un tiempo de inmovilización de 24 h, son más altos en comparación a las de períodos de 6 y 12 h de inmovilización; sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ii) los módulos de compresión para las muestras obtenidas en el medio MC presentaron valores similares al realizar comparaciones entre las concentraciones de PPP, o los tiempos de inmovilización, y iii) los módulos de compresión son similares para las muestras obtenidas en los medios MC y HSMC.

*Nota.* Los valores de p obtenidos al realizar el análisis estadístico por ANOVA de dos vías y la prueba Tukey, se adjuntan en las tablas anexas del documento (Figura 12A; Anexo 16, Figura 12B; Anexo 17, Figura 12C; Anexo 18).

## Análisis de Resultados

La fabricación de hidrogeles de CB funcionalizados con factores de crecimiento derivados de PPP representa un aporte significativo en el ámbito biomédico, puesto que, evaluar el comportamiento del biomaterial en relación con  $C_i$  y  $C_l$  de moléculas bioactivas, además de sus propiedades mecánicas, podría resaltar un interés en esta alternativa terapéutica para UCPD.

En el desarrollo de este proyecto, en cuanto a los resultados del proceso de inmovilización de factores de crecimiento derivados de PPP (Figura 8), se evidenció que mientras mayor fue el tiempo de exposición de los hidrogeles de CB en las soluciones con PPP, independiente del medio de cultivo, mayor fue la  $C_i$  obtenida. Este hallazgo coincide con lo encontrado por Dolganov et al. en 2021, quienes, al estudiar la inmovilización y características cinéticas de adsorción de iones de fluoruro en un hidrogel compuesto a base de CB modificada con una nanocapa de alúmina, reportaron que a medida que aumenta el tiempo de contacto entre el hidrogel y la solución de iones fluoruro a la que se expuso, se incrementa la  $C_i$  del hidrogel (Dolganov et al., 2021). Lo anterior permite establecer que la inmovilización de componentes en la estructura reticulada de los hidrogeles de CB, es directamente proporcional al tiempo de exposición a la solución que contiene la molécula de interés.

De igual forma, en los resultados del presente estudio se observó que, a mayor concentración de PPP, mayor es la  $C_i$  de las muestras, comportamiento que se atribuye al hecho de una mayor cantidad de moléculas presentes en las soluciones de elevada concentración de PPP a las que se exponen las muestras durante el tiempo de inmovilización. En cuanto a la  $C_i$  de los hidrogeles obtenidos en el medio de cultivo HS, se evidenció que son aquellos que presentan una mayor inmovilización de factores de crecimiento para cualquier concentración de PPP, en comparación a los hidrogeles obtenidos en los medios de cultivo

MC y HSMC. Esto podría atribuirse al hecho de que los hidrogeles obtenidos en el medio de cultivo HS presentaron un espesor significativamente menor, indicativo de una estructura microscópica menos compacta debido a una menor cantidad de capas de CB producidas y densidad de las fibras. Esta característica estructural de los hidrogeles de CB permite una mayor inmovilización de moléculas presentes en la solución a la cual son expuestos (Lazarini et al., 2016). La diferencia significativa en los espesores de los hidrogeles de CB, se debe a que el mucílago de café, rico en glucosa, permite una producción mayor de CB, llevando a un incremento en el número de capas, y densidad de las fibras al utilizar medios MC y HSMC, en comparación al medio HS (Pinto & Prada, 2021).

En cuanto a la liberación de factores de crecimiento de los hidrogeles de CB funcionalizados (Figura 9), los resultados demostraron que la  $C_l$  de los hidrogeles de CB cultivados en los diferentes medios (HS, MC y HSMC) presenta una relación directamente proporcional con la variación en el porcentaje de PPP, y aparentemente, con el tiempo de liberación de las muestras. Al considerar exponer las muestras a periodos de liberación más largos y con alta concentración de PPP (100%), como consecuencia, se obtendrá un incremento significativo en la liberación de los factores de crecimiento con respecto a menores porcentajes de concentración de PPP y tiempos de liberación más cortos. El comportamiento descrito previamente corresponde con lo reportado por Gupta et al. en 2019, quienes, al analizar la cinética de liberación de hidrogeles de CB cargados con curcumina encapsulada en ciclodextrinas, evidenciaron a lo largo de un período de 48 h una liberación de curcumina que incrementaba con el transcurrir del tiempo de manera exponencial (Gupta et al., 2019). También es fundamental aludir que, al comparar la  $C_l$  entre los hidrogeles obtenidos a partir de los diferentes medios de cultivos, estos presentaron diferencias significativas entre ellos, destacando así a las muestras obtenidas en el medio HS, como los hidrogeles de CB funcionalizados que liberan un mayor número de factores de crecimiento.

El comportamiento previamente descrito, se explica con la relación directamente proporcional existente entre la  $C_i$  y la  $C_l$  de las muestras, por ejemplo, las muestras expuestas a soluciones de PPP al 100%, son aquellas con una mayor  $C_i$ , consecuentemente también son aquellas que presentan una mayor  $C_l$ . En pocas palabras, al incrementarse la cantidad de factores inmovilizados, la cantidad de factores liberados también se incrementa.

Por otra parte, en la caracterización mecánica de los hidrogeles se obtuvieron valores del módulo de compresión que oscilan entre 0.27 y 2.77 MPa para muestras obtenidas en el medio HS. Este rango resulta relativamente amplio debido a la variabilidad de los resultados obtenidos en los ensayos de compresión, lo cual se puede explicar en relación con las dimensiones de las muestras, puesto que valores de espesores tan pequeños pueden generar limitaciones en el registro de datos por parte del equipo de banco de carga.

Para las muestras obtenidas en los medios MC y HSMC, se logró establecer que el PPP no modifica las propiedades mecánicas del biomaterial, por tanto, el módulo de compresión se mantiene después de llevar a cabo el proceso de inmovilización de factores de crecimiento. Los valores de módulo de compresión obtenidos se encuentran entre 0.89 y 1.18 MPa y 0.51 y 1.21 MPa para muestras obtenidas en los medios MC y HSMC, respectivamente. Al revisar la literatura, se encontró que en el año 2020, Oprea reportó valores del módulo de compresión para hidrogeles de CB en el rango de 0.02 - 0.08 MPa (Oprea et al., 2020), valores diferentes a los obtenidos en el presente estudio. Esta discrepancia podría deberse a la heterogeneidad del espesor de los hidrogeles de CB de los cuales se tomaron las muestras de estudio, además de los parámetros empleados para correr los ensayos de compresión. De igual manera, las propiedades mecánicas dependen significativamente de la cantidad de líquido contenido en las muestras, por lo tanto, puede ser un factor que de igual forma genere variabilidad en los resultados (Pogorelova et al., 2020). Respecto a la caracterización mecánica de la piel, en la literatura se reportan valores para el

módulo de compresión, obtenidos mediante ensayos de indentación in vitro, en el rango entre los 1.1 y 2.6 MPa (Isaza, 2019). Al comparar los valores anteriores, con los obtenidos en los ensayos de compresión del presente estudio (0.27 - 2.77 MPa), es posible afirmar que los módulos de compresión de las muestras cultivadas en los diferentes medios se encuentran contenidos parcialmente dentro del rango reportado en la literatura, sin embargo, algunos valores resultan inferiores a dicho rango de referencia. Lo anterior se traduce en un alto grado de similitud en cuanto al comportamiento mecánico de los hidrogeles de CB funcionalizados y el del tejido nativo (piel), cuando ambos son deformados por fuerzas compresivas.

Finalmente, después de realizar el análisis de los resultados obtenidos en el desarrollo del presente proyecto, es posible afirmar que los hidrogeles de CB resultan ser una buena alternativa para la fabricación de apóritos funcionalizados con moléculas bioactivas; particularmente, los hidrogeles producidos en medio de cultivo HS se destacan por su óptimo comportamiento de inmovilización y liberación de factores de crecimiento derivados de PPP, lo cual resulta benéfico en la promoción del proceso de cicatrización de las UCPD. De igual forma los hidrogeles cuentan con módulos de compresión bastante similares a los del tejido nativo, lo que permite un adecuado comportamiento mecánico del apórito en un escenario in vivo.

## Capítulo 6. Conclusiones y Recomendaciones

En el presente estudio, se llevó a cabo la fabricación de hidrogeles de CB funcionalizados con factores de crecimiento derivados de PPP, variando el tiempo de inmovilización (6,12 y 24 h) y la concentración de PPP (0,25,50,75 y 100%). De acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció una relación directamente proporcional entre la  $C_i$  de las muestras estudiadas con respecto a la concentración de PPP y el tiempo de inmovilización de factores de crecimiento. Asimismo, el comportamiento descrito previamente corresponde con lo observado para la  $C_l$  de los hidrogeles de CB funcionalizados. En contraste a lo anterior, se determinó una dependencia entre la  $C_i$  y la  $C_l$ , las cuales presentan una relación directamente proporcional que conduce a que los hidrogeles de CB con una mayor  $C_i$ , consecuentemente presenten una mayor  $C_l$ . Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, es destacable el comportamiento de inmovilización y liberación de las muestras obtenidas en el medio HS, comportamiento debido al espesor particular y densidad de las fibras de dichos hidrogeles de CB, en comparación a las muestras de estudio cultivadas en medios MC y HSMC. La caracterización mecánica a través de pruebas de compresión permitió establecer un buen nivel de similitud de los hidrogeles funcionalizados respecto al comportamiento mecánico del tejido nativo con base a los valores de módulo de compresión hallados (0.27-2.77 MPa). Por tanto, se ratifica la posibilidad de implementar a futuro hidrogeles de CB funcionalizados con factores de crecimiento derivados de PPP como potencial tratamiento para las UCPD, tomando como criterio el comportamiento asociado a la inmovilización y liberación de moléculas bioactivas benéficas en el proceso de cicatrización de heridas y la similitud del comportamiento mecánico encontrado en comparación con el tejido nativo.

Finalmente, se recomienda ampliar el número de muestras evaluadas con el fin de reducir la variabilidad de los resultados y así obtener datos estadísticos más significativos.

## Referencias

- ABS Bimedica. (s.f.). *Todo lo que tienes que saber sobre la piel.*  
<https://abs.bimedica.com/cuidado-corporal/todo-lo-que-tienes-que-saber-sobre-la-piel/>
- Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2020). Chitosan and Cellulose-Based Hydrogels for Wound Management. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 9656,* 21(24), 9656. <https://doi.org/10.3390/IJMS21249656>
- Amisten, S., Neville, M., Hawkes, R., Persaud, S. J., Karpe, F., & Salehi, A. (2015). An atlas of G-protein coupled receptor expression and function in human subcutaneous adipose tissue. *Pharmacology & therapeutics, 146,* 61–93.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.007>
- Armstrong, D. G., Boulton, A. J. M., & Bus, S. A. (2017). Diabetic Foot Ulcers and Their Recurrence. *Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMra1615439,* 376(24), 2367–2375.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMRA1615439>
- Arroyo LD, & Burbaro JI. (2019). Diabetes y pie diabético: una problemática mundial abordada desde la fisioterapia. *Revista Colombiana de Endocrinología, Diabetes y Metabolismo, 6(3),* 199–208.
- Balin, A. K., & Pratt, L. (2002). Dilute povidone-iodine solutions inhibit human skin fibroblast growth. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al.], 28(3),* 210–214. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.2002.01161.x>
- Cáceres, M., Martínez, C., Martínez, J., & Smith, P. C. (2012). Effects of platelet-rich and - poor plasma on the reparative response of gingival fibroblasts. *Clinical Oral Implants Research, 23(9),* 1104–1111. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0501.2011.02274.X>
- Cacicedo, L. (2017). Desarrollo de sistemas de liberación controlada de agentes quimioterapéuticos en matrices de celulosa microbiana con aplicaciones biomédicas.

- Universidad Nacional De La Plata. Retrieved from  
[http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/64775/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/64775/Documento_completo.pdf?sequence=1)
- Carmichael S. W. (2014). The tangled web of Langer's lines. Clinical anatomy (New York, N.Y.), 27(2), 162–168. <https://doi.org/10.1002/ca.22278>
- Cargnin, M. A., de Souza, A. G., de Lima, G. F., Gasparin, B. C., Rosa, D., & Paulino, A. T. (2020). Pinus residue/pectin-based composite hydrogels for the immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase. International journal of biological macromolecules, 149, 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.280>
- Chellini, F., Tani, A., Zecchi-Orlandini, S., & Sassoli, C. (2019a). Influence of platelet-rich and platelet-poor plasma on endogenous mechanisms of skeletal muscle repair/regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030683>
- Chellini, F., Tani, A., Zecchi-Orlandini, S., & Sassoli, C. (2019b). Influence of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on Endogenous Mechanisms of Skeletal Muscle Repair/Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences 2019, Vol. 20, Page 683*, 20(3), 683. <https://doi.org/10.3390/IJMS20030683>
- Chen, Q. Y., Xiao, S. L., Shi, S. Q., & Cai, L. P. (2020). A One-Pot Synthesis and Characterization of Antibacterial Silver Nanoparticle-Cellulose Film. *Polymers*, 12(2), 440. <https://doi.org/10.3390/polym12020440>
- Cross, K. J., & Mustoe, T. A. (2003). Growth factors in wound healing. In *Surgical Clinics of North America* (Vol. 83, Issue 3, pp. 531–545). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(02\)00202-5](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(02)00202-5)
- Damour, O., Hua, S. Z., Lasne, F., Villain, M., Rousselle, P., & Collombel, C. (1992). Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and

- keratinocytes. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*, 18(6), 479–485. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(92\)90180-3](https://doi.org/10.1016/0305-4179(92)90180-3)
- Deuel, T. F., & Chang, Y. (2013). Growth Factors. *Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*, 291–308. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398358-9.00016-1>
- Diabetes - Organización Panamericana de la Salud*. (n.d.). Retrieved August 26, 2021, from <https://www.paho.org/es/temas/diabetes>
- Dolganov, A. V., Revin, V. D., Kostryukov, S. G., Revin, V. V., & Yang, G. (2021). Kinetic and Thermodynamic Characteristics of Fluoride Ions Adsorption from Solution onto the Aluminum Oxide Nanolayer of a Bacterial Cellulose-Based Composite Material. *Polymers*, 13(19), 3421. <https://doi.org/10.3390/polym13193421>
- Dutta, S. D., Patel, D. K., & Lim, K.-T. (n.d.). *Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering*. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0177-0>
- Elnashar, M. (2010). Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 1(1), 61-76. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2010.11008>
- El Mrabate, B., Udayakumar, M., Csiszár, E., Kristály, F., Leskó, M., Somlyai Sipos, L., Schabikowski, M., & Németh, Z. (2020). Development of bacterial cellulose-ZnO-MWCNT hybrid membranes: a study of structural and mechanical properties. *Royal Society open science*, 7(6), 200592. <https://doi.org/10.1098/rsos.200592>
- Escotto Sánchez, I., Miguel Rodríguez Trejo, J., Padilla Sánchez, L., & Rodríguez Ramírez, N. (2001). Factores de crecimiento en el tratamiento de úlceras en pacientes diabéticos. *Revista Mexicana de ANGIOLOGIA*, 29(3), 75–82.
- Fijul Kabir, S. M., Sikdar, P. P., Haque, · B, Rahman Bhuiyan, · M A, Ali, · A, & Islam, · M N. (2018). Cellulose-based hydrogel materials: chemistry, properties and their

- prospective applications. *Progress in Biomaterials*, 7, 153–174.  
<https://doi.org/10.1007/s40204-018-0095-0>
- Gallagher, A. J., Ní Annaidh, A., & Bruyère, K. (2012). Dynamic tensile properties of human skin. In IRCOBI Conference 2012, 12-14 September 2012, Dublin (Ireland). International Research Council on the Biomechanics of Injury.
- García Bello, L., Torales Salinas, J., Giménez, M. B., Flores, L. E., Gómez de Ruiz, N., & Centurión, O. A. (2016). The risk of those who care for risk: FIDRISK in healthcare personnel. *Revista Virtual de La Sociedad Paraguaya de Medicina Interna*, 3(2), 71–76.  
[https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03\(02\)71-076](https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2016.03(02)71-076)
- González de la Torre, Héctor, Mosquera Fernández, Abián, Quintana Lorenzo, M.<sup>a</sup> Luana, Perdomo Pérez, Estrella, & Quintana Montesdeoca, M.<sup>a</sup> del Pino. (2012). Classifications of injuries on diabetic foot: A non-solved problem. *Gerokomos*, 23(2), 75-87.  
<https://dx.doi.org/10.4321/S1134-928X2012000200006>
- Gupta, A., Briffa, S. M., Swingler, S., Gibson, H., Kannappan, V., Adamus, G., Kowalcuk, M., Martin, C., & Radecka, I. (2020). Synthesis of Silver Nanoparticles Using Curcumin-Cyclodextrins Loaded into Bacterial Cellulose-Based Hydrogels for Wound Dressing Applications. *Biomacromolecules*, 21(5), 1802–1811.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b01724>
- Gupta, A., Keddie, D.J., Kannappan, V., Khalil, I.R., Kowalcuk, M., Martin, C., Shuai, X., Radecka, I. (2019). Production and characterisation of bacterial cellulose hydrogels loaded with curcumin encapsulated in cyclodextrins as wound dressings. European Polymer Journal, 118(1), 437-450. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.06.018>
- Hilton, J. R., Williams, D. T., Beuker, B., Miller, D. R., & Harding, K. G. (2004). Wound Dressings in Diabetic Foot Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39(Supplement\_2), S100–S103. <https://doi.org/10.1086/383270>

- Isaza, J. N. (2019). Comportamiento mecánico de la piel en función del espesor de las capas que la componen [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional – Universidad Nacional de Colombia.
- Ji, K., Wang, W., Zeng, B., Chen, S., Zhao, Q., Chen, Y., Li, G., & Ma, T. (2016). Bacterial cellulose synthesis mechanism of facultative anaerobe Enterobacter sp. FY-07. *Scientific reports*, 6, 21863. <https://doi.org/10.1038/srep21863>
- Kalra, A., Lowe, A., and Al-Jumaily, AM (2016). Mechanical Behaviour of Skin: A Review. *Journal of Material Science & Engineering*. <https://doi.org/10.4172/2169-0022.1000254>
- Kantor, J., & Margolis, D. J. (2001). Treatment options for diabetic neuropathic foot ulcers: A cost-effectiveness analysis. *Dermatologic Surgery*, 27(4), 347–351. <https://doi.org/10.1046/j.1524-4725.2001.00280.x>
- Kim, J., Cai, Z., Lee, H. S., Choi, G. S., Lee, H. L., Jo, C.. (2011). Preparation and characterization of a Bacterial cellulose/Chitosan composite for potential biomedical application. *Journal of Polymer Research*, 18, 739-744. <https://doi.org/10.1007/s10965-010-9470-9>
- Krasteva, P. V., Bernal-Bayard, J., Travier, L., Martin, F. A., Kaminski, P. A., Karimova, G., Fronzes, R., & Ghigo, J. M. (2017). Insights into the structure and assembly of a bacterial cellulose secretion system. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01523-2>
- Lazarini, S. C., de Aquino, R., Amaral, A. C., Corbi, F. C. A., Corbi, P. P., Barud, H. S., & Lustri, W. R. (2015). Characterization of bilayer bacterial cellulose membranes with different fiber densities: a promising system for controlled release of the antibiotic ceftriaxone. *Cellulose*, 23(1), 737–748. doi:10.1007/s10570-015-0843-4
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2001). Hydrogels for tissue engineering. In *Chemical Reviews* (Vol. 101, Issue 7, pp. 1869–1879). American Chemical Society.

<https://doi.org/10.1021/cr000108x>

Lee, Y. H., Hong, Y. L., & Wu, T. L. (2021). Novel silver and nanoparticle-encapsulated growth factor co-loaded chitosan composite hydrogel with sustained antimicrobility and promoted biological properties for diabetic wound healing. *Materials Science and Engineering C*, 118, 111385. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111385>

Li, Z., Zhang, X., Yuan, T., Zhang, Y., Luo, C., Zhang, J., Liu, Y., & Fan, W. (2020). Addition of Platelet-Rich Plasma to Silk Fibroin Hydrogel Bioprinting for Cartilage Regeneration. *Https://Home.Liebertpub.Com/Tea*, 26(15–16), 886–895.

<https://doi.org/10.1089/TEN.TEA.2019.0304>

Loh, E. Y. X., Mohamad, N., Fauzi, M. B., Ng, M. H., Ng, S. F., & Mohd Amin, M. C. I. (2018). Development of a bacterial cellulose-based hydrogel cell carrier containing keratinocytes and fibroblasts for full-thickness wound healing. *Scientific Reports*, 8(1).

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-21174-7>

López, P., Director, J., López-Jaramillo, P., Calderón, C., Castillo, J., Darío Escobar, I., Melgarejo, E., & Parra, G. A. (2017). Prediabetes en Colombia: Consenso de expertos. *Colomb Med*, 48(4), 191–203. <https://doi.org/10.25100/cm.v48i4.3662>

Mikesh, LM, Aramadhaka, LR, Moskaluk, C., Zigrino, P., Mauch, C. y Fox, JW (2013). Anatomía proteómica de la piel humana. *Revista de proteómica*, 84, 190–200.

<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.019>

Moffatt, C., Flanagan, M., & Shuttleworth, A. (2004). POSITION Wound bed preparation in practice. *European Wound Management Association*.

O'Meara, S. M., Cullum, N. A., Majid, M., & Sheldon, T. A. (2001). Systematic review of antimicrobial agents used for chronic wounds. In *British Journal of Surgery* (Vol. 88, Issue 1, pp. 4–21). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2168.2001.01631.x>

Oprea, M., Panaitescu, D. M., Nicolae, C. A., Gabor, A. R., Frone, A. N., Raditoiu, V., ...

- Casarica, A. (2020). Nanocomposites from functionalized bacterial cellulose and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). *Polymer Degradation and Stability*, 109203. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2020.109203
- Paolini, J. E., Lamelza, V., Cohen, C., Giraldez, N., & Rabuffetti, M. (2006). *CONGRESO DEL BICENTENARIO – Parche plaquetario autólogo. Utilización en úlceras crónicas.* Fórum de Flebología y Linfología. <http://cacvyl.org/parche-plaquetario/>
- Pinto, M. C., & Prada, Y. (2021). Caracterización mecánica de hidrogeles derivados de celulosa bacteriana producida a partir de mucílago de café con potencial uso en el diseño de apósticos para úlcera por presión decúbito supino [Tesis de Pregrado, Universidad Autónoma de Bucaramanga]. Repositorio Institucional – Universidad Autónoma de Bucaramanga.
- Pogorelova, N., Rogachev, E., Digel, I., Chernigova, S., & Nardin, D. (2020). Bacterial Cellulose Nanocomposites: Morphology and Mechanical Properties. *Materials* (Basel, Switzerland), 13(12), 2849. <https://doi.org/10.3390/ma13122849>
- Portela, R., Leal, C. R., Almeida, P. L., & Sobral, R. G. (2019). Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 586. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>
- Pozo, N. O. (2019). *Síntesis Y Evaluación Cicatrizante De Un Apósito En Base A Un Hidrogel Con Propiedades De Liberación Sostenida De Compuestos Bioactivos.* Facultad de Ciencias de la Salud - Escuela de Tecnología médica - Talca.
- Ribeiro, J., Pereira, T., Amorim, I., Caseiro, A. R., Lopes, M. A., Lima, J., Gartner, A., Santos, J. D., Bártolo, P. J., Rodrigues, J. M., Mauricio, A. C., & Luís, A. L. (2014). Cell therapy with human MSCs isolated from the umbilical cord wharton jelly associated to a PVA membrane in the treatment of chronic skin wounds. *International Journal of Medical Sciences*, 11(10), 979–987. <https://doi.org/10.7150/IJMS.9139>

- Rodríguez Flores, J., Palomar Gallego, M. A., & Torres García-Denche, J. (2012). Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 34(1), 8–17. <https://doi.org/10.1016/J.MAXILO.2011.10.007>
- Ross, P., Mayer, R., & Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55(1), 35–58. <https://doi.org/10.1128/mr.55.1.35-58.1991>
- Ruiz, S. R. y Martínez, J. A. (2016). *Carbohidratos*. Portal Académico del CCH, UNAM. <https://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/quimica2/unidad2/carbohidratos>
- Saad Setta, H., Elshahat, A., Elsherbiny, K., Massoud, K., & Safe, I. (2011). Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: A comparative study. *International Wound Journal*, 8(3), 307–312. <https://doi.org/10.1111/J.1742-481X.2011.00797.X>
- Sangiovanni, S., Aguilar, J., & Asencio-santofimio, H. (2018). Epidemiología de diabetes mellitus tipo 2 en la población colombiana y factores de riesgo que predisponen a la amputación de miembros inferiores. Revisión de la literatura. *Salutem Scientia Spiritus*, 4(1), 49–56.
- Saulis, A. S., Lautenschlager, E. P., & Mustoe, T. A. (2002). Biomechanical and viscoelastic properties of skin, SMAS, and composite flaps as they pertain to rhytidectomy. *Plastic and reconstructive surgery*, 110(2), 590–600. <https://doi.org/10.1097/00006534-200208000-00035>
- Steed, D. L., Goslen, J. B., Holloway, G. A., Malone, J. M., Bunt, T. J., & Webster, M. W. (1992). Randomized prospective double-blind trial in healing chronic diabetic foot ulcers: CT-102 activated platelet supernatant, topical versus placebo. *Diabetes Care*, 15(11), 1598–1604. <https://doi.org/10.2337/diacare.15.11.1598>
- Stoica, A. E., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2020). Hydrogel dressings for the

- treatment of burn wounds: An up-to-date overview. In *Materials* (Vol. 13, Issue 12, pp. 1–24). Materials (Basel). <https://doi.org/10.3390/ma13122853>
- Vasconcelos, N. F., Cunha, A. P., Ricardo, N. M. P. S., Freire, R. S., Vieira, L. de A. P., Brígida, A. I. S., Borges, M. de F., Rosa, M. de F., Vieira, R. S., & Andrade, F. K. (2020). Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165(Pt B), 3065–3077.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.200>
- Westby, M. J., Dumville, J. C., Soares, M. O., Stubbs, N., & Norman, G. (2017). Dressings and topical agents for treating pressure ulcers. In *Cochrane Database of Systematic Reviews* (Vol. 2017, Issue 6). Cochrane Database Syst Rev.  
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD011947.pub2>
- Woeppel, K. M., Zheng, X. S., & Cui, X. T. (2018). Enhancing surface immobilization of bioactive molecules via a silica nanoparticle based coating. *Journal of Materials Chemistry. B*, 6(19), 3058. <https://doi.org/10.1039/C8TB00408K>
- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J. C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental dermatology*, 25(2), 92–98.  
<https://doi.org/10.1111/exd.12832>
- Woo, S. H., Kim, J. P., Park, J. J., Chung, P. S., Lee, S. H., & Jeong, H. S. (2013). Autologous platelet-poor plasma gel for injection laryngoplasty. *Yonsei medical journal*, 54(6), 1516–1523. <https://doi.org/10.3349/ymj.2013.54.6.1516>
- Zhang, H., Luo, X., Tang, H., Zheng, M., & Huang, F. (2017). A novel candidate for wound dressing: Transparent porous maghemite/cellulose nanocomposite membranes with controlled release of doxorubicin from a simple approach. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 79, 84–92.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.019>

Zhang, J., Zhang, J., Zhang, N., Li, T., Zhou, X., Jia, J., Liang, Y., Sun, X., & Chen, H.

(2020). The Effects of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on Biological

Characteristics of BM-MSCs in Vitro. *Analytical Cellular Pathology*, 2020.

<https://doi.org/10.1155/2020/8546231>

Zhang, Y. Q., Tao, M. L., Shen, W. D., Zhou, Y. Z., Ding, Y., Ma, Y., & Zhou, W. L. (2004).

Immobilization of L-asparaginase on the microparticles of the natural silk sericin protein

and its characters. *Biomaterials*, 25(17), 3751–3759.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.019>

Zhao, Y., Li, Z., Li, Q., Yang, L., Liu, H., Yan, R., Xiao, L., Liu, H., Wang, J., Yang, B., &

Lin, Q. (2020). Transparent Conductive Supramolecular Hydrogels with Stimuli-

Responsive Properties for On-Demand Dissolvable Diabetic Foot Wound Dressings.

*Macromolecular Rapid Communications*, 41(24), 2000441.

<https://doi.org/10.1002/marc.202000441>

Zmejkoski, D., Spasojević, D., Orlovska, I., Kozyrovska, N., Soković, M., Glamočlija, J.,

Dmitrović, S., Matović, B., Tasić, N., Maksimović, V., Sosnin, M., & Radotić, K.

(2018). Bacterial cellulose-lignin composite hydrogel as a promising agent in chronic

wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 494–503.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.067>

Żur, J., Wojcieszyska, D., & Guzik, U. (2016). Metabolic Responses of Bacterial Cells to

Immobilization. *Molecules*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21070958>

## Anexos

### Anexo 1

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza por un periodo de 6 h*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	-0.0011	-0.0194 to 0.0173	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0020	-0.0204 to 0.0164	No	>0.9999
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0222	-0.0406 to -0.0038	Si	0.0064
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0100	-0.0284 to 0.0083	No	0.8069
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0087	-0.0271 to 0.0097	No	0.9202
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0487	-0.0671 to -0.0304	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0285	-0.0469 to -0.0102	Si	0.0001
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0227	-0.041 to -0.0043	Si	0.0048
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0928	-0.1126 to -0.0729	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0453	-0.0636 to -0.0269	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0421	-0.0604 to -0.0237	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.1111	-0.1309 to -0.0913	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0611	-0.0795 to -0.0427	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0495	-0.0678 to -0.0311	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0010	-0.0193 to 0.0174	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0211	-0.0395 to -0.0027	Si	0.0118
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0090	-0.0273 to 0.0094	No	0.9028
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0076	-0.026 to 0.0107	No	0.9704
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0477	-0.066 to -0.0293	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0275	-0.0458 to -0.0091	Si	0.0003
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0216	-0.04 to -0.0032	Si	0.009
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0917	-0.1116 to -0.0719	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0442	-0.0626 to -0.0258	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0410	-0.0594 to -0.0226	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.1100	-0.1299 to -0.0902	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0600	-0.0784 to -0.0417	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0484	-0.0668 to -0.03	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0202	-0.0385 to -0.0018	Si	0.0199
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0080	-0.0264 to 0.0104	No	0.9566
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0067	-0.0251 to 0.0117	No	0.9907
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0467	-0.0651 to -0.0284	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0265	-0.0449 to -0.0081	Si	0.0005
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0207	-0.039 to -0.0023	Si	0.0152
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0908	-0.1106 to -0.0709	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0432	-0.0616 to -0.0249	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0400	-0.0584 to -0.0217	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1091	-0.1289 to -0.0892	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0591	-0.0775 to -0.0407	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0474	-0.0658 to -0.0291	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0121	-0.0062 to 0.0305	No	0.5447
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0135	-0.0049 to 0.0318	No	0.3765
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0266	-0.0449 to -0.0082	Si	0.0005
25%:HS vs. 50%:MC	-0.0064	-0.0247 to 0.012	No	0.9942
25%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0005	-0.0189 to 0.0179	No	>0.9999
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0706	-0.0905 to -0.0508	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0231	-0.0414 to -0.0047	Si	0.0038
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0199	-0.0383 to -0.0015	Si	0.0231
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0889	-0.1088 to -0.0691	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0389	-0.0573 to -0.0206	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0273	-0.0456 to -0.0089	Si	0.0003
25%:MC vs. 25%:HSMC	0.0013	-0.017 to 0.0197	No	>0.9999
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0387	-0.0571 to -0.0203	Si	<0.0001
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0185	-0.0369 to -0.0001	Si	0.0471
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0126	-0.031 to 0.0057	No	0.4799
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0828	-0.1026 to -0.0629	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0352	-0.0536 to -0.0168	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0320	-0.0504 to -0.0137	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HS	-0.1010	-0.1209 to -0.0812	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0511	-0.0694 to -0.0327	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0394	-0.0578 to -0.021	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0400	-0.0584 to -0.0217	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0198	-0.0382 to -0.0015	Si	0.0238
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0140	-0.0323 to 0.0044	No	0.321
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0841	-0.1039 to -0.0642	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0365	-0.0549 to -0.0182	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0334	-0.0517 to -0.015	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1024	-0.1222 to -0.0825	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0524	-0.0708 to -0.034	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0407	-0.0591 to -0.0224	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0202	0.0018 to 0.0386	Si	0.0193
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0261	0.0077 to 0.0444	Si	0.0006
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0440	-0.0639 to -0.0242	Si	<0.0001
50%:HS vs. 75%:MC	0.0035	-0.0149 to 0.0219	No	>0.9999
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0067	-0.0117 to 0.0251	No	0.9907
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0624	-0.0822 to -0.0425	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	-0.0124	-0.0307 to 0.006	No	0.5158
50%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0007	-0.0191 to 0.0177	No	>0.9999
50%:MC vs. 50%:HSMC	0.0059	-0.0125 to 0.0242	No	0.9974

50%:MC vs. 75%:HS	-0.0643	-0.0841 to -0.0444	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0167	-0.0351 to 0.0017	No	0.1089
50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0135	-0.0319 to 0.0048	No	0.3698
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0826	-0.1024 to -0.0627	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0326	-0.0509 to -0.0142	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0209	-0.0393 to -0.0025	Si	0.0131
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0701	-0.09 to -0.0503	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0226	-0.041 to -0.0042	Si	0.0051
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0194	-0.0378 to -0.001	Si	0.0299
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0884	-0.1083 to -0.0686	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0384	-0.0568 to -0.0201	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0268	-0.0452 to -0.0084	Si	0.0004
75%:HS vs. 75%:MC	0.0475	0.0277 to 0.0674	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0507	0.0309 to 0.0706	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0183	-0.0395 to 0.0029	No	0.1579
75%:HS vs. 100%:MC	0.0317	0.0118 to 0.0515	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0433	0.0235 to 0.0632	Si	<0.0001
75%:MC vs. 75%:HSMC	0.0032	-0.0152 to 0.0216	No	>0.9999
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0658	-0.0857 to -0.046	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0159	-0.0342 to 0.0025	No	0.1578
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0042	-0.0226 to 0.0142	No	>0.9999
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0690	-0.0889 to -0.0492	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0190	-0.0374 to -0.0007	Si	0.0356
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0074	-0.0258 to 0.011	No	0.9774
100%:HS vs. 100%:MC	0.0500	0.0302 to 0.0698	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0616	0.0418 to 0.0815	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0117	-0.0067 to 0.03	No	0.6095

## Anexo 2

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza por un periodo de 12 h*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	-0.0012	-0.0191 to 0.0167	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0021	-0.02 to 0.0158	No	>0.9999
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0278	-0.0457 to -0.0099	Si	0.0002
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0074	-0.0252 to 0.0105	No	0.9706
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0118	-0.0296 to 0.0061	No	0.5395
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0591	-0.0784 to -0.0398	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0259	-0.0438 to -0.0081	Si	0.0005
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0323	-0.0516 to -0.013	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0855	-0.1048 to -0.0662	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0391	-0.057 to -0.0213	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0362	-0.0555 to -0.0169	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.1120	-0.1313 to -0.0927	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0449	-0.0642 to -0.0256	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0417	-0.0596 to -0.0238	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0009	-0.0188 to 0.017	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0266	-0.0444 to -0.0087	Si	0.0003
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0061	-0.024 to 0.0117	No	0.9941
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0106	-0.0284 to 0.0073	No	0.7031
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0578	-0.0771 to -0.0385	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0247	-0.0426 to -0.0068	Si	0.001
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0311	-0.0504 to -0.0118	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0842	-0.1035 to -0.0649	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0379	-0.0558 to -0.02	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0350	-0.0543 to -0.0157	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.1108	-0.1301 to -0.0915	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0437	-0.063 to -0.0244	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0405	-0.0584 to -0.0226	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0257	-0.0435 to -0.0078	Si	0.0006
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0053	-0.0231 to 0.0126	No	0.9988
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0097	-0.0275 to 0.0082	No	0.8087
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0570	-0.0763 to -0.0377	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0238	-0.0417 to -0.006	Si	0.0018
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0302	-0.0495 to -0.0109	Si	0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0834	-0.1027 to -0.0641	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0370	-0.0549 to -0.0191	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0341	-0.0534 to -0.0148	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1099	-0.1292 to -0.0906	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0428	-0.0621 to -0.0235	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0396	-0.0575 to -0.0217	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0204	0.0026 to 0.0383	Si	0.0129
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0160	-0.0019 to 0.0339	No	0.1207
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0313	-0.0506 to -0.012	Si	<0.0001
25%:HS vs. 50%:MC	0.0019	-0.016 to 0.0197	No	>0.9999
25%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0045	-0.0238 to 0.0148	No	0.9999
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0577	-0.077 to -0.0384	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0113	-0.0292 to 0.0065	No	0.6012
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0084	-0.0277 to 0.0109	No	0.9526
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0842	-0.1035 to -0.0649	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0171	-0.0364 to 0.0022	No	0.1306
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0139	-0.0318 to 0.0039	No	0.2791
25%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0044	-0.0223 to 0.0134	No	0.9998
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0517	-0.071 to -0.0324	Si	<0.0001
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0186	-0.0364 to -0.0007	Si	0.0351
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0250	-0.0443 to -0.0057	Si	0.0027
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0781	-0.0974 to -0.0588	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0318	-0.0496 to -0.0139	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0289	-0.0482 to -0.0096	Si	0.0003
25%:MC vs. 100%:HS	-0.1046	-0.1239 to -0.0854	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0375	-0.0568 to -0.0182	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0344	-0.0522 to -0.0165	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0473	-0.0666 to -0.028	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0141	-0.032 to 0.0037	No	0.2583
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0206	-0.0398 to -0.0013	Si	0.0275
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0737	-0.093 to -0.0544	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0273	-0.0452 to -0.0095	Si	0.0002
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0245	-0.0437 to -0.0052	Si	0.0036
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1002	-0.1195 to -0.0809	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0331	-0.0524 to -0.0138	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0299	-0.0478 to -0.0121	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0331	0.0138 to 0.0524	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0267	0.0061 to 0.0474	Si	0.0027
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0264	-0.047 to -0.0058	Si	0.0031
50%:HS vs. 75%:MC	0.0199	0.0006 to 0.0392	Si	0.0368
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0228	0.0022 to 0.0435	Si	0.0184
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0530	-0.0736 to -0.0323	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	0.0142	-0.0064 to 0.0348	No	0.4723
50%:HS vs. 100%:HSMC	0.0174	-0.0019 to 0.0366	No	0.1176
50%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0064	-0.0257 to 0.0129	No	0.9957
50%:MC vs. 75%:HS	-0.0595	-0.0788 to -0.0403	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0132	-0.0311 to 0.0047	No	0.3586

50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0103	-0.0296 to 0.009	No	0.8228
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0861	-0.1054 to -0.0668	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0190	-0.0383 to 0.0003	No	0.0585
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0158	-0.0337 to 0.0021	No	0.1325
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0531	-0.0738 to -0.0325	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0068	-0.0261 to 0.0125	No	0.9927
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0039	-0.0245 to 0.0167	No	>0.9999
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0797	-0.1003 to -0.0591	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0125	-0.0332 to 0.0081	No	0.6638
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0094	-0.0287 to 0.0099	No	0.9006
75%:HS vs. 75%:MC	0.0464	0.0271 to 0.0656	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0492	0.0286 to 0.0699	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0265	-0.0472 to -0.0059	Si	0.0029
75%:HS vs. 100%:MC	0.0406	0.02 to 0.0612	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0438	0.0245 to 0.0631	Si	<0.0001
75%:MC vs. 75%:HSMC	0.0029	-0.0164 to 0.0222	No	>0.9999
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0729	-0.0922 to -0.0536	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0058	-0.0251 to 0.0135	No	0.9985
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0026	-0.0205 to 0.0153	No	>0.9999
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0758	-0.0964 to -0.0552	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0086	-0.0293 to 0.012	No	0.9662
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0055	-0.0248 to 0.0138	No	0.9991
100%:HS vs. 100%:MC	0.0671	0.0465 to 0.0878	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0703	0.051 to 0.0896	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0032	-0.0161 to 0.0225	No	>0.9999

### Anexo 3

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza por un periodo de 24 h*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	0.0009	-0.018 to 0.0198	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0002	-0.0191 to 0.0187	No	>0.9999
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0346	-0.0535 to -0.0157	Si	<0.0001
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0116	-0.0305 to 0.0074	No	0.6622
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0067	-0.0256 to 0.0122	No	0.9924
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0812	-0.1016 to -0.0608	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0334	-0.0523 to -0.0145	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0279	-0.0468 to -0.009	Si	0.0004
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0973	-0.1162 to -0.0784	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0473	-0.0662 to -0.0284	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0418	-0.0607 to -0.0229	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.2037	-0.2242 to -0.1833	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0650	-0.0854 to -0.0445	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0708	-0.0913 to -0.0504	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0011	-0.02 to 0.0178	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0355	-0.0544 to -0.0166	Si	<0.0001
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0124	-0.0314 to 0.0065	No	0.5495
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0076	-0.0265 to 0.0113	No	0.9772
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0821	-0.1025 to -0.0616	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0343	-0.0532 to -0.0154	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0288	-0.0477 to -0.0099	Si	0.0002
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0982	-0.1171 to -0.0793	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0482	-0.0671 to -0.0293	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0427	-0.0616 to -0.0238	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.2046	-0.2251 to -0.1842	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0659	-0.0863 to -0.0454	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0717	-0.0921 to -0.0513	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0344	-0.0533 to -0.0155	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0114	-0.0303 to 0.0076	No	0.6869
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0065	-0.0254 to 0.0124	No	0.9942
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0810	-0.1014 to -0.0606	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0332	-0.0521 to -0.0143	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0277	-0.0466 to -0.0088	Si	0.0004
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0971	-0.116 to -0.0782	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0471	-0.066 to -0.0282	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0416	-0.0605 to -0.0227	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.2035	-0.224 to -0.1831	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0648	-0.0852 to -0.0443	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0706	-0.0911 to -0.0502	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0230	0.0041 to 0.042	Si	0.0059
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0279	0.009 to 0.0468	Si	0.0004
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0466	-0.067 to -0.0262	Si	<0.0001
25%:HS vs. 50%:MC	0.0012	-0.0178 to 0.0201	No	>0.9999
25%:HS vs. 50%:HSMC	0.0067	-0.0122 to 0.0256	No	0.9925
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0627	-0.0816 to -0.0438	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0127	-0.0316 to 0.0062	No	0.5124
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0072	-0.0261 to 0.0117	No	0.9851
25%:HS vs. 100%:HS	-0.1692	-0.1896 to -0.1487	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0304	-0.0508 to -0.0099	Si	0.0003
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0362	-0.0567 to -0.0158	Si	<0.0001
25%:MC vs. 25%:HSMC	0.0048	-0.0141 to 0.0238	No	0.9997
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0696	-0.0901 to -0.0492	Si	<0.0001
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0219	-0.0408 to -0.003	Si	0.0111
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0163	-0.0353 to 0.0026	No	0.1554
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0857	-0.1047 to -0.0668	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0358	-0.0547 to -0.0169	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0303	-0.0492 to -0.0114	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HS	-0.1922	-0.2126 to -0.1718	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0534	-0.0739 to -0.033	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0593	-0.0797 to -0.0388	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0745	-0.0949 to -0.054	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0267	-0.0456 to -0.0078	Si	0.0007
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0212	-0.0401 to -0.0023	Si	0.016
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0906	-0.1095 to -0.0717	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0406	-0.0595 to -0.0217	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0351	-0.054 to -0.0162	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1970	-0.2175 to -0.1766	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0583	-0.0787 to -0.0378	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0641	-0.0845 to -0.0437	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0478	0.0273 to 0.0682	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0533	0.0329 to 0.0737	Si	<0.0001
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0161	-0.0365 to 0.0043	No	0.2658
50%:HS vs. 75%:MC	0.0339	0.0134 to 0.0543	Si	<0.0001
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0394	0.0189 to 0.0598	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:HS	-0.1226	-0.1444 to -0.1007	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	0.0162	-0.0056 to 0.0381	No	0.3539
50%:HS vs. 100%:HSMC	0.0104	-0.0115 to 0.0322	No	0.9177
50%:MC vs. 50%:HSMC	0.0055	-0.0134 to 0.0245	No	0.9989
50%:MC vs. 75%:HS	-0.0639	-0.0828 to -0.045	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0139	-0.0328 to 0.005	No	0.3711

50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0084	-0.0273 to 0.0105	No	0.9493
50%:MC vs. 100%:HS	-0.1703	-0.1908 to -0.1499	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0315	-0.052 to -0.0111	Si	0.0002
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0374	-0.0578 to -0.017	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0694	-0.0883 to -0.0505	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0194	-0.0383 to -0.0005	Si	0.0392
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0139	-0.0328 to 0.005	No	0.3671
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1759	-0.1963 to -0.1554	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0371	-0.0575 to -0.0166	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0429	-0.0634 to -0.0225	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:MC	0.0500	0.0311 to 0.0689	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0555	0.0366 to 0.0744	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.1065	-0.1269 to -0.086	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:MC	0.0323	0.0119 to 0.0528	Si	0.0001
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0265	0.006 to 0.0469	Si	0.0026
75%:MC vs. 75%:HSMC	0.0055	-0.0134 to 0.0244	No	0.999
75%:MC vs. 100%:HS	-0.1564	-0.1769 to -0.136	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0177	-0.0381 to 0.0028	No	0.1554
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0235	-0.0439 to -0.0031	Si	0.0118
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1619	-0.1824 to -0.1415	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0232	-0.0436 to -0.0027	Si	0.014
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0290	-0.0494 to -0.0086	Si	0.0007
100%:HS vs. 100%:MC	0.1388	0.1169 to 0.1606	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.1329	0.1111 to 0.1548	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0058	-0.0277 to 0.016	No	0.9996

#### Anexo 4

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HS para los diferentes tiempos de inmovilización*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	-0.0003	-0.0259 to 0.0253	No	>0.9999
0%:6 H vs. 0%:24 H	-0.0023	-0.0279 to 0.0233	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:6 H	-0.0222	-0.0478 to 0.0034	No	0.1509
0%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0281	-0.0537 to -0.0025	Si	0.0203
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0369	-0.0625 to -0.0113	Si	0.0006
0%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0487	-0.0743 to -0.0232	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0594	-0.087 to -0.0317	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0835	-0.1112 to -0.0559	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0928	-0.1204 to -0.0651	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0858	-0.1134 to -0.0581	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0996	-0.1252 to -0.074	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.1111	-0.1387 to -0.0834	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:12 H	-0.1123	-0.14 to -0.0847	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:24 H	-0.2061	-0.2337 to -0.1784	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 0%:24 H	-0.0020	-0.0276 to 0.0236	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:6 H	-0.0219	-0.0475 to 0.0037	No	0.1651
0%:12 H vs. 25%:12 H	-0.0278	-0.0534 to -0.0022	Si	0.0227
0%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0366	-0.0622 to -0.011	Si	0.0006
0%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0484	-0.074 to -0.0228	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0591	-0.0867 to -0.0314	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0832	-0.1109 to -0.0556	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0925	-0.1201 to -0.0648	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0855	-0.1131 to -0.0578	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0993	-0.1249 to -0.0737	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:6 H	-0.1108	-0.1384 to -0.0831	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:12 H	-0.1120	-0.1396 to -0.0844	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:24 H	-0.2058	-0.2334 to -0.1781	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 25%:6 H	-0.0198	-0.0454 to 0.0058	No	0.2856
0%:24 H vs. 25%:12 H	-0.0258	-0.0514 to -0.0002	Si	0.0474
0%:24 H vs. 25%:24 H	-0.0346	-0.0602 to -0.009	Si	0.0015
0%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0464	-0.072 to -0.0208	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0570	-0.0847 to -0.0294	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0812	-0.1088 to -0.0535	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0905	-0.1181 to -0.0628	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0834	-0.1111 to -0.0558	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0973	-0.1229 to -0.0717	Si	<0.0001

0%:24 H vs. 100%:6 H	-0.1088	-0.1364 to -0.0811	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:12 H	-0.1100	-0.1376 to -0.0823	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:24 H	-0.2037	-0.2314 to -0.1761	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0059	-0.0315 to 0.0197	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0148	-0.0404 to 0.0109	No	0.7345
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0266	-0.0522 to -0.001	Si	0.0355
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0372	-0.0648 to -0.0095	Si	0.0016
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0613	-0.089 to -0.0337	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0706	-0.0983 to -0.043	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0636	-0.0912 to -0.0359	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0775	-0.103 to -0.0519	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0889	-0.1166 to -0.0613	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0901	-0.1178 to -0.0625	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.1839	-0.2116 to -0.1563	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0088	-0.0344 to 0.0168	No	0.9936
25%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0207	-0.0463 to 0.0049	No	0.2316
25%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0313	-0.0589 to -0.0036	Si	0.0146
25%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0554	-0.0831 to -0.0278	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0647	-0.0924 to -0.0371	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0577	-0.0853 to -0.03	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0715	-0.0971 to -0.0459	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0830	-0.1106 to -0.0554	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0842	-0.1119 to -0.0566	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:24 H	-0.1780	-0.2056 to -0.1503	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0118	-0.0374 to 0.0138	No	0.9291
25%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0224	-0.0501 to 0.0052	No	0.2249
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0466	-0.0742 to -0.0189	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0559	-0.0835 to -0.0282	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0488	-0.0765 to -0.0212	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0627	-0.0883 to -0.0371	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0742	-0.1018 to -0.0465	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0754	-0.103 to -0.0477	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:24 H	-0.1692	-0.1968 to -0.1415	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0106	-0.0383 to 0.017	No	0.9833
50%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0348	-0.0624 to -0.0071	Si	0.004
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0440	-0.0717 to -0.0164	Si	0.0001
50%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0370	-0.0647 to -0.0094	Si	0.0017
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0509	-0.0765 to -0.0253	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0624	-0.09 to -0.0347	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0636	-0.0912 to -0.0359	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.1573	-0.185 to -0.1297	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0242	-0.0537 to 0.0054	No	0.2156
50%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0334	-0.063 to -0.0039	Si	0.0146
50%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0264	-0.056 to 0.0032	No	0.1226

50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0403	-0.0679 to -0.0126	Si	0.0005
50%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0517	-0.0813 to -0.0222	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0530	-0.0825 to -0.0234	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.1467	-0.1763 to -0.1172	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0093	-0.0388 to 0.0203	No	0.9975
50%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0022	-0.0318 to 0.0273	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0161	-0.0438 to 0.0115	No	0.7206
50%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0276	-0.0571 to 0.002	No	0.0891
50%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0288	-0.0584 to 0.0008	No	0.0628
50%:24 H vs. 100%:24 H	-0.1226	-0.1521 to -0.093	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 75%:12 H	0.0070	-0.0225 to 0.0366	No	0.9999
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0068	-0.0345 to 0.0208	No	0.9998
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0183	-0.0479 to 0.0113	No	0.6348
75%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0195	-0.0491 to 0.01	No	0.5348
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.1133	-0.1429 to -0.0837	Si	<0.0001
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0139	-0.0415 to 0.0138	No	0.8772
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0253	-0.0549 to 0.0042	No	0.1623
75%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0265	-0.0561 to 0.003	No	0.1182
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.1203	-0.1499 to -0.0908	Si	<0.0001
75%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0115	-0.0391 to 0.0162	No	0.9683
75%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0127	-0.0403 to 0.015	No	0.932
75%:24 H vs. 100%:24 H	-0.1065	-0.1341 to -0.0788	Si	<0.0001
100%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0012	-0.0308 to 0.0283	No	>0.9999
100%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0950	-0.1246 to -0.0654	Si	<0.0001
100%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0938	-0.1233 to -0.0642	Si	<0.0001

## Anexo 5

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo MC para los diferentes tiempos de inmovilización*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	-0.0005	-0.0157 to 0.0148	No	>0.9999
0%:6 H vs. 0%:24 H	-0.0004	-0.0156 to 0.0148	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:6 H	-0.0090	-0.0242 to 0.0062	No	0.7158
0%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0066	-0.0218 to 0.0086	No	0.9589
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0128	-0.028 to 0.0024	No	0.1839
0%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0275	-0.0427 to -0.0123	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0252	-0.0404 to -0.0099	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0347	-0.0499 to -0.0195	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0442	-0.0594 to -0.029	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0383	-0.0536 to -0.0231	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0486	-0.0638 to -0.0334	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0600	-0.0752 to -0.0448	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0441	-0.0605 to -0.0277	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0662	-0.0827 to -0.0498	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 0%:24 H	0.0001	-0.0152 to 0.0153	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:6 H	-0.0085	-0.0237 to 0.0067	No	0.7806
0%:12 H vs. 25%:12 H	-0.0061	-0.0214 to 0.0091	No	0.9769
0%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0124	-0.0276 to 0.0029	No	0.2274
0%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0270	-0.0422 to -0.0118	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0247	-0.0399 to -0.0095	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0342	-0.0495 to -0.019	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0437	-0.0589 to -0.0285	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0379	-0.0531 to -0.0227	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0481	-0.0633 to -0.0329	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0596	-0.0748 to -0.0444	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0437	-0.0601 to -0.0272	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0658	-0.0822 to -0.0494	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 25%:6 H	-0.0086	-0.0238 to 0.0066	No	0.7715
0%:24 H vs. 25%:12 H	-0.0062	-0.0214 to 0.009	No	0.9747
0%:24 H vs. 25%:24 H	-0.0124	-0.0277 to 0.0028	No	0.2206
0%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0271	-0.0423 to -0.0119	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0248	-0.04 to -0.0095	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0343	-0.0495 to -0.0191	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0438	-0.059 to -0.0286	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0380	-0.0532 to -0.0227	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0482	-0.0634 to -0.033	Si	<0.0001

0%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0596	-0.0749 to -0.0444	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0437	-0.0602 to -0.0273	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0659	-0.0823 to -0.0494	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 25%:12 H	0.0024	-0.0128 to 0.0176	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0039	-0.0191 to 0.0114	No	0.9998
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0185	-0.0337 to -0.0033	Si	0.0059
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0162	-0.0314 to -0.001	Si	0.0276
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0257	-0.0409 to -0.0105	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0352	-0.0504 to -0.02	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0294	-0.0446 to -0.0142	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0396	-0.0548 to -0.0244	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0511	-0.0663 to -0.0359	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0351	-0.0516 to -0.0187	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0573	-0.0737 to -0.0408	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0062	-0.0214 to 0.009	No	0.9741
25%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0209	-0.0361 to -0.0057	Si	0.0011
25%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0186	-0.0338 to -0.0033	Si	0.0056
25%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0281	-0.0433 to -0.0129	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0376	-0.0528 to -0.0224	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0318	-0.047 to -0.0165	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0420	-0.0572 to -0.0268	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0534	-0.0687 to -0.0382	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0375	-0.054 to -0.0211	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0596	-0.0761 to -0.0432	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0146	-0.0299 to 0.0006	No	0.0699
25%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0123	-0.0276 to 0.0029	No	0.2306
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0219	-0.0371 to -0.0067	Si	0.0005
25%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0314	-0.0466 to -0.0161	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0255	-0.0407 to -0.0103	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0358	-0.051 to -0.0206	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0472	-0.0624 to -0.032	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0313	-0.0477 to -0.0149	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0534	-0.0699 to -0.037	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 50%:12 H	0.0023	-0.0129 to 0.0175	No	>0.9999
50%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0072	-0.0225 to 0.008	No	0.9189
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0167	-0.0319 to -0.0015	Si	0.0196
50%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0109	-0.0261 to 0.0043	No	0.4156
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0211	-0.0363 to -0.0059	Si	0.0009
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0326	-0.0478 to -0.0174	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0167	-0.0331 to -0.0002	Si	0.0444
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0388	-0.0552 to -0.0223	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0095	-0.0248 to 0.0057	No	0.6269
50%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0190	-0.0342 to -0.0038	Si	0.0041
50%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0132	-0.0284 to 0.002	No	0.1528

50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0234	-0.0386 to -0.0082	Si	0.0002
50%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0349	-0.0501 to -0.0197	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0190	-0.0354 to -0.0025	Si	0.0113
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0411	-0.0575 to -0.0247	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0095	-0.0247 to 0.0057	No	0.6358
50%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0037	-0.0189 to 0.0116	No	0.9999
50%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0139	-0.0291 to 0.0013	No	0.1064
50%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0253	-0.0406 to -0.0101	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0094	-0.0259 to 0.007	No	0.7526
50%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0315	-0.048 to -0.0151	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 75%:12 H	0.0058	-0.0094 to 0.0211	No	0.9851
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0044	-0.0196 to 0.0108	No	0.9991
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0159	-0.0311 to -0.0006	Si	0.0339
75%:6 H vs. 100%:12 H	0.0001	-0.0164 to 0.0165	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0221	-0.0385 to -0.0056	Si	0.0015
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0102	-0.0255 to 0.005	No	0.5158
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0217	-0.0369 to -0.0065	Si	0.0006
75%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0058	-0.0222 to 0.0107	No	0.9934
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0279	-0.0443 to -0.0115	Si	<0.0001
75%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0115	-0.0267 to 0.0038	No	0.3358
75%:24 H vs. 100%:12 H	0.0045	-0.012 to 0.0209	No	0.9995
75%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0177	-0.0341 to -0.0012	Si	0.0249
100%:6 H vs. 100%:12 H	0.0159	-0.0005 to 0.0324	No	0.066
100%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0062	-0.0226 to 0.0102	No	0.987
100%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0221	-0.0397 to -0.0046	Si	0.0037

## Anexo 6

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HSMC para los diferentes tiempos de inmovilización*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	-0.0004	-0.0132 to 0.0125	No	>0.9999
0%:6 H vs. 0%:24 H	-0.0005	-0.0134 to 0.0123	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:6 H	-0.0067	-0.0195 to 0.0062	No	0.853
0%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0101	-0.0229 to 0.0028	No	0.2765
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0070	-0.0199 to 0.0058	No	0.805
0%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0207	-0.0335 to -0.0078	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0306	-0.0445 to -0.0167	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0282	-0.0411 to -0.0154	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0400	-0.0529 to -0.0272	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0345	-0.0484 to -0.0206	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0421	-0.055 to -0.0293	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0474	-0.0603 to -0.0346	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0400	-0.0528 to -0.0271	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0711	-0.085 to -0.0573	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 0%:24 H	-0.0001	-0.013 to 0.0127	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:6 H	-0.0063	-0.0192 to 0.0066	No	0.8987
0%:12 H vs. 25%:12 H	-0.0097	-0.0225 to 0.0032	No	0.3337
0%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0066	-0.0195 to 0.0062	No	0.8592
0%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0203	-0.0331 to -0.0074	Si	0.0001
0%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0302	-0.0441 to -0.0163	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0278	-0.0407 to -0.015	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0397	-0.0525 to -0.0268	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0341	-0.048 to -0.0202	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0418	-0.0546 to -0.0289	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0470	-0.0599 to -0.0342	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0396	-0.0525 to -0.0268	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0707	-0.0846 to -0.0569	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 25%:6 H	-0.0062	-0.019 to 0.0067	No	0.9117
0%:24 H vs. 25%:12 H	-0.0096	-0.0224 to 0.0033	No	0.354
0%:24 H vs. 25%:24 H	-0.0065	-0.0194 to 0.0063	No	0.875
0%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0201	-0.033 to -0.0073	Si	0.0001
0%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0301	-0.044 to -0.0162	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0277	-0.0406 to -0.0148	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0395	-0.0524 to -0.0267	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0340	-0.0479 to -0.0201	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0416	-0.0545 to -0.0288	Si	<0.0001

0%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0469	-0.0598 to -0.0341	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0395	-0.0523 to -0.0266	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0706	-0.0845 to -0.0567	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0034	-0.0162 to 0.0095	No	0.9997
25%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0003	-0.0132 to 0.0125	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0140	-0.0268 to -0.0011	Si	0.0222
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0239	-0.0378 to -0.01	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0215	-0.0344 to -0.0087	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0334	-0.0462 to -0.0205	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0278	-0.0417 to -0.0139	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0354	-0.0483 to -0.0226	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0407	-0.0536 to -0.0279	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0333	-0.0462 to -0.0205	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0644	-0.0783 to -0.0506	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 25%:24 H	0.0030	-0.0099 to 0.0159	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0106	-0.0234 to 0.0023	No	0.2099
25%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0206	-0.0344 to -0.0067	Si	0.0003
25%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0182	-0.031 to -0.0053	Si	0.0007
25%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0300	-0.0428 to -0.0171	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0245	-0.0383 to -0.0106	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0321	-0.0449 to -0.0192	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0374	-0.0502 to -0.0245	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0299	-0.0428 to -0.0171	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0611	-0.075 to -0.0472	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0136	-0.0265 to -0.0008	Si	0.0286
25%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0236	-0.0375 to -0.0097	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0212	-0.034 to -0.0083	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0330	-0.0459 to -0.0202	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0275	-0.0414 to -0.0136	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0351	-0.048 to -0.0223	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0404	-0.0533 to -0.0276	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0330	-0.0458 to -0.0201	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0641	-0.078 to -0.0502	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0100	-0.0239 to 0.0039	No	0.409
50%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0076	-0.0204 to 0.0053	No	0.7167
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0194	-0.0322 to -0.0065	Si	0.0002
50%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0139	-0.0277 to 0	No	0.0507
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0215	-0.0343 to -0.0086	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0268	-0.0396 to -0.0139	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0193	-0.0322 to -0.0065	Si	0.0002
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0505	-0.0644 to -0.0366	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 50%:24 H	0.0024	-0.0115 to 0.0163	No	>0.9999
50%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0094	-0.0233 to 0.0045	No	0.4995
50%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0039	-0.0187 to 0.0109	No	0.9997

50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0115	-0.0254 to 0.0024	No	0.2008
50%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0168	-0.0307 to -0.0029	Si	0.0063
50%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0094	-0.0233 to 0.0045	No	0.5072
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0405	-0.0554 to -0.0257	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0118	-0.0247 to 0.001	No	0.1001
50%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0063	-0.0202 to 0.0076	No	0.9408
50%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0139	-0.0268 to -0.0011	Si	0.0229
50%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0192	-0.0321 to -0.0064	Si	0.0003
50%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0118	-0.0246 to 0.0011	No	0.1029
50%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0429	-0.0568 to -0.029	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 75%:12 H	0.0055	-0.0084 to 0.0194	No	0.9791
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0021	-0.015 to 0.0108	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0074	-0.0203 to 0.0055	No	0.7458
75%:6 H vs. 100%:12 H	0.0000	-0.0128 to 0.0129	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0311	-0.045 to -0.0172	Si	<0.0001
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0076	-0.0215 to 0.0063	No	0.8004
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0129	-0.0268 to 0.001	No	0.0918
75%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0055	-0.0194 to 0.0084	No	0.9805
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0366	-0.0515 to -0.0218	Si	<0.0001
75%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0053	-0.0182 to 0.0076	No	0.9721
75%:24 H vs. 100%:12 H	0.0021	-0.0107 to 0.015	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0290	-0.0429 to -0.0151	Si	<0.0001
100%:6 H vs. 100%:12 H	0.0074	-0.0054 to 0.0203	No	0.7383
100%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0237	-0.0376 to -0.0098	Si	<0.0001
100%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0311	-0.045 to -0.0173	Si	<0.0001

## Anexo 7

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 6 y 4 h, respectivamente*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	-0.0016	-0.0121 to 0.0089	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0013	-0.0112 to 0.0085	No	>0.9999
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0159	-0.0264 to -0.0054	Si	0.0003
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0113	-0.0218 to -0.0007	Si	0.0266
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0113	-0.0211 to -0.0015	Si	0.0126
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0269	-0.0374 to -0.0164	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0152	-0.0257 to -0.0046	Si	0.0006
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0162	-0.0267 to -0.0057	Si	0.0002
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0415	-0.052 to -0.031	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0273	-0.0378 to -0.0167	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0248	-0.0346 to -0.0149	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.0820	-0.0925 to -0.0715	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0359	-0.0457 to -0.0261	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0346	-0.0445 to -0.0248	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	0.0002	-0.0097 to 0.0101	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0143	-0.0248 to -0.0038	Si	0.0015
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0097	-0.0202 to 0.0008	No	0.0977
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0097	-0.0196 to 0.0001	No	0.055
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0253	-0.0358 to -0.0148	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0136	-0.0241 to -0.0031	Si	0.003
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0147	-0.0252 to -0.0041	Si	0.001
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0399	-0.0504 to -0.0294	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0257	-0.0362 to -0.0152	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0232	-0.0331 to -0.0134	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.0804	-0.0909 to -0.0699	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0343	-0.0442 to -0.0245	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0330	-0.0429 to -0.0232	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0146	-0.0244 to -0.0047	Si	0.0004
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0099	-0.0198 to -0.0001	Si	0.0467
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0100	-0.0191 to -0.0009	Si	0.0213
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0255	-0.0354 to -0.0157	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0138	-0.0237 to -0.004	Si	0.0009
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0149	-0.0247 to -0.005	Si	0.0003
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0402	-0.05 to -0.0303	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0259	-0.0358 to -0.0161	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0234	-0.0326 to -0.0143	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0806	-0.0905 to -0.0708	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0346	-0.0437 to -0.0254	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0333	-0.0424 to -0.0242	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0046	-0.0059 to 0.0152	No	0.946
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0046	-0.0053 to 0.0144	No	0.9196
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0110	-0.0215 to -0.0005	Si	0.0338
25%:HS vs. 50%:MC	0.0007	-0.0098 to 0.0113	No	>0.9999
25%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0003	-0.0109 to 0.0102	No	>0.9999
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0256	-0.0361 to -0.0151	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0114	-0.0219 to -0.0008	Si	0.0242
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0089	-0.0187 to 0.0009	No	0.112
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0661	-0.0766 to -0.0556	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0200	-0.0298 to -0.0102	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0187	-0.0286 to -0.0089	Si	<0.0001
25%:MC vs. 25%:HSMC	0.0000	-0.0099 to 0.0098	No	>0.9999
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0156	-0.0261 to -0.0051	Si	0.0004
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0039	-0.0144 to 0.0066	No	0.9865
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0050	-0.0155 to 0.0056	No	0.9128
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0302	-0.0408 to -0.0197	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0160	-0.0265 to -0.0055	Si	0.0003
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0135	-0.0234 to -0.0037	Si	0.0013
25%:MC vs. 100%:HS	-0.0707	-0.0812 to -0.0602	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0246	-0.0345 to -0.0148	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0234	-0.0332 to -0.0135	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0156	-0.0254 to -0.0057	Si	0.0001
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0039	-0.0137 to 0.006	No	0.9785
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0049	-0.0148 to 0.0049	No	0.8743
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0302	-0.04 to -0.0203	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0160	-0.0258 to -0.0061	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0135	-0.0226 to -0.0044	Si	0.0004
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0707	-0.0805 to -0.0608	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0246	-0.0337 to -0.0155	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0233	-0.0324 to -0.0142	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0117	0.0012 to 0.0222	Si	0.0177
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0107	0.0001 to 0.0212	Si	0.0447
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0146	-0.0251 to -0.0041	Si	0.0011
50%:HS vs. 75%:MC	-0.0004	-0.0109 to 0.0101	No	>0.9999
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0021	-0.0077 to 0.0119	No	>0.9999
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0551	-0.0656 to -0.0446	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	-0.0090	-0.0189 to 0.0008	No	0.1014
50%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0077	-0.0176 to 0.0021	No	0.262
50%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0011	-0.0116 to 0.0095	No	>0.9999
50%:MC vs. 75%:HS	-0.0263	-0.0368 to -0.0158	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0121	-0.0226 to -0.0016	Si	0.0125

50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0096	-0.0195 to 0.0002	No	0.0607
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0668	-0.0773 to -0.0563	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0207	-0.0306 to -0.0109	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0194	-0.0293 to -0.0096	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0253	-0.0358 to -0.0148	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0110	-0.0216 to -0.0005	Si	0.0322
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0086	-0.0184 to 0.0013	No	0.1448
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0658	-0.0763 to -0.0552	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0197	-0.0295 to -0.0098	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0184	-0.0282 to -0.0085	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:MC	0.0142	0.0037 to 0.0248	Si	0.0016
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0167	0.0069 to 0.0265	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0405	-0.051 to -0.03	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:MC	0.0056	-0.0042 to 0.0154	No	0.7425
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0069	-0.003 to 0.0167	No	0.4361
75%:MC vs. 75%:HSMC	0.0025	-0.0074 to 0.0123	No	0.9997
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0547	-0.0652 to -0.0442	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0086	-0.0185 to 0.0012	No	0.1374
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0074	-0.0172 to 0.0025	No	0.3336
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0572	-0.067 to -0.0473	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0111	-0.0202 to -0.002	Si	0.0063
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0098	-0.0189 to -0.0007	Si	0.0246
100%:HS vs. 100%:MC	0.0461	0.0362 to 0.0559	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0474	0.0375 to 0.0572	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0013	-0.0078 to 0.0104	No	>0.9999

## Anexo 8

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 12 y 4 h, respectivamente*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	0.0002	-0.0116 to 0.012	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0018	-0.0136 to 0.01	No	>0.9999
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0191	-0.0309 to -0.0073	Si	<0.0001
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0100	-0.0218 to 0.0018	No	0.1763
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0107	-0.0225 to 0.0011	No	0.1087
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0286	-0.0404 to -0.0168	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0151	-0.0269 to -0.0033	Si	0.0028
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0143	-0.0261 to -0.0026	Si	0.0058
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0442	-0.0569 to -0.0314	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0255	-0.0373 to -0.0137	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0220	-0.0338 to -0.0102	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.0809	-0.0927 to -0.0691	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0389	-0.0507 to -0.0271	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0328	-0.0445 to -0.021	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0020	-0.0138 to 0.0098	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0193	-0.0311 to -0.0075	Si	<0.0001
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0102	-0.022 to 0.0016	No	0.1578
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0109	-0.0227 to 0.0009	No	0.0962
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0288	-0.0406 to -0.017	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0153	-0.0271 to -0.0035	Si	0.0024
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0145	-0.0263 to -0.0027	Si	0.005
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0444	-0.0571 to -0.0316	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0257	-0.0374 to -0.0139	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0222	-0.034 to -0.0104	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.0811	-0.0929 to -0.0693	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0391	-0.0509 to -0.0273	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0329	-0.0447 to -0.0211	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0173	-0.0291 to -0.0055	Si	0.0003
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0082	-0.02 to 0.0036	No	0.462
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0089	-0.0207 to 0.0029	No	0.3266
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0268	-0.0386 to -0.015	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0133	-0.0251 to -0.0015	Si	0.0141
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0125	-0.0243 to -0.0008	Si	0.0275
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0424	-0.0551 to -0.0296	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0237	-0.0355 to -0.0119	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0202	-0.032 to -0.0084	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0791	-0.0909 to -0.0673	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0371	-0.0489 to -0.0253	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0310	-0.0427 to -0.0192	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0091	-0.0027 to 0.0209	No	0.2961
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0084	-0.0034 to 0.0202	No	0.4256
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0095	-0.0213 to 0.0023	No	0.2378
25%:HS vs. 50%:MC	0.0040	-0.0078 to 0.0158	No	0.9954
25%:HS vs. 50%:HSMC	0.0048	-0.007 to 0.0166	No	0.9762
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0251	-0.0378 to -0.0123	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0064	-0.0181 to 0.0054	No	0.8234
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0029	-0.0147 to 0.0089	No	0.9999
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0618	-0.0736 to -0.05	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0198	-0.0316 to -0.008	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0136	-0.0254 to -0.0018	Si	0.0109
25%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0007	-0.0125 to 0.0111	No	>0.9999
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0186	-0.0304 to -0.0068	Si	<0.0001
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0051	-0.0169 to 0.0067	No	0.9584
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0043	-0.0161 to 0.0075	No	0.9899
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0342	-0.0469 to -0.0214	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0155	-0.0273 to -0.0037	Si	0.002
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0120	-0.0238 to -0.0002	Si	0.0422
25%:MC vs. 100%:HS	-0.0709	-0.0827 to -0.0591	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0289	-0.0407 to -0.0171	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0228	-0.0345 to -0.011	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0179	-0.0297 to -0.0061	Si	0.0002
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0044	-0.0162 to 0.0074	No	0.9886
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0036	-0.0154 to 0.0082	No	0.9984
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0334	-0.0462 to -0.0207	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0147	-0.0265 to -0.003	Si	0.004
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0113	-0.0231 to 0.0005	No	0.0737
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0702	-0.082 to -0.0584	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0282	-0.04 to -0.0164	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0220	-0.0338 to -0.0102	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0135	0.0017 to 0.0253	Si	0.0122
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0143	0.0025 to 0.0261	Si	0.006
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0155	-0.0283 to -0.0028	Si	0.0055
50%:HS vs. 75%:MC	0.0032	-0.0086 to 0.015	No	0.9996
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0066	-0.0052 to 0.0184	No	0.7777
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0523	-0.0641 to -0.0405	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	-0.0103	-0.0221 to 0.0015	No	0.1461
50%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0041	-0.0159 to 0.0077	No	0.9938
50%:MC vs. 50%:HSMC	0.0008	-0.011 to 0.0126	No	>0.9999

50%:MC vs. 75%:HS	-0.0290	-0.0418 to -0.0163	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0103	-0.0221 to 0.0014	No	0.1415
50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0069	-0.0187 to 0.0049	No	0.7308
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0658	-0.0776 to -0.054	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0238	-0.0356 to -0.012	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0176	-0.0294 to -0.0058	Si	0.0003
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0298	-0.0426 to -0.0171	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0111	-0.0229 to 0.0007	No	0.0818
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0077	-0.0195 to 0.0041	No	0.5717
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0666	-0.0784 to -0.0548	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0246	-0.0364 to -0.0128	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0184	-0.0302 to -0.0066	Si	0.0001
75%:HS vs. 75%:MC	0.0187	0.006 to 0.0314	Si	0.0003
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0222	0.0094 to 0.0349	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0368	-0.0495 to -0.024	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:MC	0.0052	-0.0075 to 0.018	No	0.9729
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0114	-0.0013 to 0.0242	No	0.1212
75%:MC vs. 75%:HSMC	0.0035	-0.0083 to 0.0153	No	0.9989
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0555	-0.0672 to -0.0437	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0135	-0.0252 to -0.0017	Si	0.0127
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0073	-0.0191 to 0.0045	No	0.6521
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0589	-0.0707 to -0.0471	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0169	-0.0287 to -0.0051	Si	0.0005
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0107	-0.0225 to 0.001	No	0.1079
100%:HS vs. 100%:MC	0.0420	0.0302 to 0.0538	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0482	0.0364 to 0.06	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0062	-0.0056 to 0.018	No	0.8499

## Anexo 9

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 24 y 4 h, respectivamente*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	-0.0006	-0.0173 to 0.0162	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0019	-0.0186 to 0.0149	No	>0.9999
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0257	-0.0424 to -0.0089	Si	0.0002
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0115	-0.0283 to 0.0052	No	0.4814
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0119	-0.0286 to 0.0049	No	0.4351
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0533	-0.0701 to -0.0366	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0205	-0.0373 to -0.0038	Si	0.0053
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0191	-0.0359 to -0.0024	Si	0.0128
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0737	-0.0905 to -0.057	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0310	-0.0477 to -0.0142	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0344	-0.0511 to -0.0176	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.1129	-0.131 to -0.0948	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0392	-0.056 to -0.0225	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0364	-0.0532 to -0.0197	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0013	-0.018 to 0.0155	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0251	-0.0419 to -0.0084	Si	0.0002
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0109	-0.0277 to 0.0058	No	0.5676
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0113	-0.028 to 0.0055	No	0.5195
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0527	-0.0695 to -0.036	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0199	-0.0367 to -0.0032	Si	0.0077
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0185	-0.0353 to -0.0018	Si	0.0183
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0731	-0.0899 to -0.0564	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0304	-0.0471 to -0.0136	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0338	-0.0505 to -0.017	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.1123	-0.1304 to -0.0942	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0386	-0.0554 to -0.0219	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0358	-0.0526 to -0.0191	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0238	-0.0406 to -0.0071	Si	0.0006
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0096	-0.0264 to 0.0071	No	0.7477
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0100	-0.0267 to 0.0068	No	0.7033
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0514	-0.0682 to -0.0347	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0187	-0.0354 to -0.0019	Si	0.0168
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0172	-0.034 to -0.0005	Si	0.0384
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0719	-0.0886 to -0.0551	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0291	-0.0458 to -0.0124	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0325	-0.0492 to -0.0158	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1110	-0.1291 to -0.0929	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0374	-0.0541 to -0.0206	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0345	-0.0513 to -0.0178	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0142	-0.0026 to 0.0309	No	0.1789
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0139	-0.0029 to 0.0306	No	0.2066
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0276	-0.0444 to -0.0109	Si	<0.0001
25%:HS vs. 50%:MC	0.0052	-0.0116 to 0.0219	No	0.9982
25%:HS vs. 50%:HSMC	0.0066	-0.0102 to 0.0233	No	0.9815
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0480	-0.0648 to -0.0313	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0053	-0.022 to 0.0115	No	0.9978
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0087	-0.0254 to 0.0081	No	0.8603
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0872	-0.1053 to -0.0691	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0135	-0.0303 to 0.0032	No	0.2358
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0107	-0.0275 to 0.006	No	0.5984
25%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0003	-0.0171 to 0.0164	No	>0.9999
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0418	-0.0585 to -0.025	Si	<0.0001
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0090	-0.0258 to 0.0077	No	0.825
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0076	-0.0243 to 0.0092	No	0.9435
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0622	-0.079 to -0.0455	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0195	-0.0362 to -0.0027	Si	0.0103
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0229	-0.0396 to -0.0061	Si	0.0011
25%:MC vs. 100%:HS	-0.1013	-0.1194 to -0.0833	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0277	-0.0445 to -0.011	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0249	-0.0416 to -0.0081	Si	0.0003
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0415	-0.0582 to -0.0247	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0087	-0.0254 to 0.0081	No	0.8596
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0073	-0.024 to 0.0095	No	0.9598
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0619	-0.0786 to -0.0451	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0191	-0.0359 to -0.0024	Si	0.0127
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0225	-0.0393 to -0.0058	Si	0.0014
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1010	-0.1191 to -0.0829	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0274	-0.0441 to -0.0106	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0246	-0.0413 to -0.0078	Si	0.0004
50%:HS vs. 50%:MC	0.0328	0.016 to 0.0495	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0342	0.0175 to 0.051	Si	<0.0001
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0204	-0.0372 to -0.0037	Si	0.0056
50%:HS vs. 75%:MC	0.0223	0.0056 to 0.0391	Si	0.0016
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0189	0.0022 to 0.0357	Si	0.0141
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0596	-0.0777 to -0.0415	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	0.0141	-0.0027 to 0.0308	No	0.1872
50%:HS vs. 100%:HSMC	0.0169	0.0001 to 0.0336	Si	0.0461
50%:MC vs. 50%:HSMC	0.0014	-0.0153 to 0.0182	No	>0.9999

50%:MC vs. 75%:HS	-0.0532	-0.07 to -0.0365	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0104	-0.0272 to 0.0063	No	0.6374
50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0138	-0.0306 to 0.0029	No	0.2072
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0923	-0.1104 to -0.0743	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0187	-0.0355 to -0.002	Si	0.0163
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0159	-0.0326 to 0.0009	No	0.079
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0546	-0.0714 to -0.0379	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0119	-0.0286 to 0.0049	No	0.4324
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0153	-0.032 to 0.0015	No	0.1077
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0938	-0.1119 to -0.0757	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0201	-0.0369 to -0.0034	Si	0.0068
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0173	-0.0341 to -0.0006	Si	0.0366
75%:HS vs. 75%:MC	0.0428	0.026 to 0.0595	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0394	0.0226 to 0.0561	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0391	-0.0572 to -0.021	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:MC	0.0345	0.0178 to 0.0513	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0373	0.0206 to 0.0541	Si	<0.0001
75%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0034	-0.0202 to 0.0134	No	>0.9999
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0819	-0.1 to -0.0638	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0083	-0.025 to 0.0085	No	0.8972
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0054	-0.0222 to 0.0113	No	0.997
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0785	-0.0966 to -0.0604	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0049	-0.0216 to 0.0119	No	0.9991
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0020	-0.0188 to 0.0147	No	>0.9999
100%:HS vs. 100%:MC	0.0736	0.0555 to 0.0917	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0765	0.0584 to 0.0945	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0028	-0.0139 to 0.0196	No	>0.9999

## Anexo 10

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 6 y 48 h, respectivamente*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	-0.0029	-0.0147 to 0.0089	No	0.9998
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0047	-0.0165 to 0.0071	No	0.9726
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0153	-0.0271 to -0.0035	Si	0.0031
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0123	-0.0241 to -0.0005	Si	0.0351
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0116	-0.0227 to -0.0006	Si	0.0308
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0259	-0.0377 to -0.0142	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0183	-0.0301 to -0.0065	Si	0.0002
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0215	-0.0325 to -0.0104	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0483	-0.0601 to -0.0365	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0265	-0.0383 to -0.0147	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0324	-0.0442 to -0.0206	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.0957	-0.1075 to -0.0839	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0455	-0.0573 to -0.0337	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0402	-0.052 to -0.0284	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0018	-0.0136 to 0.01	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0124	-0.0242 to -0.0006	Si	0.0319
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0094	-0.0212 to 0.0024	No	0.2429
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0087	-0.0198 to 0.0023	No	0.2464
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0231	-0.0348 to -0.0113	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0154	-0.0272 to -0.0036	Si	0.0028
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0186	-0.0296 to -0.0075	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0454	-0.0572 to -0.0336	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0236	-0.0354 to -0.0118	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0295	-0.0413 to -0.0177	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.0928	-0.1046 to -0.081	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0426	-0.0544 to -0.0308	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0373	-0.0491 to -0.0255	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0106	-0.0224 to 0.0012	No	0.1168
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0075	-0.0193 to 0.0042	No	0.5663
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0069	-0.018 to 0.0041	No	0.5974
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0212	-0.033 to -0.0094	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0136	-0.0254 to -0.0018	Si	0.0125
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0167	-0.0278 to -0.0057	Si	0.0003
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0436	-0.0554 to -0.0318	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0217	-0.0335 to -0.0099	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0277	-0.0395 to -0.0159	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0910	-0.1028 to -0.0792	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0408	-0.0526 to -0.029	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0355	-0.0473 to -0.0237	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0030	-0.0088 to 0.0148	No	0.9996
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0037	-0.0074 to 0.0147	No	0.9949
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0107	-0.0225 to 0.0011	No	0.1106
25%:HS vs. 50%:MC	-0.0030	-0.0148 to 0.0088	No	0.9996
25%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0062	-0.0172 to 0.0049	No	0.7563
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0330	-0.0448 to -0.0213	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0112	-0.023 to 0.0006	No	0.0781
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0171	-0.0289 to -0.0053	Si	0.0006
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0804	-0.0922 to -0.0686	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0302	-0.042 to -0.0184	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0249	-0.0367 to -0.0131	Si	<0.0001
25%:MC vs. 25%:HSMC	0.0006	-0.0104 to 0.0117	No	>0.9999
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0137	-0.0255 to -0.0019	Si	0.0116
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0060	-0.0178 to 0.0058	No	0.8469
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0092	-0.0202 to 0.0018	No	0.1873
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0361	-0.0479 to -0.0243	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0142	-0.026 to -0.0024	Si	0.0077
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0202	-0.0319 to -0.0084	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HS	-0.0834	-0.0952 to -0.0716	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0332	-0.045 to -0.0214	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0279	-0.0397 to -0.0161	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0143	-0.0253 to -0.0033	Si	0.003
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0067	-0.0177 to 0.0044	No	0.6519
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0098	-0.02 to 0.0004	No	0.0695
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0367	-0.0477 to -0.0257	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0148	-0.0259 to -0.0038	Si	0.0019
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0208	-0.0318 to -0.0098	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0841	-0.0951 to -0.073	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0339	-0.0449 to -0.0228	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0286	-0.0396 to -0.0175	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0076	-0.0042 to 0.0194	No	0.5483
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0045	-0.0065 to 0.0155	No	0.9684
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0224	-0.0342 to -0.0106	Si	<0.0001
50%:HS vs. 75%:MC	-0.0005	-0.0123 to 0.0113	No	>0.9999
50%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0065	-0.0183 to 0.0053	No	0.7763
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0698	-0.0815 to -0.058	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	-0.0196	-0.0313 to -0.0078	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0142	-0.026 to -0.0025	Si	0.0073
50%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0031	-0.0142 to 0.0079	No	0.9989

50%:MC vs. 75%:HS	-0.0300	-0.0418 to -0.0182	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0081	-0.0199 to 0.0036	No	0.4463
50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0141	-0.0259 to -0.0023	Si	0.0082
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0774	-0.0892 to -0.0656	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0272	-0.039 to -0.0154	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0219	-0.0337 to -0.0101	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0269	-0.0379 to -0.0159	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0050	-0.016 to 0.006	No	0.9294
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0110	-0.022 to 0.0001	No	0.0525
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0742	-0.0853 to -0.0632	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0240	-0.0351 to -0.013	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0187	-0.0298 to -0.0077	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:MC	0.0219	0.0101 to 0.0337	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0159	0.0041 to 0.0277	Si	0.0018
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0474	-0.0592 to -0.0356	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:MC	0.0028	-0.009 to 0.0146	No	0.9998
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0081	-0.0036 to 0.0199	No	0.4474
75%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0060	-0.0178 to 0.0058	No	0.8577
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0692	-0.081 to -0.0575	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0190	-0.0308 to -0.0073	Si	0.0001
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0137	-0.0255 to -0.0019	Si	0.0111
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0633	-0.0751 to -0.0515	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0131	-0.0249 to -0.0013	Si	0.0188
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0078	-0.0196 to 0.004	No	0.5224
100%:HS vs. 100%:MC	0.0502	0.0384 to 0.062	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0555	0.0437 to 0.0673	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0053	-0.0065 to 0.0171	No	0.9328

## Anexo 11

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 12 y 48 h, respectivamente*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	0.0004	-0.0145 to 0.0153	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0045	-0.0194 to 0.0104	No	0.9985
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0177	-0.0326 to -0.0028	Si	0.008
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0102	-0.0251 to 0.0047	No	0.488
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0108	-0.0257 to 0.0042	No	0.4048
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0291	-0.0441 to -0.0142	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0145	-0.0294 to 0.0004	No	0.0643
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0157	-0.0306 to -0.0008	Si	0.0311
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0537	-0.0698 to -0.0376	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0295	-0.0444 to -0.0145	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0247	-0.0397 to -0.0098	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.0880	-0.1029 to -0.073	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0505	-0.0654 to -0.0356	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0384	-0.0534 to -0.0235	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0049	-0.0198 to 0.01	No	0.9967
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0181	-0.033 to -0.0032	Si	0.0061
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0106	-0.0255 to 0.0043	No	0.4291
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0111	-0.0261 to 0.0038	No	0.3505
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0295	-0.0444 to -0.0146	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0149	-0.0298 to 0	No	0.0513
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0161	-0.031 to -0.0011	Si	0.0244
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0541	-0.0702 to -0.038	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0298	-0.0448 to -0.0149	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0251	-0.04 to -0.0102	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.0883	-0.1032 to -0.0734	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0508	-0.0658 to -0.0359	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0388	-0.0537 to -0.0239	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0132	-0.0281 to 0.0017	No	0.1348
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0057	-0.0206 to 0.0092	No	0.9857
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0062	-0.0212 to 0.0087	No	0.9693
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0246	-0.0396 to -0.0097	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0100	-0.0249 to 0.0049	No	0.525
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0112	-0.0261 to 0.0038	No	0.3458
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0492	-0.0653 to -0.0331	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0250	-0.0399 to -0.01	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0202	-0.0351 to -0.0053	Si	0.0013
0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0834	-0.0984 to -0.0685	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0460	-0.0609 to -0.031	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0339	-0.0488 to -0.019	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0075	-0.0074 to 0.0224	No	0.886
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0069	-0.008 to 0.0219	No	0.9311
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0115	-0.0264 to 0.0035	No	0.3079
25%:HS vs. 50%:MC	0.0032	-0.0117 to 0.0181	No	>0.9999
25%:HS vs. 50%:HSMC	0.0020	-0.0129 to 0.0169	No	>0.9999
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0360	-0.0521 to -0.0199	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0118	-0.0267 to 0.0032	No	0.2684
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0070	-0.022 to 0.0079	No	0.9238
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0703	-0.0852 to -0.0553	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0328	-0.0477 to -0.0179	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0207	-0.0357 to -0.0058	Si	0.0009
25%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0005	-0.0155 to 0.0144	No	>0.9999
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0189	-0.0338 to -0.004	Si	0.0033
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0043	-0.0192 to 0.0106	No	0.9992
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0055	-0.0204 to 0.0095	No	0.9905
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0435	-0.0596 to -0.0274	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0192	-0.0342 to -0.0043	Si	0.0026
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0145	-0.0294 to 0.0004	No	0.0638
25%:MC vs. 100%:HS	-0.0777	-0.0927 to -0.0628	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0402	-0.0552 to -0.0253	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0282	-0.0431 to -0.0133	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0184	-0.0333 to -0.0035	Si	0.0049
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0037	-0.0187 to 0.0112	No	0.9998
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0049	-0.0198 to 0.01	No	0.9965
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0430	-0.0591 to -0.0268	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0187	-0.0336 to -0.0038	Si	0.0039
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0140	-0.0289 to 0.0009	No	0.0871
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0772	-0.0921 to -0.0623	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0397	-0.0546 to -0.0248	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0277	-0.0426 to -0.0128	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0146	-0.0003 to 0.0296	No	0.0591
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0135	-0.0015 to 0.0284	No	0.1158
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0246	-0.0407 to -0.0085	Si	0.0002
50%:HS vs. 75%:MC	-0.0003	-0.0152 to 0.0146	No	>0.9999
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0044	-0.0105 to 0.0193	No	0.9989
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0588	-0.0737 to -0.0439	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	-0.0213	-0.0362 to -0.0064	Si	0.0005
50%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0093	-0.0242 to 0.0056	No	0.6394
50%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0012	-0.0161 to 0.0137	No	>0.9999

50%:MC vs. 75%:HS	-0.0392	-0.0553 to -0.0231	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0150	-0.0299 to 0	Si	0.0488
50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0102	-0.0252 to 0.0047	No	0.4859
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0735	-0.0884 to -0.0585	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0360	-0.0509 to -0.0211	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0239	-0.0389 to -0.009	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0380	-0.0542 to -0.0219	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0138	-0.0287 to 0.0011	No	0.0971
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0091	-0.024 to 0.0059	No	0.6765
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0723	-0.0872 to -0.0574	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0348	-0.0497 to -0.0199	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0228	-0.0377 to -0.0078	Si	0.0002
75%:HS vs. 75%:MC	0.0243	0.0081 to 0.0404	Si	0.0002
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0290	0.0129 to 0.0451	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0343	-0.0504 to -0.0181	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:MC	0.0032	-0.0129 to 0.0194	No	>0.9999
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0153	-0.0008 to 0.0314	No	0.0791
75%:MC vs. 75%:HSMC	0.0047	-0.0102 to 0.0196	No	0.9976
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0585	-0.0734 to -0.0436	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0210	-0.0359 to -0.0061	Si	0.0007
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0090	-0.0239 to 0.0059	No	0.6902
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0632	-0.0781 to -0.0483	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0257	-0.0407 to -0.0108	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0137	-0.0286 to 0.0012	No	0.1019
100%:HS vs. 100%:MC	0.0375	0.0226 to 0.0524	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0495	0.0346 to 0.0644	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0120	-0.0029 to 0.027	No	0.2378

## Anexo 12

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en los medios de cultivo en estudio cuando se inmoviliza y se libera por un tiempo de 24 y 48 h, respectivamente*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:HS vs. 0%:MC	-0.0018	-0.0209 to 0.0173	No	>0.9999
0%:HS vs. 0%:HSMC	-0.0047	-0.0238 to 0.0144	No	0.9998
0%:HS vs. 25%:HS	-0.0289	-0.048 to -0.0098	Si	0.0002
0%:HS vs. 25%:MC	-0.0145	-0.0336 to 0.0046	No	0.3242
0%:HS vs. 25%:HSMC	-0.0157	-0.0348 to 0.0034	No	0.214
0%:HS vs. 50%:HS	-0.0576	-0.0768 to -0.0385	Si	<0.0001
0%:HS vs. 50%:MC	-0.0288	-0.0479 to -0.0097	Si	0.0002
0%:HS vs. 50%:HSMC	-0.0256	-0.0447 to -0.0065	Si	0.0014
0%:HS vs. 75%:HS	-0.0797	-0.0988 to -0.0606	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:MC	-0.0426	-0.0617 to -0.0235	Si	<0.0001
0%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0426	-0.0617 to -0.0235	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HS	-0.1193	-0.1384 to -0.1002	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:MC	-0.0535	-0.0726 to -0.0343	Si	<0.0001
0%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0469	-0.0661 to -0.0278	Si	<0.0001
0%:MC vs. 0%:HSMC	-0.0030	-0.0221 to 0.0162	No	>0.9999
0%:MC vs. 25%:HS	-0.0271	-0.0463 to -0.008	Si	0.0006
0%:MC vs. 25%:MC	-0.0127	-0.0319 to 0.0064	No	0.5334
0%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0139	-0.0331 to 0.0052	No	0.3869
0%:MC vs. 50%:HS	-0.0559	-0.075 to -0.0368	Si	<0.0001
0%:MC vs. 50%:MC	-0.0270	-0.0462 to -0.0079	Si	0.0006
0%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0239	-0.043 to -0.0048	Si	0.0041
0%:MC vs. 75%:HS	-0.0779	-0.097 to -0.0588	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:MC	-0.0408	-0.0599 to -0.0217	Si	<0.0001
0%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0408	-0.0599 to -0.0217	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HS	-0.1175	-0.1366 to -0.0984	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:MC	-0.0517	-0.0708 to -0.0326	Si	<0.0001
0%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0452	-0.0643 to -0.0261	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 25%:HS	-0.0242	-0.0433 to -0.0051	Si	0.0034
0%:HSMC vs. 25%:MC	-0.0098	-0.0289 to 0.0093	No	0.8701
0%:HSMC vs. 25%:HSMC	-0.0110	-0.0301 to 0.0081	No	0.7513
0%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0529	-0.072 to -0.0338	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0241	-0.0432 to -0.005	Si	0.0036
0%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0209	-0.04 to -0.0018	Si	0.0204
0%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0749	-0.094 to -0.0558	Si	<0.0001

0%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0379	-0.057 to -0.0188	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0378	-0.0569 to -0.0187	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1146	-0.1337 to -0.0954	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0487	-0.0678 to -0.0296	Si	<0.0001
0%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0422	-0.0613 to -0.0231	Si	<0.0001
25%:HS vs. 25%:MC	0.0144	-0.0047 to 0.0335	No	0.3364
25%:HS vs. 25%:HSMC	0.0132	-0.0059 to 0.0323	No	0.4759
25%:HS vs. 50%:HS	-0.0287	-0.0478 to -0.0096	Si	0.0002
25%:HS vs. 50%:MC	0.0001	-0.019 to 0.0192	No	>0.9999
25%:HS vs. 50%:HSMC	0.0033	-0.0158 to 0.0224	No	>0.9999
25%:HS vs. 75%:HS	-0.0507	-0.0699 to -0.0316	Si	<0.0001
25%:HS vs. 75%:MC	-0.0137	-0.0328 to 0.0054	No	0.4187
25%:HS vs. 75%:HSMC	-0.0136	-0.0328 to 0.0055	No	0.4222
25%:HS vs. 100%:HS	-0.0904	-0.1095 to -0.0713	Si	<0.0001
25%:HS vs. 100%:MC	-0.0245	-0.0436 to -0.0054	Si	0.0028
25%:HS vs. 100%:HSMC	-0.0180	-0.0371 to 0.0011	No	0.0825
25%:MC vs. 25%:HSMC	-0.0012	-0.0203 to 0.0179	No	>0.9999
25%:MC vs. 50%:HS	-0.0431	-0.0622 to -0.024	Si	<0.0001
25%:MC vs. 50%:MC	-0.0143	-0.0334 to 0.0048	No	0.3476
25%:MC vs. 50%:HSMC	-0.0111	-0.0302 to 0.008	No	0.7369
25%:MC vs. 75%:HS	-0.0651	-0.0843 to -0.046	Si	<0.0001
25%:MC vs. 75%:MC	-0.0281	-0.0472 to -0.009	Si	0.0003
25%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0280	-0.0472 to -0.0089	Si	0.0003
25%:MC vs. 100%:HS	-0.1048	-0.1239 to -0.0857	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:MC	-0.0389	-0.058 to -0.0198	Si	<0.0001
25%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0324	-0.0515 to -0.0133	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:HS	-0.0419	-0.061 to -0.0228	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 50%:MC	-0.0131	-0.0322 to 0.006	No	0.4889
25%:HSMC vs. 50%:HSMC	-0.0099	-0.029 to 0.0092	No	0.8595
25%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0639	-0.0831 to -0.0448	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0269	-0.046 to -0.0078	Si	0.0007
25%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0268	-0.046 to -0.0077	Si	0.0007
25%:HSMC vs. 100%:HS	-0.1036	-0.1227 to -0.0845	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0377	-0.0568 to -0.0186	Si	<0.0001
25%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0312	-0.0503 to -0.0121	Si	<0.0001
50%:HS vs. 50%:MC	0.0288	0.0097 to 0.0479	Si	0.0002
50%:HS vs. 50%:HSMC	0.0320	0.0129 to 0.0511	Si	<0.0001
50%:HS vs. 75%:HS	-0.0220	-0.0411 to -0.0029	Si	0.0113
50%:HS vs. 75%:MC	0.0151	-0.0041 to 0.0342	No	0.2709
50%:HS vs. 75%:HSMC	0.0151	-0.004 to 0.0342	No	0.2681
50%:HS vs. 100%:HS	-0.0616	-0.0808 to -0.0425	Si	<0.0001
50%:HS vs. 100%:MC	0.0042	-0.0149 to 0.0233	No	>0.9999
50%:HS vs. 100%:HSMC	0.0107	-0.0084 to 0.0298	No	0.7837
50%:MC vs. 50%:HSMC	0.0032	-0.0159 to 0.0223	No	>0.9999

50%:MC vs. 75%:HS	-0.0509	-0.07 to -0.0317	Si	<0.0001
50%:MC vs. 75%:MC	-0.0138	-0.0329 to 0.0053	No	0.4064
50%:MC vs. 75%:HSMC	-0.0138	-0.0329 to 0.0054	No	0.4099
50%:MC vs. 100%:HS	-0.0905	-0.1096 to -0.0714	Si	<0.0001
50%:MC vs. 100%:MC	-0.0246	-0.0438 to -0.0055	Si	0.0026
50%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0181	-0.0372 to 0.001	No	0.0788
50%:HSMC vs. 75%:HS	-0.0540	-0.0731 to -0.0349	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 75%:MC	-0.0170	-0.0361 to 0.0022	No	0.1314
50%:HSMC vs. 75%:HSMC	-0.0169	-0.036 to 0.0022	No	0.133
50%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0937	-0.1128 to -0.0745	Si	<0.0001
50%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0278	-0.0469 to -0.0087	Si	0.0004
50%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0213	-0.0404 to -0.0022	Si	0.0164
75%:HS vs. 75%:MC	0.0371	0.018 to 0.0562	Si	<0.0001
75%:HS vs. 75%:HSMC	0.0371	0.018 to 0.0562	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:HS	-0.0396	-0.0587 to -0.0205	Si	<0.0001
75%:HS vs. 100%:MC	0.0262	0.0071 to 0.0453	Si	0.001
75%:HS vs. 100%:HSMC	0.0327	0.0136 to 0.0518	Si	<0.0001
75%:MC vs. 75%:HSMC	0.0000	-0.0191 to 0.0191	No	>0.9999
75%:MC vs. 100%:HS	-0.0767	-0.0958 to -0.0576	Si	<0.0001
75%:MC vs. 100%:MC	-0.0109	-0.03 to 0.0082	No	0.7658
75%:MC vs. 100%:HSMC	-0.0044	-0.0235 to 0.0148	No	>0.9999
75%:HSMC vs. 100%:HS	-0.0767	-0.0958 to -0.0576	Si	<0.0001
75%:HSMC vs. 100%:MC	-0.0109	-0.03 to 0.0082	No	0.7625
75%:HSMC vs. 100%:HSMC	-0.0044	-0.0235 to 0.0147	No	>0.9999
100%:HS vs. 100%:MC	0.0658	0.0467 to 0.0849	Si	<0.0001
100%:HS vs. 100%:HSMC	0.0723	0.0532 to 0.0914	Si	<0.0001
100%:MC vs. 100%:HSMC	0.0065	-0.0126 to 0.0256	No	0.9953

### Anexo 13

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HS para los diferentes tiempos de inmovilización con 48 h de liberación*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	0.0004	-0.0246 to 0.0254	No	>0.9999
0%:6 H vs. 0%:24 H	0.0037	-0.0213 to 0.0287	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:6 H	-0.0153	-0.042 to 0.0114	No	0.7458
0%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0173	-0.0423 to 0.0077	No	0.4589
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0252	-0.0502 to -0.0002	Si	0.0467
0%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0259	-0.0527 to 0.0008	No	0.0646
0%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0288	-0.0538 to -0.0038	Si	0.0119
0%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0539	-0.0789 to -0.0289	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0483	-0.0751 to -0.0216	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0533	-0.0801 to -0.0266	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0759	-0.1009 to -0.0509	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0957	-0.1224 to -0.069	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0876	-0.1126 to -0.0626	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:24 H	-0.1155	-0.1405 to -0.0906	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 0%:24 H	0.0034	-0.0198 to 0.0265	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:6 H	-0.0157	-0.0407 to 0.0093	No	0.6199
0%:12 H vs. 25%:12 H	-0.0177	-0.0408 to 0.0054	No	0.3065
0%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0256	-0.0487 to -0.0024	Si	0.0189
0%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0263	-0.0513 to -0.0013	Si	0.0309
0%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0291	-0.0523 to -0.006	Si	0.0039
0%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0543	-0.0774 to -0.0311	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0487	-0.0737 to -0.0237	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0537	-0.0787 to -0.0287	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0763	-0.0994 to -0.0532	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0961	-0.1211 to -0.0711	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0880	-0.1111 to -0.0648	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:24 H	-0.1159	-0.139 to -0.0928	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 25%:6 H	-0.0190	-0.044 to 0.006	No	0.3132
0%:24 H vs. 25%:12 H	-0.0211	-0.0442 to 0.0021	No	0.1075
0%:24 H vs. 25%:24 H	-0.0289	-0.0521 to -0.0058	Si	0.0043
0%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0297	-0.0547 to -0.0047	Si	0.0082
0%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0325	-0.0557 to -0.0094	Si	0.0008
0%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0576	-0.0808 to -0.0345	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0521	-0.0771 to -0.0271	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0571	-0.0821 to -0.0321	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0797	-0.1028 to -0.0565	Si	<0.0001

0%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0994	-0.1244 to -0.0744	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0913	-0.1145 to -0.0682	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:24 H	-0.1193	-0.1424 to -0.0961	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0020	-0.027 to 0.023	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0099	-0.0349 to 0.0151	No	0.9788
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0107	-0.0374 to 0.0161	No	0.9775
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0135	-0.0385 to 0.0115	No	0.8131
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0386	-0.0636 to -0.0136	Si	0.0002
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0330	-0.0598 to -0.0063	Si	0.005
25%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0381	-0.0648 to -0.0113	Si	0.0007
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0606	-0.0856 to -0.0356	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0804	-0.1071 to -0.0537	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0723	-0.0973 to -0.0473	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.1003	-0.1252 to -0.0753	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0079	-0.031 to 0.0153	No	0.9947
25%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0086	-0.0336 to 0.0164	No	0.9939
25%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0115	-0.0346 to 0.0117	No	0.8886
25%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0366	-0.0597 to -0.0134	Si	0.0001
25%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0310	-0.056 to -0.006	Si	0.0048
25%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0360	-0.061 to -0.011	Si	0.0005
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0586	-0.0817 to -0.0355	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0784	-0.1034 to -0.0534	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0703	-0.0934 to -0.0471	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0982	-0.1214 to -0.0751	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0008	-0.0258 to 0.0242	No	>0.9999
25%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0036	-0.0267 to 0.0196	No	>0.9999
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0287	-0.0519 to -0.0056	Si	0.0047
25%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0232	-0.0481 to 0.0018	No	0.0944
25%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0282	-0.0532 to -0.0032	Si	0.0151
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0507	-0.0739 to -0.0276	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0705	-0.0955 to -0.0455	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0624	-0.0856 to -0.0393	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0904	-0.1135 to -0.0672	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0028	-0.0278 to 0.0222	No	>0.9999
50%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0280	-0.053 to -0.003	Si	0.0164
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0224	-0.0491 to 0.0043	No	0.1873
50%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0274	-0.0541 to -0.0007	Si	0.0397
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0500	-0.075 to -0.025	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0698	-0.0965 to -0.043	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0616	-0.0866 to -0.0367	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0896	-0.1146 to -0.0646	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0251	-0.0483 to -0.002	Si	0.0225
50%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0196	-0.0446 to 0.0054	No	0.2738
50%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0246	-0.0496 to 0.0004	No	0.0581

50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0472	-0.0703 to -0.024	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0669	-0.0919 to -0.0419	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0588	-0.082 to -0.0357	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0868	-0.1099 to -0.0636	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 75%:6 H	0.0056	-0.0194 to 0.0306	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:12 H	0.0006	-0.0244 to 0.0256	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0220	-0.0452 to 0.0011	No	0.0764
50%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0418	-0.0668 to -0.0168	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0337	-0.0568 to -0.0105	Si	0.0005
50%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0616	-0.0848 to -0.0385	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0050	-0.0317 to 0.0217	No	>0.9999
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0276	-0.0526 to -0.0026	Si	0.0189
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0474	-0.0741 to -0.0207	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0393	-0.0643 to -0.0143	Si	0.0001
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0672	-0.0922 to -0.0422	Si	<0.0001
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0226	-0.0476 to 0.0024	No	0.1135
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0424	-0.0691 to -0.0156	Si	0.0001
75%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0343	-0.0592 to -0.0093	Si	0.0012
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0622	-0.0872 to -0.0372	Si	<0.0001
75%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0198	-0.0448 to 0.0052	No	0.2588
75%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0117	-0.0348 to 0.0115	No	0.8744
75%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0396	-0.0628 to -0.0165	Si	<0.0001
100%:6 H vs. 100%:12 H	0.0081	-0.0169 to 0.0331	No	0.9966
100%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0199	-0.0448 to 0.0051	No	0.2535
100%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0280	-0.0511 to -0.0048	Si	0.0067

## Anexo 14

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo MC para los diferentes tiempos de inmovilización con 48 h de liberación*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	0.0036	-0.0071 to 0.0144	No	0.9949
0%:6 H vs. 0%:24 H	0.0049	-0.0059 to 0.0156	No	0.9395
0%:6 H vs. 25%:6 H	-0.0094	-0.0208 to 0.0021	No	0.2167
0%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0070	-0.0177 to 0.0038	No	0.5671
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0079	-0.0186 to 0.0028	No	0.3661
0%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0154	-0.0269 to -0.004	Si	0.0015
0%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0112	-0.022 to -0.0005	Si	0.032
0%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0222	-0.0329 to -0.0115	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0236	-0.035 to -0.0121	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0262	-0.0369 to -0.0155	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0360	-0.0467 to -0.0252	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0426	-0.0541 to -0.0311	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0472	-0.0579 to -0.0365	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0468	-0.0575 to -0.0361	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 0%:24 H	0.0012	-0.0087 to 0.0112	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:6 H	-0.0130	-0.0237 to -0.0023	Si	0.0062
0%:12 H vs. 25%:12 H	-0.0106	-0.0205 to -0.0007	Si	0.0268
0%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0115	-0.0215 to -0.0016	Si	0.0107
0%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0191	-0.0298 to -0.0083	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0149	-0.0248 to -0.005	Si	0.0003
0%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0258	-0.0357 to -0.0159	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0272	-0.0379 to -0.0165	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0298	-0.0398 to -0.0199	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0396	-0.0495 to -0.0297	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0462	-0.057 to -0.0355	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0508	-0.0608 to -0.0409	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0505	-0.0604 to -0.0405	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 25%:6 H	-0.0142	-0.025 to -0.0035	Si	0.0019
0%:24 H vs. 25%:12 H	-0.0118	-0.0217 to -0.0019	Si	0.0079
0%:24 H vs. 25%:24 H	-0.0127	-0.0227 to -0.0028	Si	0.003
0%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0203	-0.031 to -0.0096	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0161	-0.026 to -0.0062	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0270	-0.037 to -0.0171	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0284	-0.0391 to -0.0177	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0311	-0.041 to -0.0211	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0408	-0.0507 to -0.0309	Si	<0.0001

0%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0475	-0.0582 to -0.0367	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0521	-0.062 to -0.0421	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0517	-0.0616 to -0.0418	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 25%:12 H	0.0024	-0.0083 to 0.0131	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:24 H	0.0015	-0.0092 to 0.0122	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0060	-0.0175 to 0.0054	No	0.8379
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0019	-0.0126 to 0.0089	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0128	-0.0235 to -0.0021	Si	0.0075
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0142	-0.0257 to -0.0027	Si	0.0048
25%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0168	-0.0275 to -0.0061	Si	0.0001
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0266	-0.0373 to -0.0159	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0332	-0.0447 to -0.0218	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0378	-0.0486 to -0.0271	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0375	-0.0482 to -0.0267	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0009	-0.0109 to 0.009	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0085	-0.0192 to 0.0023	No	0.264
25%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0043	-0.0142 to 0.0056	No	0.9582
25%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0152	-0.0252 to -0.0053	Si	0.0002
25%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0166	-0.0273 to -0.0059	Si	0.0002
25%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0192	-0.0292 to -0.0093	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0290	-0.0389 to -0.0191	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0356	-0.0464 to -0.0249	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0402	-0.0502 to -0.0303	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0399	-0.0498 to -0.0299	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0075	-0.0182 to 0.0032	No	0.4407
25%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0034	-0.0133 to 0.0066	No	0.9951
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0143	-0.0242 to -0.0044	Si	0.0005
25%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0157	-0.0264 to -0.005	Si	0.0004
25%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0183	-0.0282 to -0.0084	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0281	-0.038 to -0.0182	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0347	-0.0454 to -0.024	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0393	-0.0492 to -0.0294	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0389	-0.0489 to -0.029	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 50%:12 H	0.0042	-0.0065 to 0.0149	No	0.982
50%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0068	-0.0175 to 0.0039	No	0.6093
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0081	-0.0196 to 0.0033	No	0.4197
50%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0108	-0.0215 to -0.0001	Si	0.0472
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0206	-0.0313 to -0.0098	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0272	-0.0387 to -0.0157	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0318	-0.0425 to -0.0211	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0314	-0.0421 to -0.0207	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0109	-0.0209 to -0.001	Si	0.0191
50%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0123	-0.023 to -0.0016	Si	0.012
50%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0150	-0.0249 to -0.005	Si	0.0003

50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0247	-0.0346 to -0.0148	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0314	-0.0421 to -0.0206	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0360	-0.0459 to -0.026	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0356	-0.0455 to -0.0257	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0014	-0.0121 to 0.0093	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0040	-0.0139 to 0.0059	No	0.975
50%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0138	-0.0237 to -0.0039	Si	0.001
50%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0204	-0.0311 to -0.0097	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0250	-0.0349 to -0.0151	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0246	-0.0346 to -0.0147	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0026	-0.0134 to 0.0081	No	0.9998
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0124	-0.0231 to -0.0017	Si	0.0112
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0190	-0.0305 to -0.0076	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0236	-0.0344 to -0.0129	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0233	-0.034 to -0.0125	Si	<0.0001
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0098	-0.0197 to 0.0002	No	0.0579
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0164	-0.0271 to -0.0057	Si	0.0002
75%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0210	-0.0309 to -0.0111	Si	<0.0001
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0206	-0.0305 to -0.0107	Si	<0.0001
75%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0066	-0.0174 to 0.0041	No	0.6379
75%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0112	-0.0212 to -0.0013	Si	0.0141
75%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0109	-0.0208 to -0.0009	Si	0.0207
100%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0046	-0.0153 to 0.0061	No	0.9599
100%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0042	-0.0149 to 0.0065	No	0.9803
100%:12 H vs. 100%:24 H	0.0004	-0.0095 to 0.0103	No	>0.9999

## Anexo 15

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HSMC para los diferentes tiempos de inmovilización con 48 h de liberación*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	0.0006	-0.0112 to 0.0124	No	>0.9999
0%:6 H vs. 0%:24 H	0.0037	-0.0081 to 0.0155	No	0.9976
0%:6 H vs. 25%:6 H	-0.0069	-0.0187 to 0.0049	No	0.7207
0%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0057	-0.0175 to 0.0061	No	0.9115
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0073	-0.0191 to 0.0045	No	0.6528
0%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0167	-0.0285 to -0.0049	Si	0.0006
0%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0106	-0.0224 to 0.0012	No	0.1201
0%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0172	-0.029 to -0.0054	Si	0.0004
0%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0277	-0.0403 to -0.0151	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0197	-0.0315 to -0.0078	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0341	-0.0459 to -0.0223	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0355	-0.0481 to -0.0229	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0334	-0.0452 to -0.0215	Si	<0.0001
0%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0385	-0.0503 to -0.0267	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 0%:24 H	0.0032	-0.0078 to 0.0141	No	0.9991
0%:12 H vs. 25%:6 H	-0.0075	-0.0184 to 0.0034	No	0.4825
0%:12 H vs. 25%:12 H	-0.0062	-0.0172 to 0.0047	No	0.7539
0%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0078	-0.0188 to 0.0031	No	0.4098
0%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0173	-0.0282 to -0.0064	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0112	-0.0221 to -0.0002	Si	0.041
0%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0178	-0.0287 to -0.0068	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0283	-0.0401 to -0.0165	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0202	-0.0312 to -0.0093	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0347	-0.0456 to -0.0238	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0360	-0.0478 to -0.0242	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0339	-0.0448 to -0.023	Si	<0.0001
0%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0391	-0.05 to -0.0281	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 25%:6 H	-0.0107	-0.0216 to 0.0003	No	0.0628
0%:24 H vs. 25%:12 H	-0.0094	-0.0203 to 0.0015	No	0.1607
0%:24 H vs. 25%:24 H	-0.0110	-0.0219 to -0.0001	Si	0.0474
0%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0205	-0.0314 to -0.0095	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0143	-0.0252 to -0.0034	Si	0.0022
0%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0209	-0.0318 to -0.01	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0314	-0.0432 to -0.0196	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0234	-0.0343 to -0.0125	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0378	-0.0488 to -0.0269	Si	<0.0001

0%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0392	-0.051 to -0.0274	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0371	-0.048 to -0.0262	Si	<0.0001
0%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0422	-0.0531 to -0.0313	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 25%:12 H	0.0012	-0.0097 to 0.0122	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0003	-0.0113 to 0.0106	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.0098	-0.0207 to 0.0011	No	0.1193
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0037	-0.0146 to 0.0073	No	0.9956
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0103	-0.0212 to 0.0007	No	0.0853
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0208	-0.0326 to -0.009	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0127	-0.0237 to -0.0018	Si	0.0101
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0272	-0.0381 to -0.0163	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0286	-0.0404 to -0.0168	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0264	-0.0374 to -0.0155	Si	<0.0001
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0316	-0.0425 to -0.0207	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0016	-0.0125 to 0.0093	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0111	-0.022 to -0.0001	Si	0.0445
25%:12 H vs. 50%:12 H	-0.0049	-0.0159 to 0.006	No	0.9441
25%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0115	-0.0224 to -0.0006	Si	0.0305
25%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0220	-0.0338 to -0.0102	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0140	-0.0249 to -0.0031	Si	0.003
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0284	-0.0394 to -0.0175	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0298	-0.0416 to -0.018	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0277	-0.0386 to -0.0168	Si	<0.0001
25%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0328	-0.0438 to -0.0219	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 50%:6 H	-0.0095	-0.0204 to 0.0015	No	0.1525
25%:24 H vs. 50%:12 H	-0.0033	-0.0143 to 0.0076	No	0.9984
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0099	-0.0208 to 0.001	No	0.1107
25%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0204	-0.0322 to -0.0086	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0124	-0.0233 to -0.0015	Si	0.0139
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0268	-0.0378 to -0.0159	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0282	-0.04 to -0.0164	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0261	-0.037 to -0.0152	Si	<0.0001
25%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0312	-0.0422 to -0.0203	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 50%:12 H	0.0061	-0.0048 to 0.0171	No	0.773
50%:6 H vs. 50%:24 H	-0.0004	-0.0114 to 0.0105	No	>0.9999
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0110	-0.0228 to 0.0008	No	0.0925
50%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0029	-0.0138 to 0.008	No	0.9996
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0174	-0.0283 to -0.0064	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0187	-0.0305 to -0.0069	Si	<0.0001
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0166	-0.0275 to -0.0057	Si	0.0002
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0218	-0.0327 to -0.0108	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 50%:24 H	-0.0066	-0.0175 to 0.0043	No	0.6822
50%:12 H vs. 75%:6 H	-0.0171	-0.0289 to -0.0053	Si	0.0005
50%:12 H vs. 75%:12 H	-0.0091	-0.02 to 0.0019	No	0.2018

50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0235	-0.0344 to -0.0126	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0249	-0.0367 to -0.0131	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0228	-0.0337 to -0.0118	Si	<0.0001
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0279	-0.0388 to -0.017	Si	<0.0001
50%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0105	-0.0223 to 0.0013	No	0.1257
50%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0025	-0.0134 to 0.0085	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0169	-0.0279 to -0.006	Si	0.0001
50%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0183	-0.0301 to -0.0065	Si	0.0001
50%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0162	-0.0271 to -0.0052	Si	0.0003
50%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0213	-0.0322 to -0.0104	Si	<0.0001
75%:6 H vs. 75%:12 H	0.0081	-0.0037 to 0.0199	No	0.4901
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.0064	-0.0182 to 0.0054	No	0.8128
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0078	-0.0204 to 0.0049	No	0.6527
75%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0056	-0.0174 to 0.0062	No	0.9144
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0108	-0.0226 to 0.001	No	0.1047
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.0145	-0.0254 to -0.0035	Si	0.0019
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0158	-0.0276 to -0.004	Si	0.0015
75%:12 H vs. 100%:12 H	-0.0137	-0.0246 to -0.0028	Si	0.004
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0189	-0.0298 to -0.0079	Si	<0.0001
75%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0014	-0.0132 to 0.0104	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:12 H	0.0008	-0.0102 to 0.0117	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0044	-0.0153 to 0.0065	No	0.9774
100%:6 H vs. 100%:12 H	0.0021	-0.0097 to 0.0139	No	>0.9999
100%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0030	-0.0148 to 0.0088	No	0.9997
100%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0051	-0.0161 to 0.0058	No	0.9226

## Anexo 16

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HS cuando se realizan las pruebas de compresión en los diferentes tiempos de inmovilización*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	-0.1448	-2.816 to 2.526	No	>0.9999
0%:6 H vs. 0%:24 H	-1.6050	-4.591 to 1.381	No	0.797
0%:6 H vs. 25%:6 H	0.1214	-2.549 to 2.792	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:12 H	0.0589	-2.612 to 2.730	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:24 H	-2.0860	-4.584 to 0.4127	No	0.1835
0%:6 H vs. 50%:6 H	0.0036	-2.495 to 2.502	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:12 H	-0.5248	-3.196 to 2.146	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:24 H	-2.3770	-5.048 to 0.2934	No	0.1221
0%:6 H vs. 75%:6 H	-0.4305	-3.101 to 2.240	No	>0.9999
0%:6 H vs. 75%:12 H	-1.4080	-4.394 to 1.578	No	0.9063
0%:6 H vs. 75%:24 H	-1.8300	-4.500 to 0.8412	No	0.4571
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.1301	-2.628 to 2.368	No	>0.9999
0%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0650	-2.736 to 2.606	No	>0.9999
0%:6 H vs. 100%:24 H	-1.0080	-3.679 to 1.663	No	0.9825
0%:12 H vs. 0%:24 H	-1.4600	-4.446 to 1.526	No	0.8819
0%:12 H vs. 25%:6 H	0.2662	-2.405 to 2.937	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:12 H	0.2037	-2.467 to 2.875	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:24 H	-1.9410	-4.439 to 0.5575	No	0.2708
0%:12 H vs. 50%:6 H	0.1484	-2.350 to 2.647	No	>0.9999
0%:12 H vs. 50%:12 H	-0.3799	-3.051 to 2.291	No	>0.9999
0%:12 H vs. 50%:24 H	-2.2330	-4.903 to 0.4383	No	0.1821
0%:12 H vs. 75%:6 H	-0.2857	-2.956 to 2.385	No	>0.9999
0%:12 H vs. 75%:12 H	-1.2630	-4.249 to 1.723	No	0.9564
0%:12 H vs. 75%:24 H	-1.6850	-4.356 to 0.9860	No	0.5856
0%:12 H vs. 100%:6 H	0.0148	-2.484 to 2.513	No	>0.9999
0%:12 H vs. 100%:12 H	0.0798	-2.591 to 2.751	No	>0.9999
0%:12 H vs. 100%:24 H	-0.8633	-3.534 to 1.807	No	0.9958
0%:24 H vs. 25%:6 H	1.7260	-1.260 to 4.712	No	0.7101
0%:24 H vs. 25%:12 H	1.6640	-1.322 to 4.650	No	0.7563
0%:24 H vs. 25%:24 H	-0.4806	-3.313 to 2.352	No	>0.9999
0%:24 H vs. 50%:6 H	1.6090	-1.224 to 4.441	No	0.7332
0%:24 H vs. 50%:12 H	1.0800	-1.906 to 4.066	No	0.9879
0%:24 H vs. 50%:24 H	-0.7724	-3.758 to 2.214	No	0.9996
0%:24 H vs. 75%:6 H	1.1740	-1.812 to 4.161	No	0.9754
0%:24 H vs. 75%:12 H	0.1971	-3.074 to 3.468	No	>0.9999
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.2247	-3.211 to 2.761	No	>0.9999

0%:24 H vs. 100%:6 H	1.4750	-1.358 to 4.308	No	0.8292
0%:24 H vs. 100%:12 H	1.5400	-1.446 to 4.526	No	0.8381
0%:24 H vs. 100%:24 H	0.5968	-2.389 to 3.583	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0625	-2.733 to 2.608	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:24 H	-2.2070	-4.705 to 0.2913	No	0.1286
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.1178	-2.616 to 2.380	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.6462	-3.317 to 2.025	No	0.9998
25%:6 H vs. 50%:24 H	-2.4990	-5.170 to 0.1720	No	0.0855
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.5519	-3.223 to 2.119	No	>0.9999
25%:6 H vs. 75%:12 H	-1.5290	-4.515 to 1.457	No	0.8444
25%:6 H vs. 75%:24 H	-1.9510	-4.622 to 0.7198	No	0.3582
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.2515	-2.750 to 2.247	No	>0.9999
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.1864	-2.857 to 2.484	No	>0.9999
25%:6 H vs. 100%:24 H	-1.1300	-3.800 to 1.541	No	0.9565
25%:12 H vs. 25%:24 H	-2.1450	-4.643 to 0.3538	No	0.1549
25%:12 H vs. 50%:6 H	-0.0553	-2.554 to 2.443	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:12 H	-0.5837	-3.254 to 2.087	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:24 H	-2.4360	-5.107 to 0.2345	No	0.103
25%:12 H vs. 75%:6 H	-0.4894	-3.160 to 2.181	No	>0.9999
25%:12 H vs. 75%:12 H	-1.4670	-4.453 to 1.519	No	0.8785
25%:12 H vs. 75%:24 H	-1.8890	-4.559 to 0.7823	No	0.4077
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.1890	-2.687 to 2.309	No	>0.9999
25%:12 H vs. 100%:12 H	-0.1239	-2.795 to 2.547	No	>0.9999
25%:12 H vs. 100%:24 H	-1.0670	-3.738 to 1.604	No	0.9721
25%:24 H vs. 50%:6 H	2.0890	-0.2238 to 4.402	No	0.1104
25%:24 H vs. 50%:12 H	1.5610	-0.9375 to 4.059	No	0.6002
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.2917	-2.790 to 2.207	No	>0.9999
25%:24 H vs. 75%:6 H	1.6550	-0.8432 to 4.153	No	0.5097
25%:24 H vs. 75%:12 H	0.6778	-2.155 to 3.511	No	0.9998
25%:24 H vs. 75%:24 H	0.2560	-2.242 to 2.754	No	>0.9999
25%:24 H vs. 100%:6 H	1.9560	-0.3574 to 4.269	No	0.1701
25%:24 H vs. 100%:12 H	2.0210	-0.4777 to 4.519	No	0.2197
25%:24 H vs. 100%:24 H	1.0770	-1.421 to 3.576	No	0.9496
50%:6 H vs. 50%:12 H	-0.5283	-3.027 to 1.970	No	>0.9999
50%:6 H vs. 50%:24 H	-2.3810	-4.879 to 0.1174	No	0.0742
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.4341	-2.932 to 2.064	No	>0.9999
50%:6 H vs. 75%:12 H	-1.4110	-4.244 to 1.421	No	0.8676
50%:6 H vs. 75%:24 H	-1.8330	-4.332 to 0.6651	No	0.3515
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.1336	-2.447 to 2.179	No	>0.9999
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0686	-2.567 to 2.430	No	>0.9999
50%:6 H vs. 100%:24 H	-1.0120	-3.510 to 1.487	No	0.9689
50%:12 H vs. 50%:24 H	-1.8530	-4.523 to 0.8182	No	0.4376
50%:12 H vs. 75%:6 H	0.0943	-2.577 to 2.765	No	>0.9999
50%:12 H vs. 75%:12 H	-0.8831	-3.869 to 2.103	No	0.9983

50%:12 H vs. 75%:24 H	-1.3050	-3.976 to 1.366	No	0.8825
50%:12 H vs. 100%:6 H	0.3947	-2.104 to 2.893	No	>0.9999
50%:12 H vs. 100%:12 H	0.4598	-2.211 to 3.131	No	>0.9999
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.4834	-3.154 to 2.187	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:6 H	1.9470	-0.7239 to 4.618	No	0.3614
50%:24 H vs. 75%:12 H	0.9695	-2.017 to 3.956	No	0.9956
50%:24 H vs. 75%:24 H	0.5477	-2.123 to 3.219	No	>0.9999
50%:24 H vs. 100%:6 H	2.2470	-0.2510 to 4.746	No	0.1136
50%:24 H vs. 100%:12 H	2.3120	-0.3584 to 4.983	No	0.1467
50%:24 H vs. 100%:24 H	1.3690	-1.302 to 4.040	No	0.8435
75%:6 H vs. 75%:12 H	-0.9774	-3.963 to 2.009	No	0.9952
75%:6 H vs. 75%:24 H	-1.3990	-4.070 to 1.272	No	0.8232
75%:6 H vs. 100%:6 H	0.3005	-2.198 to 2.799	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:12 H	0.3655	-2.305 to 3.036	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.5777	-3.248 to 2.093	No	>0.9999
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.4218	-3.408 to 2.564	No	>0.9999
75%:12 H vs. 100%:6 H	1.2780	-1.555 to 4.111	No	0.9305
75%:12 H vs. 100%:12 H	1.3430	-1.643 to 4.329	No	0.932
75%:12 H vs. 100%:24 H	0.3997	-2.586 to 3.386	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:6 H	1.7000	-0.7987 to 4.198	No	0.468
75%:24 H vs. 100%:12 H	1.7650	-0.9062 to 4.435	No	0.5139
75%:24 H vs. 100%:24 H	0.8215	-1.849 to 3.492	No	0.9974
100%:6 H vs. 100%:12 H	0.0651	-2.433 to 2.563	No	>0.9999
100%:6 H vs. 100%:24 H	-0.8781	-3.376 to 1.620	No	0.9907
100%:12 H vs. 100%:24 H	-0.9432	-3.614 to 1.728	No	0.9903

## Anexo 17

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo MC cuando se realizan las pruebas de compresión en los diferentes tiempos de inmovilización*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
0%:6 H vs. 0%:24 H	-0.341	-1.230 to 0.5485	No	0.9836
0%:6 H vs. 25%:6 H	0.0520	-0.8375 to 0.9414	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:12 H	0	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.1308	-1.082 to 0.8202	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:6 H	0.1057	-0.7838 to 0.9951	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:12 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:24 H	-0.1807	-1.132 to 0.7702	No	>0.9999
0%:6 H vs. 75%:6 H	0.0833	-0.8062 to 0.9728	No	>0.9999
0%:6 H vs. 75%:12 H	0.1249	-0.7646 to 1.014	No	>0.9999
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.1693	-1.059 to 0.7202	No	>0.9999
0%:6 H vs. 100%:6 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
0%:6 H vs. 100%:12 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
0%:6 H vs. 100%:24 H	-1E-09	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
0%:12 H vs. 0%:24 H	-0.341	-1.230 to 0.5485	No	0.9836
0%:12 H vs. 25%:6 H	0.0520	-0.8375 to 0.9414	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:12 H	0	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:24 H	-0.1308	-1.082 to 0.8202	No	>0.9999
0%:12 H vs. 50%:6 H	0.1057	-0.7838 to 0.9951	No	>0.9999
0%:12 H vs. 50%:12 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
0%:12 H vs. 50%:24 H	-0.1807	-1.132 to 0.7702	No	>0.9999
0%:12 H vs. 75%:6 H	0.0833	-0.8062 to 0.9728	No	>0.9999
0%:12 H vs. 75%:12 H	0.1249	-0.7646 to 1.014	No	>0.9999
0%:12 H vs. 75%:24 H	-0.1693	-1.059 to 0.7202	No	>0.9999
0%:12 H vs. 100%:6 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
0%:12 H vs. 100%:12 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
0%:12 H vs. 100%:24 H	-1E-09	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
0%:24 H vs. 25%:6 H	0.3929	-0.4306 to 1.216	No	0.9108
0%:24 H vs. 25%:12 H	0.341	-0.4826 to 1.164	No	0.9687
0%:24 H vs. 25%:24 H	0.2102	-0.6793 to 1.100	No	0.9999
0%:24 H vs. 50%:6 H	0.4466	-0.3769 to 1.270	No	0.8056
0%:24 H vs. 50%:12 H	0.341	-0.5485 to 1.230	No	0.9836
0%:24 H vs. 50%:24 H	0.1602	-0.7293 to 1.050	No	>0.9999
0%:24 H vs. 75%:6 H	0.4243	-0.3993 to 1.248	No	0.8549
0%:24 H vs. 75%:12 H	0.4659	-0.3576 to 1.289	No	0.7577
0%:24 H vs. 75%:24 H	0.1716	-0.6519 to 0.9951	No	>0.9999

0%:24 H vs. 100%:6 H	0.341	-0.5485 to 1.230	No	0.9836
0%:24 H vs. 100%:12 H	0.341	-0.5485 to 1.230	No	0.9836
0%:24 H vs. 100%:24 H	0.341	-0.4826 to 1.164	No	0.9687
25%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0520	-0.8755 to 0.7716	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:24 H	-0.1827	-1.072 to 0.7068	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:6 H	0.0537	-0.7698 to 0.8772	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0520	-0.9414 to 0.8375	No	>0.9999
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.2327	-1.122 to 0.6568	No	0.9996
25%:6 H vs. 75%:6 H	0.0314	-0.7922 to 0.8549	No	>0.9999
25%:6 H vs. 75%:12 H	0.0730	-0.7505 to 0.8965	No	>0.9999
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.2213	-1.045 to 0.6022	No	0.9995
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0520	-0.9414 to 0.8375	No	>0.9999
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0520	-0.9414 to 0.8375	No	>0.9999
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0520	-0.8755 to 0.7716	No	>0.9999
25%:12 H vs. 25%:24 H	-0.1308	-1.020 to 0.7587	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:6 H	0.1057	-0.7179 to 0.9292	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:12 H	0	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:24 H	-0.1807	-1.070 to 0.7088	No	>0.9999
25%:12 H vs. 75%:6 H	0.0833	-0.7402 to 0.9068	No	>0.9999
25%:12 H vs. 75%:12 H	0.1249	-0.6986 to 0.9484	No	>0.9999
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.1693	-0.9929 to 0.6542	No	>0.9999
25%:12 H vs. 100%:6 H	0	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
25%:12 H vs. 100%:12 H	0	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
25%:12 H vs. 100%:24 H	-1E-09	-0.8235 to 0.8235	No	>0.9999
25%:24 H vs. 50%:6 H	0.2364	-0.6531 to 1.126	No	0.9996
25%:24 H vs. 50%:12 H	0.1308	-0.8202 to 1.082	No	>0.9999
25%:24 H vs. 50%:24 H	-0.0500	-1.001 to 0.9009	No	>0.9999
25%:24 H vs. 75%:6 H	0.2141	-0.6754 to 1.104	No	0.9999
25%:24 H vs. 75%:12 H	0.2557	-0.6338 to 1.145	No	0.999
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0386	-0.9281 to 0.8509	No	>0.9999
25%:24 H vs. 100%:6 H	0.1308	-0.8202 to 1.082	No	>0.9999
25%:24 H vs. 100%:12 H	0.1308	-0.8202 to 1.082	No	>0.9999
25%:24 H vs. 100%:24 H	0.1308	-0.7587 to 1.020	No	>0.9999
50%:6 H vs. 50%:12 H	-0.1057	-0.9951 to 0.7838	No	>0.9999
50%:6 H vs. 50%:24 H	-0.2864	-1.176 to 0.6031	No	0.9968
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0224	-0.8459 to 0.8012	No	>0.9999
50%:6 H vs. 75%:12 H	0.0193	-0.8042 to 0.8428	No	>0.9999
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.275	-1.099 to 0.5485	No	0.9954
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.1057	-0.9951 to 0.7838	No	>0.9999
50%:6 H vs. 100%:12 H	-0.1057	-0.9951 to 0.7838	No	>0.9999
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.1057	-0.9292 to 0.7179	No	>0.9999
50%:12 H vs. 50%:24 H	-0.1807	-1.132 to 0.7702	No	>0.9999
50%:12 H vs. 75%:6 H	0.0833	-0.8062 to 0.9728	No	>0.9999
50%:12 H vs. 75%:12 H	0.1249	-0.7646 to 1.014	No	>0.9999

50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.1693	-1.059 to 0.7202	No	>0.9999
50%:12 H vs. 100%:6 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
50%:12 H vs. 100%:12 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
50%:12 H vs. 100%:24 H	-1E-09	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:6 H	0.264	-0.6255 to 1.154	No	0.9986
50%:24 H vs. 75%:12 H	0.3057	-0.5838 to 1.195	No	0.9939
50%:24 H vs. 75%:24 H	0.0114	-0.8781 to 0.9009	No	>0.9999
50%:24 H vs. 100%:6 H	0.1807	-0.7702 to 1.132	No	>0.9999
50%:24 H vs. 100%:12 H	0.1807	-0.7702 to 1.132	No	>0.9999
50%:24 H vs. 100%:24 H	0.1807	-0.7088 to 1.070	No	>0.9999
75%:6 H vs. 75%:12 H	0.0416	-0.7819 to 0.8651	No	>0.9999
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.2526	-1.076 to 0.5709	No	0.998
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.0833	-0.9728 to 0.8062	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:12 H	-0.0833	-0.9728 to 0.8062	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0833	-0.9068 to 0.7402	No	>0.9999
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.2943	-1.118 to 0.5292	No	0.9912
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.1249	-1.014 to 0.7646	No	>0.9999
75%:12 H vs. 100%:12 H	-0.1249	-1.014 to 0.7646	No	>0.9999
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.1249	-0.9484 to 0.6986	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:6 H	0.1693	-0.7202 to 1.059	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:12 H	0.1693	-0.7202 to 1.059	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:24 H	0.1693	-0.6542 to 0.9929	No	>0.9999
100%:6 H vs. 100%:12 H	0	-0.9509 to 0.9509	No	>0.9999
100%:6 H vs. 100%:24 H	-1E-09	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999
100%:12 H vs. 100%:24 H	-1E-09	-0.8895 to 0.8895	No	>0.9999

## Anexo 18

*Tabla análisis ANOVA de dos vías (prueba de Tukey) de los datos obtenidos en el cultivo HSMC cuando se realizan las pruebas de compresión en los diferentes tiempos de inmovilización*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey	Diferencia media	95% IC de diferencia	¿Significativo?	Valor P ajustado
0%:6 H vs. 0%:12 H	-0.1935	-0.9579 to 0.5710	No	0.9997
0%:6 H vs. 0%:24 H	-0.1321	-0.8966 to 0.6323	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:6 H	0.4526	-0.2625 to 1.168	No	0.584
0%:6 H vs. 25%:12 H	-0.0334	-0.7485 to 0.6816	No	>0.9999
0%:6 H vs. 25%:24 H	-0.0543	-0.9089 to 0.8004	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:6 H	0.1480	-0.6165 to 0.9124	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:12 H	0.0695	-0.6950 to 0.8339	No	>0.9999
0%:6 H vs. 50%:24 H	0.1748	-0.5896 to 0.9393	No	>0.9999
0%:6 H vs. 75%:6 H	0.0931	-0.6220 to 0.8081	No	>0.9999
0%:6 H vs. 75%:12 H	0.0924	-0.6721 to 0.8568	No	>0.9999
0%:6 H vs. 75%:24 H	-0.1555	-0.9199 to 0.6089	No	>0.9999
0%:6 H vs. 100%:6 H	-0.2490	-1.013 to 0.5154	No	0.9956
0%:6 H vs. 100%:12 H	0.1737	-0.5414 to 0.8887	No	0.9998
0%:6 H vs. 100%:24 H	-0.0799	-0.9345 to 0.7748	No	>0.9999
0%:12 H vs. 0%:24 H	0.0613	-0.7031 to 0.8258	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:6 H	0.6461	-0.06900 to 1.361	No	0.1107
0%:12 H vs. 25%:12 H	0.1600	-0.5550 to 0.8751	No	>0.9999
0%:12 H vs. 25%:24 H	0.1392	-0.7155 to 0.9938	No	>0.9999
0%:12 H vs. 50%:6 H	0.3414	-0.4230 to 1.106	No	0.9367
0%:12 H vs. 50%:12 H	0.2629	-0.5015 to 1.027	No	0.9926
0%:12 H vs. 50%:24 H	0.3683	-0.3961 to 1.133	No	0.8945
0%:12 H vs. 75%:6 H	0.2865	-0.4285 to 1.002	No	0.9722
0%:12 H vs. 75%:12 H	0.2858	-0.4786 to 1.050	No	0.9844
0%:12 H vs. 75%:24 H	0.0380	-0.7265 to 0.8024	No	>0.9999
0%:12 H vs. 100%:6 H	-0.0556	-0.8200 to 0.7089	No	>0.9999
0%:12 H vs. 100%:12 H	0.3671	-0.3479 to 1.082	No	0.8448
0%:12 H vs. 100%:24 H	0.1136	-0.7411 to 0.9682	No	>0.9999
0%:24 H vs. 25%:6 H	0.5847	-0.1303 to 1.300	No	0.208
0%:24 H vs. 25%:12 H	0.0987	-0.6163 to 0.8138	No	>0.9999
0%:24 H vs. 25%:24 H	0.0779	-0.7768 to 0.9325	No	>0.9999
0%:24 H vs. 50%:6 H	0.2801	-0.4843 to 1.045	No	0.9869
0%:24 H vs. 50%:12 H	0.2016	-0.5628 to 0.9660	No	0.9995
0%:24 H vs. 50%:24 H	0.3070	-0.4574 to 1.071	No	0.9717
0%:24 H vs. 75%:6 H	0.2252	-0.4898 to 0.9403	No	0.9968

0%:24 H vs. 75%:12 H	0.2245	-0.5399 to 0.9889	No	0.9984
0%:24 H vs. 75%:24 H	-0.0234	-0.7878 to 0.7411	No	>0.9999
0%:24 H vs. 100%:6 H	-0.1169	-0.8813 to 0.6475	No	>0.9999
0%:24 H vs. 100%:12 H	0.3058	-0.4092 to 1.021	No	0.9539
0%:24 H vs. 100%:24 H	0.0523	-0.8024 to 0.9069	No	>0.9999
25%:6 H vs. 25%:12 H	-0.4860	-1.148 to 0.1760	No	0.3533
25%:6 H vs. 25%:24 H	-0.5069	-1.318 to 0.3039	No	0.6028
25%:6 H vs. 50%:6 H	-0.3046	-1.020 to 0.4104	No	0.9552
25%:6 H vs. 50%:12 H	-0.3831	-1.098 to 0.3319	No	0.8034
25%:6 H vs. 50%:24 H	-0.2778	-0.9928 to 0.4373	No	0.9785
25%:6 H vs. 75%:6 H	-0.3595	-1.022 to 0.3025	No	0.7889
25%:6 H vs. 75%:12 H	-0.3602	-1.075 to 0.3548	No	0.8611
25%:6 H vs. 75%:24 H	-0.6081	-1.323 to 0.1070	No	0.1651
25%:6 H vs. 100%:6 H	-0.7016	-1.417 to 0.01343	No	0.0587
25%:6 H vs. 100%:12 H	-0.2789	-0.9409 to 0.3831	No	0.9588
25%:6 H vs. 100%:24 H	-0.5325	-1.343 to 0.2783	No	0.5268
25%:12 H vs. 25%:24 H	-0.0209	-0.8317 to 0.7899	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:6 H	0.1814	-0.5337 to 0.8965	No	0.9997
25%:12 H vs. 50%:12 H	0.1029	-0.6122 to 0.8180	No	>0.9999
25%:12 H vs. 50%:24 H	0.2083	-0.5068 to 0.9233	No	0.9986
25%:12 H vs. 75%:6 H	0.1265	-0.5355 to 0.7885	No	>0.9999
25%:12 H vs. 75%:12 H	0.1258	-0.5893 to 0.8409	No	>0.9999
25%:12 H vs. 75%:24 H	-0.1221	-0.8371 to 0.5930	No	>0.9999
25%:12 H vs. 100%:6 H	-0.2156	-0.9307 to 0.4995	No	0.998
25%:12 H vs. 100%:12 H	0.2071	-0.4549 to 0.8691	No	0.997
25%:12 H vs. 100%:24 H	-0.0465	-0.8573 to 0.7643	No	>0.9999
25%:24 H vs. 50%:6 H	0.2023	-0.6524 to 1.057	No	0.9999
25%:24 H vs. 50%:12 H	0.1238	-0.7309 to 0.9784	No	>0.9999
25%:24 H vs. 50%:24 H	0.2291	-0.6255 to 1.084	No	0.9994
25%:24 H vs. 75%:6 H	0.1474	-0.6634 to 0.9582	No	>0.9999
25%:24 H vs. 75%:12 H	0.1467	-0.7080 to 1.001	No	>0.9999
25%:24 H vs. 75%:24 H	-0.1012	-0.9559 to 0.7534	No	>0.9999
25%:24 H vs. 100%:6 H	-0.1947	-1.049 to 0.6599	No	>0.9999
25%:24 H vs. 100%:12 H	0.2280	-0.5828 to 1.039	No	0.999
25%:24 H vs. 100%:24 H	-0.0256	-0.9618 to 0.9106	No	>0.9999
50%:6 H vs. 50%:12 H	-0.0785	-0.8429 to 0.6859	No	>0.9999
50%:6 H vs. 50%:24 H	0.0269	-0.7376 to 0.7913	No	>0.9999
50%:6 H vs. 75%:6 H	-0.0549	-0.7700 to 0.6602	No	>0.9999
50%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0556	-0.8200 to 0.7088	No	>0.9999
50%:6 H vs. 75%:24 H	-0.3035	-1.068 to 0.4609	No	0.9742
50%:6 H vs. 100%:6 H	-0.3970	-1.161 to 0.3674	No	0.8343
50%:6 H vs. 100%:12 H	0.0257	-0.6894 to 0.7408	No	>0.9999
50%:6 H vs. 100%:24 H	-0.2279	-1.083 to 0.6268	No	0.9994
50%:12 H vs. 50%:24 H	0.1054	-0.6591 to 0.8698	No	>0.9999

50%:12 H vs. 75%:6 H	0.0236	-0.6915 to 0.7387	No	>0.9999
50%:12 H vs. 75%:12 H	0.0229	-0.7415 to 0.7873	No	>0.9999
50%:12 H vs. 75%:24 H	-0.2250	-0.9894 to 0.5394	No	0.9984
50%:12 H vs. 100%:6 H	-0.3185	-1.083 to 0.4459	No	0.9622
50%:12 H vs. 100%:12 H	0.1042	-0.6109 to 0.8193	No	>0.9999
50%:12 H vs. 100%:24 H	-0.1494	-1.004 to 0.7053	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:6 H	-0.0818	-0.7968 to 0.6333	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:12 H	-0.0825	-0.8469 to 0.6820	No	>0.9999
50%:24 H vs. 75%:24 H	-0.3304	-1.095 to 0.4341	No	0.9502
50%:24 H vs. 100%:6 H	-0.4239	-1.188 to 0.3406	No	0.7653
50%:24 H vs. 100%:12 H	-0.0012	-0.7162 to 0.7139	No	>0.9999
50%:24 H vs. 100%:24 H	-0.2547	-1.109 to 0.5999	No	0.9982
75%:6 H vs. 75%:12 H	-0.0007	-0.7158 to 0.7144	No	>0.9999
75%:6 H vs. 75%:24 H	-0.2486	-0.9636 to 0.4665	No	0.9919
75%:6 H vs. 100%:6 H	-0.3421	-1.057 to 0.3730	No	0.8991
75%:6 H vs. 100%:12 H	0.0806	-0.5814 to 0.7426	No	>0.9999
75%:6 H vs. 100%:24 H	-0.1730	-0.9838 to 0.6378	No	>0.9999
75%:12 H vs. 75%:24 H	-0.2479	-1.012 to 0.5165	No	0.9958
75%:12 H vs. 100%:6 H	-0.3414	-1.106 to 0.4230	No	0.9367
75%:12 H vs. 100%:12 H	0.0813	-0.6338 to 0.7964	No	>0.9999
75%:12 H vs. 100%:24 H	-0.1723	-1.027 to 0.6824	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:6 H	-0.0935	-0.8579 to 0.6709	No	>0.9999
75%:24 H vs. 100%:12 H	0.3292	-0.3859 to 1.044	No	0.9219
75%:24 H vs. 100%:24 H	0.0756	-0.7790 to 0.9303	No	>0.9999
100%:6 H vs. 100%:12 H	0.4227	-0.2924 to 1.138	No	0.6837
100%:6 H vs. 100%:24 H	0.1691	-0.6855 to 1.024	No	>0.9999
100%:12 H vs. 100%:24 H	-0.2536	-1.064 to 0.5572	No	0.9971