

03-026

DEVELOPMENT OF BIODEGRADABLE SCAFFOLDS VIA PHASE SEPARATION WITH POTENTIAL APPLICATION IN TISSUE ENGINEERING

Rubio-Valle, José Fernando ⁽¹⁾; Perez-Puyana, Victor ⁽²⁾; Jimenez-Rosado, Mercedes ⁽²⁾; Guerrero, Antonio ⁽²⁾; Romero, Alberto ⁽²⁾

⁽¹⁾ Univerisdad de Sevilla, ⁽²⁾ Universidad de Sevilla

The present work focuses on the development of scaffolds based on collagen and chitosan using different processing methods derived from the fabrication of hydrogels and freeze-drying. The scaffolds were produced using 3 different processes and with 1 wt.% of two different biopolymers (collagen and/or chitosan). In order to evaluate the composition and manufacturing method of scaffolding, their mechanical properties were evaluated to determine: (1) their rheological properties through strain and frequency sweeps, (2) their porosity through an analytical model and a mercury porosimeter, and (3) their structure and fiber arrangement by scanning electron microscopy. The results obtained reveal that the properties of the scaffolds were strongly dependent on both the proportion of the raw materials used and the processing method. Furthermore, it was found that a synergic effect occurs when collagen and chitosan in a 1:1 ratio are used in their composition, and also when temperature is increased, thus the solubilization of biopolymers and their interaction during mixing is favored.

Keywords: scaffolds; mechanical properties; porosity; microstructure; gelatin; chitosan

DESARROLLO DE ANDAMIOS BIODEGRADABLES MEDIANTE SEPARACIÓN DE FASES CON UNA POTENCIAL APLICACIÓN EN INGENIERÍA TISULAR

El presente trabajo se centra en el desarrollo de andamios basados en colágeno y quitosano utilizando diferentes métodos de fabricación derivados de la creación de hidrogeles y secado por liofilización. Los andamios se realizarán mediante 3 procesados diferentes y con un 1% en peso de biopolímeros (colágeno y/o quitosano). Con objeto de evaluar la composición y el método de fabricación de los andamios, (1) se evalúan sus propiedades mecánicas para conocer: (2) sus propiedades reológicas mediante barridos de deformación y de frecuencia, su porosidad mediante un modelo analítico y un porosímetro de mercurio, (3) así como su estructura y disposición de las fibras mediante microscopia electrónica de barrido. Los resultados que se obtienen demuestran que las propiedades de los andamios experimentan una fuerte dependencia con la proporción de las materias primas usadas, así como del método de fabricación. Además, se produce un efecto sinérgico al emplear colágeno y quitosano en un ratio 1:1 en su composición, así como al aplicar temperatura ya que está favorece la solubilización de los biopolímeros y su interacción durante el mezclado.

Palabras clave: andamios; propiedades mecánicas; porosidad; microestructura; gelatina; quitosano

Correspondencia: José Fernando Rubio Valle jrvalle@us.es



©2020 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introducción

La Ingeniería Tisular (IT), o Ingeniería de tejidos, se define como la ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos para el restablecimiento funcional de órganos alterados y la sustitución de estructuras dañadas por traumatismo y enfermedades. Sin lugar a dudas, el punto de partida de la Ingeniería de tejidos se puede fijar en los estudios pioneros, en los años 80, de Yannas y, sobre todo Vacanti, quien concibió la idea de dotar a las células de un andamio que actúe como matriz de soporte para que pudieran crecer y, en último término, formar un tejido (Vacanti et al., 1993; Dagalakis et al., 1980; Yannas y Burke, 1980); aunque ha sufrido un crecimiento exponencial a partir del año 2000 (Offeddu et al., 2015; Zhang et al., 2015). Actualmente, la Ingeniería de tejidos se trata de un pujante y creciente campo multidisciplinar con multitud de aplicaciones médicas, que posee la capacidad y el potencial de crear tejidos a partir de andamios (scaffolds) donde tiene lugar la inserción celular junto a los factores de crecimiento.

Los andamios se han utilizado ampliamente en IT para proporcionar una estructura tridimensional para los estudios de regeneración de tejidos. Independientemente de la aplicación, la materia prima utilizada, así como la estructura interna del andamio, tiene un efecto significativo sobre la actividad celular, por lo que es evidente que la elección de un andamio adecuado es esencial para un crecimiento celular óptimo (Sachlos y Czernuszka, 2003). Por esta razón, además el andamio debe satisfacer una serie de condiciones, como ser biocompatible, tener una estructura macroscópica que imite aquel tejido que va a sustituir, tener cierta resistencia mecánica o constar de una estructura interna porosa con un determinado tamaño de poro e interconectividad entre estos. Estas últimas características influyen en la actividad celular, pues un tamaño y una distribución de poros adecuada garantizan una buena inserción y crecimiento celular en el interior del andamio, favoreciendo su biointegración.

Los soportes se construyen con materiales cuya naturaleza esté acorde con la función de la estructura del órgano o tejido donde se vayan a implantar. Aunque los polímeros sintéticos son los que más se emplean hoy en día (Geutjes et al., 2006), las opciones más atractivas son aquellas basadas en proteínas y polisacáridos, tales como colágeno, gelatina, fibrina, elastina, alginato, quitosano, etc. Entre estos destaca la gelatina y el quitosano que pueden adoptar multitud de estructuras, similares a las biológicas, y, solventaría todos los posibles problemas generados con la biocompatibilidad (Mao et al., 2013).

La gelatina que no es más que colágeno desnaturalizado, es una proteína abundante en tejidos animales que constituye aproximadamente un 30% de su cantidad proteica total, encontrándose ampliamente distribuida en la piel, huesos, cartílagos, tendones y ligamentos. La gelatina tiene multitud de aplicaciones, entre las que destaca su aplicación en la industria farmacéutica y en la alimentaria (Senaratne et al., 2006).

El quitosano procede de la quitina mediante un proceso de desacetilación, la cual es muy frecuente en la naturaleza, ya que forma parte de las paredes celulares de los hongos, el exoesqueleto de los artrópodos y algunos órganos de otros muchos animales, como las quetas de los anélidos. Como tal posee un gran número de aplicaciones, ya que se suele usar como agente floculante en el tratamiento de aguas, desinfectante de heridas en medicina y espesante en la industria alimentaria. Uno de los campos en los que más útil es el quitosano es el de la medicina, no sólo por sus propiedades antimicrobianas, sino también por el hecho de ser una sustancia biodegradable (Zhang y Neau, 2001). Por ese motivo, es muy frecuente su uso en la elaboración de hilos de sutura biodegradables, que se deshacen solos una vez que la herida se ha cerrado. Además, también tiene un gran poder como coagulante, por lo que en Estados Unidos y Europa se permite su uso como aditivo en gasas y vendajes, con el fin de evitar hemorragias (Dash et al., 2011).

Aunque existe una enorme cantidad de técnicas, tradicionalmente la técnica desarrollada para la elaboración de andamios es la separación de fases. Dentro de estas, una de las más usuales es la formación de un hidrogel seguido de un secado por liofilización (Perdivara et al., 2013), que además permite la optimización de las propiedades de las matrices, combinándolo con otro proceso adicional al cual podemos denominar tratamiento térmico o mediante la adición de compuestos reticulantes (por ejemplo, glutaraldehído).

El presente trabajo se centra en el desarrollo de andamios basados en gelatina y/o quitosano utilizando diferentes métodos de fabricación derivado de la creación de hidrogeles y secado por liofilización. Con objeto de evaluar la composición y el método de fabricación de los andamios se evalúan las propiedades mecánicas y la microestructura porosa de los mismos.

2. Objetivos

El objetivo principal del trabajo consiste en el desarrollo de andamios mediante vía hidrogeles usando colágeno y quitosano como materias primas, evaluando la influencia de sus proporciones (composición); así como el efecto que tienen los diferentes protocolos (métodos de fabricación) en las propiedades globales finales. Además, se pretende alcanzar una relación entre las composiciones y métodos de fabricación con la estructura interna de la matriz porosa y sus propiedades mecánicas. Para alcanzar el objetivo global se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudio de diferentes métodos de fabricación de una matriz porosa vía hidrogeles basada en colágeno y quitosano que pueda servir de andamio para IT.
- Estudio de las propiedades mecánicas de los andamios fabricados.
- Caracterización de la morfología de la estructura creada (andamio) en relación a su porosidad y al tamaño de poros.
- Relación entre los porcentajes de colágeno y quitosano utilizado, y las propiedades microestructurales y mecánicas de los andamios desarrollados.
- Relación entre el método de fabricación de los andamios y sus propiedades microestructurales y mecánicas.

3. Metodología

Para evaluar los objetivos planteados, los andamios se fabricaron al 1% en peso de biopolímeros: gelatina y quitosano a distintas proporciones en la composición, así también se emplearán tres métodos de fabricación diferentes. Para evaluar sus propiedades mecánicas se han realizado ensayos reológicos mediante barridos de deformación y de frecuencia. Por otro lado, sus propiedades morfológicas se han evaluado mediante, la determinación de su porosidad analítica, así como su tamaño y distribución de tamaño de poros mediante un porosímetro de mercurio de baja presión, así como su estructura mediante microscopía electrónica de barrido.

3.1 Materiales

Para este estudio, se ha utilizado un concentrado proteico de gelatina (G) procedente de la empresa HENAN BOOM GELATIN CO.LTD (China). La ficha técnica del producto indica que se trata de colágeno tipo II obtenido a partir de piel de pescado, con un porcentaje de materia proteica superior al 90% (tratándose, por tanto, de un aislado proteico) y de cenizas inferior al 1%, no aportándose más datos específicos de su composición. Además, se ha usado un polisacárido como es el quitosano (CH), de bajo peso molecular (PM= 130.000

g.mol⁻¹) de la marca comercial SIGMA ALDRICH S.A. (Alemania). Por último, como disolvente se ha utilizado una disolución de ácido acético con un pH ácido de 3,2 (0,05 M) que solubiliza al mismo tiempo a la gelatina y al quitosano (Pérez-Puyana et al., 2016) el cual es proporcionado por PANREAC QUÍMICA S.L.U. (España).

3.2 Fabricación de los andamios

Para la fabricación de los andamios constituidos de matrices biopoliméricas (gelatina o quitosano) se han utilizado tres protocolos diferentes. En todos los casos, basándonos en estudios previos se han realizado 1% en peso de biopolímero (Pérez-Puyana et al., 2019), utilizando diferentes proporciones de gelatina y quitosano tal y como se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Composiciones y referencias de los andamios en relación a los porcentajes de gelatina (G) y quitosano (CH)

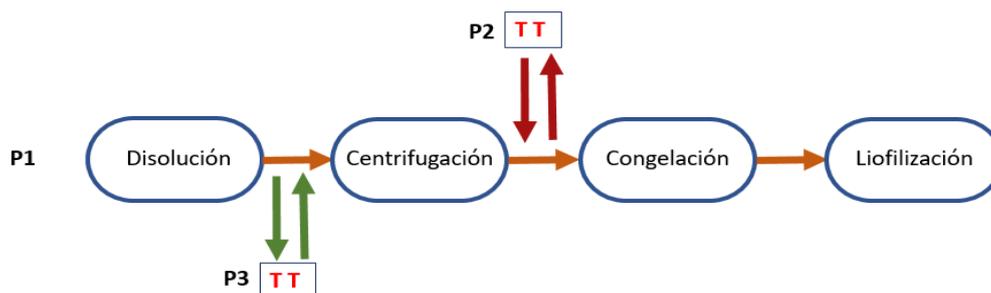
Número	Composición	Referencia
1	100% G y 0% CH	100G-0CH
2	75% G y 25% CH	75G-25CH
2	50% G y 50% CH	50G-50CH
4	25% G y 75% CH	25G-75CH
5	0% G y 100% CH	0G-100CH

3.2.1 Protocolo 1 (P1)

La Figura 1 muestra el esquema de preparación del andamio utilizado en el protocolo 1 (P1). En este primer protocolo, básicamente se realizó la secuencia de pasos del procedimiento tradicional de la técnica de separación de fases y se utilizó como sistema de referencia, ya que es el más utilizado en la fabricación de andamios (Pérez-Puyana et al., 2019).

En primer lugar, se prepararon 20 mL de cada una de las disoluciones al 1% de biopolímero en las relaciones presentadas en la Tabla 1. Posteriormente, las soluciones se sometieron a una centrifugación para homogeneizar y separar las posibles fracciones que no se solubilizan. Para esto, se usó una centrífuga (Medifriger BL-S, JP Selecta, España) a 12000xg, durante 7 minutos a 4 °C. Cabe mencionar que se realizaron los cálculos apropiados para que la cantidad deseada de biopolímero permaneciera en la parte soluble de la solución. Más tarde, se sometieron a una etapa de congelación en un molde a -40 °C durante 2 horas. Por último, las disoluciones congeladas se introdujeron en un sistema de liofilización (LyoQuest, TELSTAR, Japón) a una presión de 0,1 Pa y una temperatura de -80 °C durante 24 h para sublimar el solvente y obtener así el andamio final.

Figura 1. Diagrama de flujo del protocolo de referencia (Pérez-Puyana et al., 2019, (P1)) y de las variantes incluyendo tratamiento térmico (TT) que forman el protocolo 2 (P2) y protocolo 3 (P3), respectivamente



3.2.2. Protocolo 2 (P2)

La única diferencia entre los protocolos 1 y 2 fue la inclusión de un tratamiento térmico (TT) después de la centrifugación y antes de la etapa de congelación, como se puede observar en la Figura 1. Por lo tanto, la secuencia de pasos fue la siguiente: primero, la disolución se preparó, se centrifugó, se calentó, se congeló para finalmente liofilizar para eliminar el disolvente y obtener el andamio. El objetivo de este TT es dar una mayor movilidad a las cadenas de biopolímeros presentes en la disolución, de esta forma su interacción será más fácil, logrando una mayor organización de la cadena que mejoren las propiedades mecánicas de los andamios.

Este TT se basó en calentar la disolución de biopolímeros en un baño térmico con agua destilada a aproximadamente 50 °C durante 2 horas con agitación. No se recomienda utilizar una temperatura más alta para evitar la degradación de la gelatina (Van den Bosch y Gielens, 2003).

3.2.3. Protocolo 3 (P3)

El protocolo 3 fue similar al protocolo 2, excepto por la alteración del orden de los pasos de centrifugación y TT cuyo objetivo es verificar en qué orden este tratamiento es más efectivo, como se observa en la Figura 1. Así, el TT se realizó antes de la centrifugación para favorecer la solubilización del quitosano. En este caso, los parámetros del tratamiento térmico fueron los mismos que los mencionados anteriormente en el protocolo 2.

3.3. Caracterización de los andamios

Los diferentes sistemas fueron caracterizados en la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, durante el año 2019. Los sistemas elaborados fueron caracterizados reológicamente y morfológicamente, además se realizó un estudio estadístico sobre cada uno de los parámetros seleccionados.

3.3.1 Caracterización reológica

La caracterización mecánica de los andamios se realizó utilizando un analizador dinámico-mecánico (RSA3, TA Instruments, EE. UU.), en modo de compresión y con una geometría circular placa-placa de 15 mm de diámetro. Primero, se realizaron barridos de deformación entre $2 \cdot 10^{-4}$ y 2% a una frecuencia constante de 1 Hz para determinar el rango viscoelástico lineal (intervalo donde los módulos elástico (E') y viscoso (E'') permanecen independientes a la deformación aplicada). A partir de ahí, se determinaron las deformaciones críticas (γ_c , la última deformación dentro de la región viscoelástica lineal). Posteriormente, se llevaron a cabo barridos de frecuencia entre 0,02 y 20 Hz a una deformación constante dentro del rango viscoelástico lineal determinado anteriormente. Por lo tanto, se estudió la evolución del módulo elástico (E') con la frecuencia. En este caso, se seleccionaron el módulo elástico (E'_{1}) y la tangente de pérdida ($\tan(\delta)_1 = E''_1/E'_{1}$) a un 1 Hz para hacer una comparación adecuada entre los sistemas.

Por otro lado, para comparar los sistemas obtenidos por los diferentes protocolos, se utilizó un parámetro K_{i1} definido en la ecuación 1, que es la relación de los módulos elásticos a 1 Hz (E'_{1}) entre los diferentes protocolos.

$$K_{i1} = E'_{1} (P_i) / E'_{1} (P1) \quad (1)$$

Este parámetro, K_{i1} , corresponde a la relación de propiedades mecánicas para los diferentes protocolos (P_i) con respecto al protocolo 1 ($P1$) para las diferentes composiciones mostradas en la Tabla 1.

3.3.2 Caracterización morfológica

Porosidad

La porosidad (ε) de los andamios se obtuvo utilizando un método previamente descrito por Al-Munajjed et al. (2008) De esta manera, la porosidad individual (ε) de cada andamio se calculó utilizando la ecuación 2:

$$\varepsilon (\%) = (1 - \rho_s/\rho_m) \cdot 100 \quad (2)$$

,donde ρ_s es la densidad del andamio (obtenida pesando andamios triplicados de los diferentes sistemas y calculando su volumen aprovechando el hecho de que se han fabricado piezas geométricas) y ρ_m la densidad de la materia prima (G y CH dependiendo de su relación).

Distribución de tamaño de poro

Se realizó una porosimetría de mercurio a baja presión para investigar la distribución del tamaño de poro utilizando el porosímetro PoreMaster-60 GT (Quantachrome Instruments, EE. UU. Esta técnica consiste en la aplicación de presión, permitiendo que el mercurio penetre dentro del entramado poroso del sólido, y llegando a medir tamaños de poro de hasta 6 nm.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Finalmente, se observó la microestructura de los andamios mediante microscopía electrónica de barrido, para ello se utilizó el microscopio Zeiss EVO (EE. UU.). Las medidas fueron realizadas con un detector de electrones secundario a un voltaje de 20 kV. Para llevar a cabo dichas mediciones, los andamios se trataron previamente con vapor de osmio al 1% durante 8 horas para fijar la estructura de los andamios y, posteriormente, las muestras se sometieron a un tratamiento de pulverización catódica con una capa muy fina de oro para mejorar la calidad de las micrografías (Levengood y Zhang, 2014).

3.4 Análisis estadístico

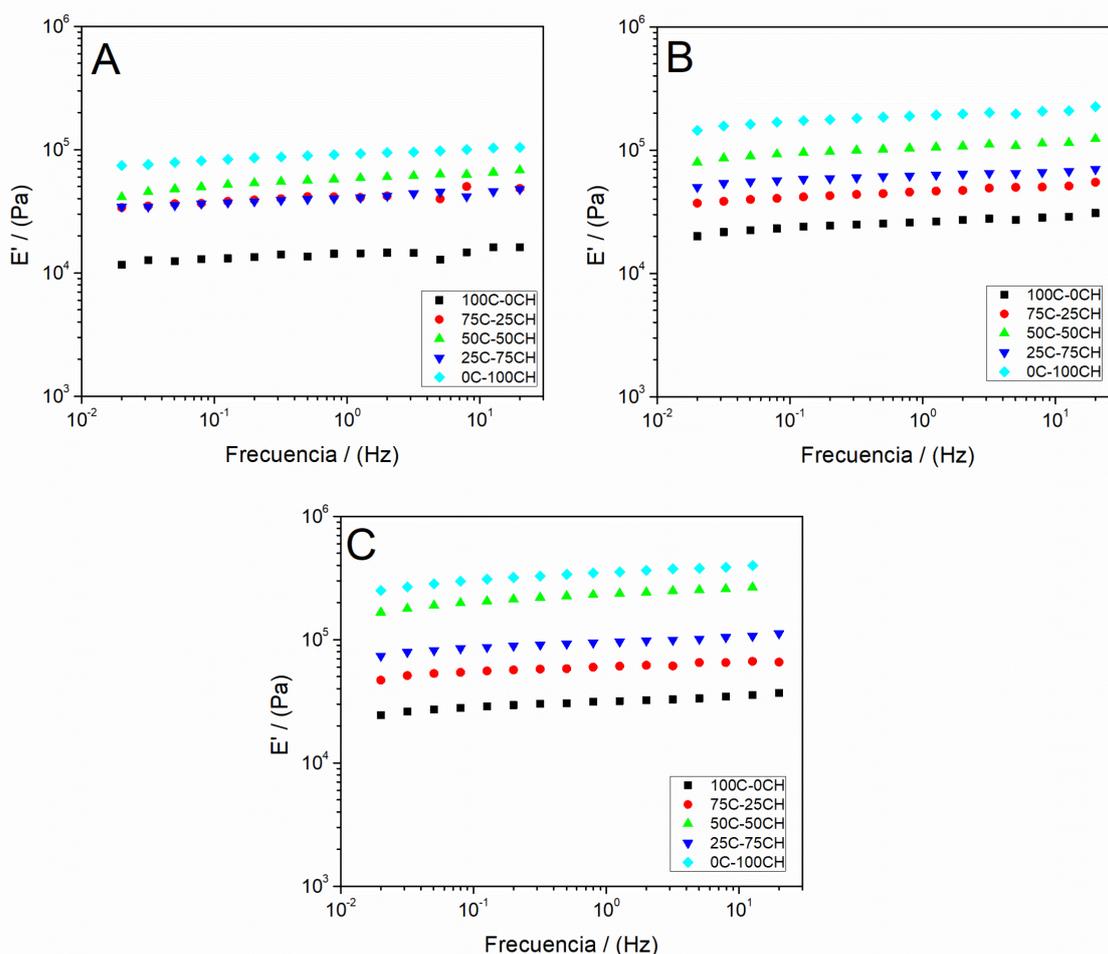
Se realizó un estudio estadístico sobre cada uno de los parámetros seleccionados en los ensayos de caracterización. Para este estudio, se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), utilizando tres réplicas de cada medida de forma independiente. Posteriormente, se calcularon una serie de parámetros estadísticos, incluida la media y la desviación estándar. Además, se realizó una prueba de comparación de medias para evaluar si existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Propiedades reológicas

En la Figura 2 se muestran los valores del módulo elástico (E') en función de la frecuencia de los diferentes andamios producidos a partir de los protocolos 1, 2 y 3 (Figuras 2A, 2B y 2C, respectivamente). Se puede observar que existe una ligera variación de E' con la frecuencia, que muestra suficiente estabilidad y carácter sólido, como los andamios estudiados en trabajos anteriores (Arévalo et al., 2018).

Figura 2. Evolución del módulo elástico (E') en función de la frecuencia de andamios al 1% en peso de biopolímeros con distintas proporciones de gelatina (G) y quitosano (CH), para el: (A) Protocolo 1, P1, (B) Protocolo 2, P2 y (C) Protocolo 3, P3



Con respecto a la relación G-CH, una mayor concentración de CH produce mejores propiedades mecánicas en los andamios. Este hecho es corroborado por el aumento observado en el E' , que muestra un perfil similar para todos los sistemas evaluados. Sin embargo, se produce sinergia en las composiciones de 50% en peso de G y 50% en peso de CH (50G-50CH). Esta sinergia es evidente en todos los protocolos, aunque no alcanzó los niveles de los sistemas 0G-100CH.

Para comparar los diferentes sistemas de una manera más adecuada, la Tabla 2 contiene los valores de la deformación crítica (γ_c), del módulo elástico (E'_1) y la tangente de pérdida ($\tan(\delta)_1$) a 1 Hz. Este último parámetro se incluyó para evaluar no solo el comportamiento elástico de los andamios sino también el impacto que tiene la componente viscosa en los sistemas.

Tabla 2. Valores de deformación crítica (γ_c), tangente de pérdida a 1 Hz ($\tan(\delta)_1$), módulo elástico a 1 Hz (E'_1) y porosidad de los andamios con diferentes proporciones de gelatina (G) y quitosano (CH) obtenidas por los diferentes protocolos (P1, P2 y P3)

Protocolo	Referencia	γ_c (%)	$\tan(\delta)_1$	E'_1 (kPa)	ϵ (%)
P1	100G-0CH	0,19 ^a	0,085 ^b	14,34 ^a	99,15 ^a
	75G-25CH	0,33 ^b	0,058 ^a	41,15 ^c	99,05 ^a
	50G-50CH	0,46 ^c	0,065 ^a	58,15 ^d	98,90 ^b
	25G-75CH	0,37 ^b	0,061 ^a	41,32 ^c	99,10 ^a
	0G-100CH	0,31 ^b	0,095 ^c	91,81 ^e	98,70 ^b
P2	100G-0CH	0,25 ^a	0,094 ^c	21,41 ^b	98,27 ^c
	75G-25CH	0,38 ^b	0,057 ^a	45,23 ^{cd}	98,12 ^c
	50G-50CH	0,58 ^d	0,085 ^b	92,79 ^e	97,96 ^d
	25G-75CH	0,41 ^c	0,074 ^b	52,34 ^d	98,03 ^d
	0G-100CH	0,42 ^c	0,065 ^a	198,23 ^f	97,62 ^e
P3	100G-0CH	0,37 ^b	0,107 ^c	23,41 ^b	98,05 ^d
	75G-25CH	0,42 ^c	0,076 ^b	49,21 ^d	98,25 ^c
	50G-50CH	0,68 ^e	0,065 ^a	203,68 ^f	97,13 ^f
	25G-75CH	0,39 ^c	0,057 ^a	85,19 ^e	97,77 ^e
	0G-100CH	0,44 ^c	0,076 ^b	317,55 ^g	97,61 ^e

Nota: Letras diferentes corresponden a valores significativamente diferentes

Se observa en los resultados de los diferentes métodos de fabricación que se encuentra el mismo patrón de comportamiento cuando se modifica la relación G-CH. En general, una mayor proporción de CH conduce a un mayor E' con diferencias significativas en los valores, aunque también se obtiene un efecto sinérgico para los andamios 50G-50CH. Por otro lado, los valores de $\tan(\delta)_1$ no siguen un patrón definido, aunque los valores más altos corresponden a los sistemas unitarios (100G-0CH y 0G-100CH), siendo el E'' más influyente en el protocolo 1. Además, también debe tenerse en cuenta que los valores de la deformación crítica (γ_c) son más altos en la relación 50C-50CH, con una diferencia significativa. Esto es muy importante para las aplicaciones de IT, ya que se puede producir una amplia gama de cepas sin abandonar el rango lineal viscoelástico y sin producir modificaciones en los andamios. Esta sinergia observada en las mezclas de gelatina-quitosano podría ser consecuencia de una organización óptima de la cadena. Por tanto, denominaremos a esta proporción 50G-50CH, muestra de referencia, la cual será utilizada para los posteriores ensayos de caracterización morfológicas de los andamios como son la distribución del tamaño de poro y la microscopia electrónica de barrido (SEM).

Centrándose en los resultados obtenidos en los diferentes protocolos y comparándolos, el protocolo 3 destaca de los demás, obteniendo las mejores propiedades mecánicas, que se reflejan en las mayores deformaciones críticas (γ_c) y en lo mayores valores del E' a 1 Hz (E'_1). Sin embargo, en el protocolo 2 también se obtuvo mejores propiedades con respecto al protocolo 1, aunque sin alcanzar los valores obtenidos en el protocolo 3. Esta comparación entre los protocolos se puede evaluar mejor observando la Tabla 3, que muestra los valores de K_{r1} de los diferentes sistemas calculados utilizando la ecuación 1.

Tabla 3. Valores de K_{11} para los andamios con diferentes proporciones de gelatina (G) y quitosano (CH). K_{21} : relación entre los protocolos 2 y 1. K_{31} : relación entre los protocolos 3 y 1

Referencia	K_{21}	K_{31}
100G-0CH	1,49 ^a	1,63 ^b
50G-50CH	1,60 ^b	3,50 ^d
0G-100CH	2,16 ^c	3,46 ^d

Nota: Letras diferentes corresponden a valores significativamente diferentes

Se puede observar que cuando se aplicó TT en los métodos de fabricación (protocolos 2 y 3), las muestras de 0G-100CH aumentan sus E' más que en aquellas composiciones en las que la gelatina está en mayor proporción (50G-50CH y 100G -0CH). Esto ocurre posiblemente porque el efecto térmico induce mejor las interacciones producidas entre las cadenas de CH, que no son las mismas en la G debido al impedimento estérico producido por las ramificaciones de la cadena, lo que dificulta su reordenamiento. Por lo tanto, se deduce que los aumentos en las relaciones de los protocolos 2 y 3 con respecto a 1 se deben principalmente al quitosano (CH). Por otro lado, el protocolo 3 mejora significativamente al protocolo 2 en todas las composiciones.

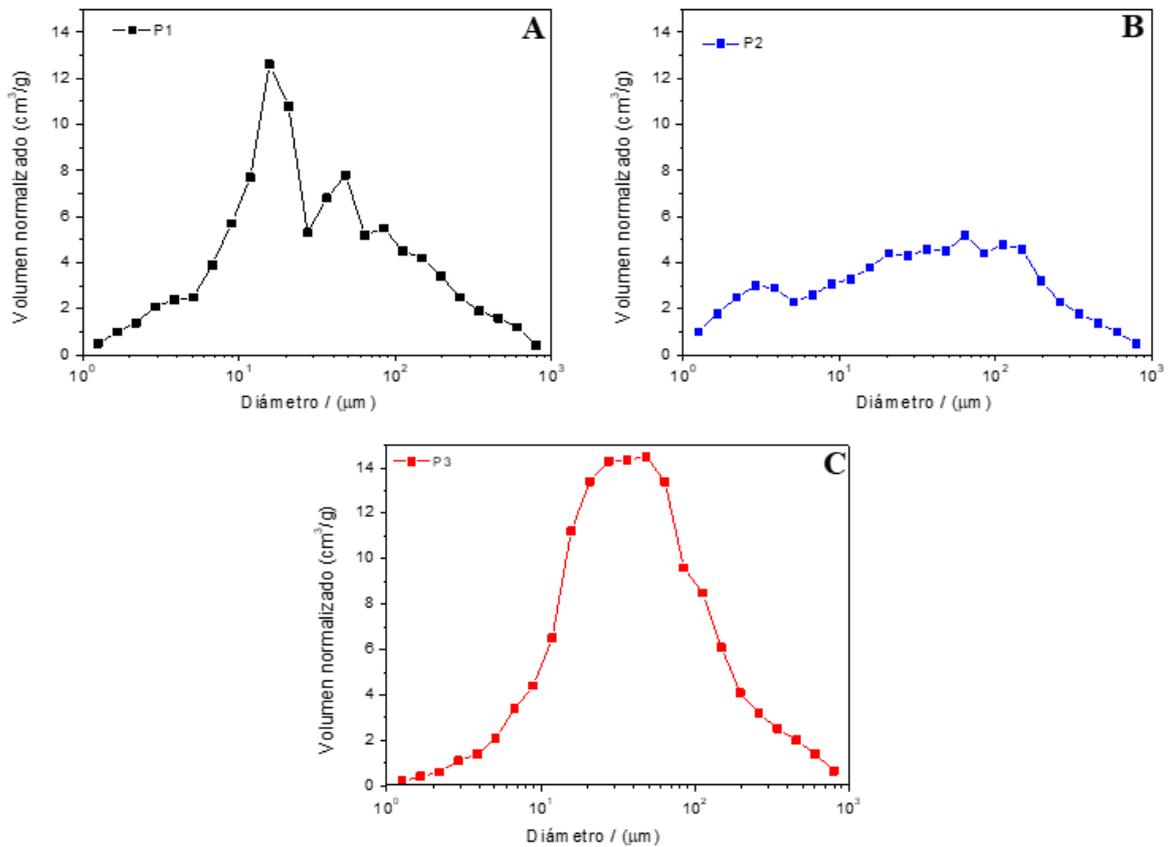
4.2 Propiedades morfológicas

Porosidad y distribución del tamaño de poro

En la Tabla 2 se muestran los valores de la porosidad analítica de los diferentes andamios. Como se puede observar, los andamios obtenidos por el protocolo 1 tuvieron la mayor porosidad, aunque con ligeras diferencias (no más del 2%). Esto podría conducir a que estos sistemas tengan las propiedades reológicas más bajas. Además, la relación G-CH también influyó, causando que, en general, la porosidad disminuya a medida que aumenta el porcentaje de CH en los sistemas.

La Figura 3 muestra las distribuciones de tamaño de poro promedio de la composición de referencia (50G-50CH), para los tres métodos de fabricación (P1, P2 y P3). En la Figura 3A (protocolo 1), se puede observar un perfil que muestra una distribución bimodal con dos picos de aproximadamente 15 y 45 μm . Este hecho sugiere que la polidispersión de los tamaños fue alta (baja uniformidad), presentando también altos porcentajes de poros en tamaños altos. Esto puede significar que, aunque no había muchos poros grandes, su presencia puede haber afectado las propiedades mecánicas. En cualquier caso, el tamaño de poro promedio fue de 35,6 μm . El tamaño medio de poro de los andamios fabricados con el protocolo 2 fue de 28,7 μm . Sin embargo, este sistema (Figura 3B) fue el sistema más polidisperso sin ninguna distribución unimodal, presentando porcentajes de poros casi uniformes en todo el rango de diámetro estudiado. Finalmente, en la Figura 3C, que corresponde a los andamios fabricados mediante el protocolo 3, hay una distribución unimodal con un pico de alrededor de 50 μm . Aunque la distribución fue menos polidispersa, este sistema tenía un tamaño de poro medio mayor que los otros (51,2 μm). En cualquier caso, este tamaño de poro más grande no implica ningún inconveniente, ya que facilitará la entrada de células y la neovascularización de los andamios una vez implantados. En general, se establece que, para el desarrollo de andamios de tejidos blandos, se requiere un rango de tamaño de poro entre 20 y 200 μm (Esteve, 2013).

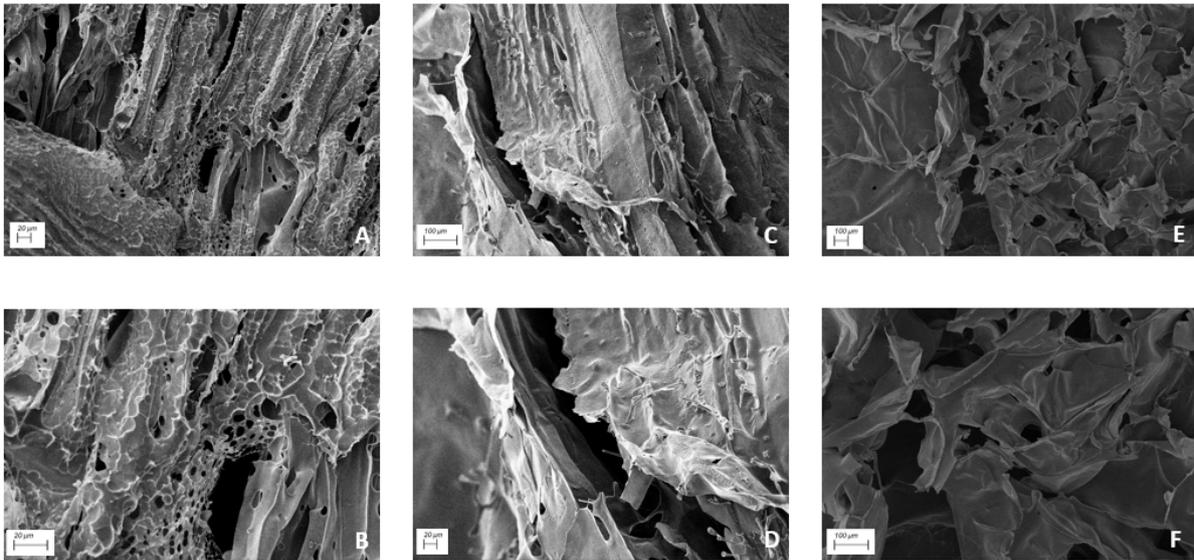
Figura 3. Distribución del tamaño de poros para sistemas binarios con proporciones de 50G-50CH, usando los diferentes métodos de fabricación: (A) Protocolo 1, (B) Protocolo 2 y (C) Protocolo 3



Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La Figura 4 muestra las micrográficas para los andamios 50G-50CH obtenidos por los tres protocolos (protocolo 1: 4A y 4B, protocolo 2: 4C y 4D y protocolo 3: 4E y 4F). Las Figuras 4A y 4B muestran que hay porosidad en todo el andamio, lo que confirma los valores obtenidos por el método analítico (alrededor del 98%). También muestra que los poros se distribuyen de manera heterogénea en todo el andamio procesado por el protocolo 1, con una pequeña distribución de poros grandes (en forma de agujeros) y principalmente una pequeña distribución de poros, que corrobora lo que se discutió en la sección anterior (Figura 3). Por otro lado, las Figuras 4C y 4D muestran que el andamio obtenido por el protocolo 2 tiene una gran heterogeneidad, como se obtuvo en las mediciones de porosimetría (con respecto al tamaño de poro). Finalmente, las Figuras 4E y 4F muestran la porosidad presentada a través del andamio procesado por el protocolo 3, corroborando los valores obtenidos en el método analítico (una porosidad alrededor del 97%). En este caso, se observa más de cerca una distribución más homogénea.

Figura 4. Micrografías de SEM de los andamios con 50% en peso de gelatina y 50% en peso de quitosano (50G-50CH) fabricados por los diferentes protocolos. A-B: Protocolo 1. C-D: Protocolo 2. E-F: Protocolo 3



5. Conclusiones

Se ha logrado el desarrollo de un andamio poroso de biopolímeros a través de un proceso que consta de dos etapas: preparación de una solución y una etapa de liofilización. Se estudiaron diferentes sistemas (diferentes relaciones en la proporción de G-CH con diferentes protocolos) analizando sus propiedades reológicas y microestructurales. Los resultados que se obtienen demuestran que las propiedades de los andamios experimentan una fuerte dependencia: con la proporción y tipo de las materias primas usadas, así como del método de preparación, es decir, depende de la forma en que se procese el andamio.

Los andamios se pueden obtener con diferentes propiedades mecánicas dependiendo de la proporción de gelatina (G) y quitosano (CH). En general, un mayor porcentaje de quitosano conduce a andamios con mayores módulos elásticos. Sin embargo, se detectó un efecto sinérgico para el sistema 50G-50CH en las propiedades mecánicas, lo cual es relevante para su uso potencial como andamio en Ingeniería de tejidos. Más específicamente, este sistema muestra una mejora aparente en el módulo elástico, los valores del tamaño de poro y, especialmente, en la deformación crítica.

Por otro lado, las propiedades mecánicas se ven afectadas por el método de fabricación con el que se realiza el andamio. Se puede afirmar que la aplicación de un tratamiento térmico (protocolo 2 y 3) produce un aumento considerable en las propiedades mecánicas, posiblemente debido a alguna mejora en la solubilidad y, sobre todo, a la estructuración de la cadena que se produce en la matriz del biopolímero cuando se le aplica.

En cualquier caso, independientemente de la composición y el método de fabricación utilizados, los andamios obtenidos en el presente trabajo constituyen matrices de biopolímeros (ya que están formados por G y CH), con una porosidad superior al 95% (modelo analítico de porosidad) y tamaños de poros e interconectividad adecuados para aplicación en Ingeniería de tejidos.

5.1 Limitaciones encontradas y posibles líneas futuras

La principal limitación que se encuentra en el presente trabajo viene dada por la propia técnica en sí. Una de las limitaciones que presenta es el tiempo de procesado, independientemente del protocolo utilizado, la obtención de un andamio se demora mínimo 27 horas. Otra limitación es la geometría de los andamios ya que estos obtienen la del molde donde se realizan.

Una posible línea futura que actualmente se está desarrollando, es combinar esta técnica con la bioimpresión 3D, cuyo objetivo final es que el andamio posea una estructura biomimética, la cual le otorgue la posibilidad de adoptar cualquier estructura macroscópica que imite al tejido a sustituir.

Agradecimientos

Este proyecto está financiado por un proyecto MICINN (Ref.: RTI2018-097100-B-C21). Los autores también agradecen la beca predoctoral concedida a Mercedes Jiménez-Rosado (FPU2017/01718-MEFP).

Referencias

- Al-Munajjed, A. A., Hien, M., Kujat, R., Gleeson, J. P., Hammer, J., 2008. Influence of pore size on tensile strength, permeability and porosity of hyaluronan-collagen scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(8), 2859-2864.
- Arévalo, F. R., Osorio, S. A., Valcárcel, N. A., Ibarra, J. C., Valero, M. F., 2018. Characterization and in vitro Biocompatibility of Binary Mixtures of Chitosan and Polyurethanes Synthesized from Chemically Modified Castor Oil, as Materials for Medical Use. *Polymers from Renewable Resources*, 9(1), 23-38.
- Dagalakis, N., Flink, J., Stasikelis, P., Burke, J. F., Yannas, I. V., 1980. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *Journal of biomedical materials research*, 14(4), 511-528.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., Chiellini, E., 2011. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, 36(8), 981-1014.
- Esteve, L. S., 2013. Síntesis y caracterización de scaffolds poliméricos para la ingeniería de tejidos (Doctoral dissertation, Universitat de València).
- Geutjes, P. J., Daamen, W. F., Buma, P., Feitz, W. F., Faraj, K. A., van Kuppevelt, T. H., 2006. From molecules to matrix: construction and evaluation of molecularly defined bioscaffolds. In *Tissue Engineering* (pp. 279-295). Springer, Boston, MA.
- Levengood, S. K. L., Zhang, M., 2014. Chitosan-based scaffolds for bone Tissue Engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184.
- Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., De Yao, K., 2003. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067-1074.
- Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., Oyen, M. L., 2015. Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for Tissue Engineering applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 42, 19-25.
- Perdivara, I., Yamauchi, M., Tomer, K.B., 2013. Molecular Characterization of Collagen Hydroxylysine O-Glycosylation by Mass Spectrometry: Current Status. *Australian Journal of Chemistry*, 66, 760-769.

- Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A., Guerrero, A., 2019. Influence of the processing variables on the microstructure and properties of gelatin-based scaffolds by freeze-drying. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(25), 47671.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Guerrero, A., Romero, A., 2019. Gelatin vs collagen-based sponges: evaluation of concentration, additives and biocomposites. *Journal of Polymer Research*, 26(8), 190.
- Perez-Puyana, V., Romero, A., Guerrero, A., 2016. Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(6), 1462-1468.
- Sachlos, E., Czernuszka, J. T., 2003. Making Tissue Engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of Tissue Engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*, 5(29), 39-40.
- Senaratne, L. S., Park, P. J., Kim, S. K., 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource technology*, 97(2), 191-197.
- Vacanti, C. A., Kim, W., Upton, J., Vacanti, M. P., Mooney, D., 1993. Tissue Engineered growth of bone and cartilage. In *Transplantation proceedings* (Vol. 25, No. 1, pp. 1019-1021).
- Van den Bosch, E., Gielens, C., 2003. Gelatin degradation at elevated temperature. *International journal of biological macromolecules*, 32(3-5), 129-138.
- Yannas, I. V., Burke, J. F., 1980. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of biomedical materials research*, 14(1), 65-81.
- Zhang, H., Neau, S. H., 2001. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22(12), 1653-1658.
- Zhang, Q., Lv, S., Lu, J., Jiang, S., Lin, L., 2015. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. *International journal of biological macromolecules*, 76, 94-101.

Objetivos de desarrollo sostenible

El objetivo de desarrollo sostenible que se persigue en este trabajo es garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades, el cual corresponde con el objetivo de desarrollo sostenible número 3.

Figura 5. Imagen del objetivo de desarrollo sostenible número 3



g.mol⁻¹) de la marca comercial SIGMA ALDRICH S.A. (Alemania). Por último, como disolvente se ha utilizado una disolución de ácido acético con un pH ácido de 3,2 (0,05 M) que solubiliza al mismo tiempo a la gelatina y al quitosano (Pérez-Puyana et al., 2016) el cual es proporcionado por PANREAC QUÍMICA S.L.U. (España).

3.2 Fabricación de los andamios

Para la fabricación de los andamios constituidos de matrices biopoliméricas (gelatina o quitosano) se han utilizado tres protocolos diferentes. En todos los casos, basándonos en estudios previos se han realizado 1% en peso de biopolímero (Pérez-Puyana et al., 2019), utilizando diferentes proporciones de gelatina y quitosano tal y como se recoge en la Tabla 1.

Tabla 1. Composiciones y referencias de los andamios en relación a los porcentajes de gelatina (G) y quitosano (CH)

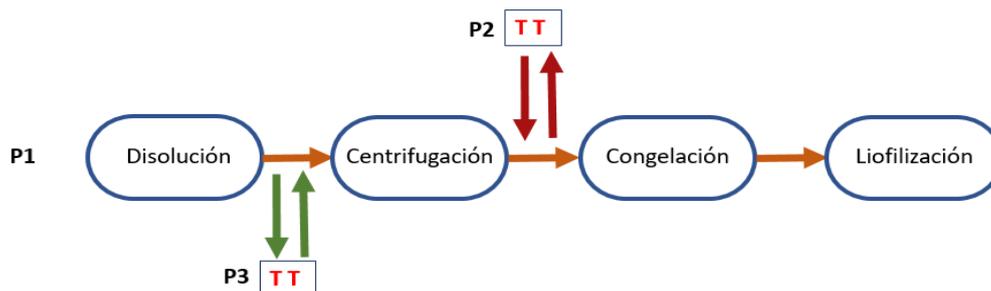
Número	Composición	Referencia
1	100% G y 0% CH	100G-0CH
2	75% G y 25% CH	75G-25CH
2	50% G y 50% CH	50G-50CH
4	25% G y 75% CH	25G-75CH
5	0% G y 100% CH	0G-100CH

3.2.1 Protocolo 1 (P1)

La Figura 1 muestra el esquema de preparación del andamio utilizado en el protocolo 1 (P1). En este primer protocolo, básicamente se realizó la secuencia de pasos del procedimiento tradicional de la técnica de separación de fases y se utilizó como sistema de referencia, ya que es el más utilizado en la fabricación de andamios (Pérez-Puyana et al., 2019).

En primer lugar, se prepararon 20 mL de cada una de las disoluciones al 1% de biopolímero en las relaciones presentadas en la Tabla 1. Posteriormente, las soluciones se sometieron a una centrifugación para homogeneizar y separar las posibles fracciones que no se solubilizan. Para esto, se usó una centrífuga (Medifriger BL-S, JP Selecta, España) a 12000xg, durante 7 minutos a 4 °C. Cabe mencionar que se realizaron los cálculos apropiados para que la cantidad deseada de biopolímero permaneciera en la parte soluble de la solución. Más tarde, se sometieron a una etapa de congelación en un molde a -40 °C durante 2 horas. Por último, las disoluciones congeladas se introdujeron en un sistema de liofilización (LyoQuest, TELSTAR, Japón) a una presión de 0,1 Pa y una temperatura de -80 °C durante 24 h para sublimar el solvente y obtener así el andamio final.

Figura 1. Diagrama de flujo del protocolo de referencia (Pérez-Puyana et al., 2019, (P1)) y de las variantes incluyendo tratamiento térmico (TT) que forman el protocolo 2 (P2) y protocolo 3 (P3), respectivamente



3.2.2. Protocolo 2 (P2)

La única diferencia entre los protocolos 1 y 2 fue la inclusión de un tratamiento térmico (TT) después de la centrifugación y antes de la etapa de congelación, como se puede observar en la Figura 1. Por lo tanto, la secuencia de pasos fue la siguiente: primero, la disolución se preparó, se centrifugó, se calentó, se congeló para finalmente liofilizar para eliminar el disolvente y obtener el andamio. El objetivo de este TT es dar una mayor movilidad a las cadenas de biopolímeros presentes en la disolución, de esta forma su interacción será más fácil, logrando una mayor organización de la cadena que mejoren las propiedades mecánicas de los andamios.

Este TT se basó en calentar la disolución de biopolímeros en un baño térmico con agua destilada a aproximadamente 50 °C durante 2 horas con agitación. No se recomienda utilizar una temperatura más alta para evitar la degradación de la gelatina (Van den Bosch y Gielens, 2003).

3.2.3. Protocolo 3 (P3)

El protocolo 3 fue similar al protocolo 2, excepto por la alteración del orden de los pasos de centrifugación y TT cuyo objetivo es verificar en qué orden este tratamiento es más efectivo, como se observa en la Figura 1. Así, el TT se realizó antes de la centrifugación para favorecer la solubilización del quitosano. En este caso, los parámetros del tratamiento térmico fueron los mismos que los mencionados anteriormente en el protocolo 2.

3.3. Caracterización de los andamios

Los diferentes sistemas fueron caracterizados en la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, durante el año 2019. Los sistemas elaborados fueron caracterizados reológicamente y morfológicamente, además se realizó un estudio estadístico sobre cada uno de los parámetros seleccionados.

3.3.1 Caracterización reológica

La caracterización mecánica de los andamios se realizó utilizando un analizador dinámico-mecánico (RSA3, TA Instruments, EE. UU.), en modo de compresión y con una geometría circular placa-placa de 15 mm de diámetro. Primero, se realizaron barridos de deformación entre $2 \cdot 10^{-4}$ y 2% a una frecuencia constante de 1 Hz para determinar el rango viscoelástico lineal (intervalo donde los módulos elástico (E') y viscoso (E'') permanecen independientes a la deformación aplicada). A partir de ahí, se determinaron las deformaciones críticas (γ_c , la última deformación dentro de la región viscoelástica lineal). Posteriormente, se llevaron a cabo barridos de frecuencia entre 0,02 y 20 Hz a una deformación constante dentro del rango viscoelástico lineal determinado anteriormente. Por lo tanto, se estudió la evolución del módulo elástico (E') con la frecuencia. En este caso, se seleccionaron el módulo elástico (E'_{1}) y la tangente de pérdida ($\tan(\delta)_{1} = E''_{1}/E'_{1}$) a un 1 Hz para hacer una comparación adecuada entre los sistemas.

Por otro lado, para comparar los sistemas obtenidos por los diferentes protocolos, se utilizó un parámetro K_{i1} definido en la ecuación 1, que es la relación de los módulos elásticos a 1 Hz (E'_{1}) entre los diferentes protocolos.

$$K_{i1} = E'_{1} (P_i) / E'_{1} (P1) \quad (1)$$

Este parámetro, K_{i1} , corresponde a la relación de propiedades mecánicas para los diferentes protocolos (P_i) con respecto al protocolo 1 (P_1) para las diferentes composiciones mostradas en la Tabla 1.

3.3.2 Caracterización morfológica

Porosidad

La porosidad (ε) de los andamios se obtuvo utilizando un método previamente descrito por Al-Munajjed et al. (2008) De esta manera, la porosidad individual (ε) de cada andamio se calculó utilizando la ecuación 2:

$$\varepsilon (\%) = (1 - \rho_s/\rho_m) \cdot 100 \quad (2)$$

,donde ρ_s es la densidad del andamio (obtenida pesando andamios triplicados de los diferentes sistemas y calculando su volumen aprovechando el hecho de que se han fabricado piezas geométricas) y ρ_m la densidad de la materia prima (G y CH dependiendo de su relación).

Distribución de tamaño de poro

Se realizó una porosimetría de mercurio a baja presión para investigar la distribución del tamaño de poro utilizando el porosímetro PoreMaster-60 GT (Quantachrome Instruments, EE. UU. Esta técnica consiste en la aplicación de presión, permitiendo que el mercurio penetre dentro del entramado poroso del sólido, y llegando a medir tamaños de poro de hasta 6 nm.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Finalmente, se observó la microestructura de los andamios mediante microscopía electrónica de barrido, para ello se utilizó el microscopio Zeiss EVO (EE. UU.). Las medidas fueron realizadas con un detector de electrones secundario a un voltaje de 20 kV. Para llevar a cabo dichas mediciones, los andamios se trataron previamente con vapor de osmio al 1% durante 8 horas para fijar la estructura de los andamios y, posteriormente, las muestras se sometieron a un tratamiento de pulverización catódica con una capa muy fina de oro para mejorar la calidad de las micrografías (Levengood y Zhang, 2014).

3.4 Análisis estadístico

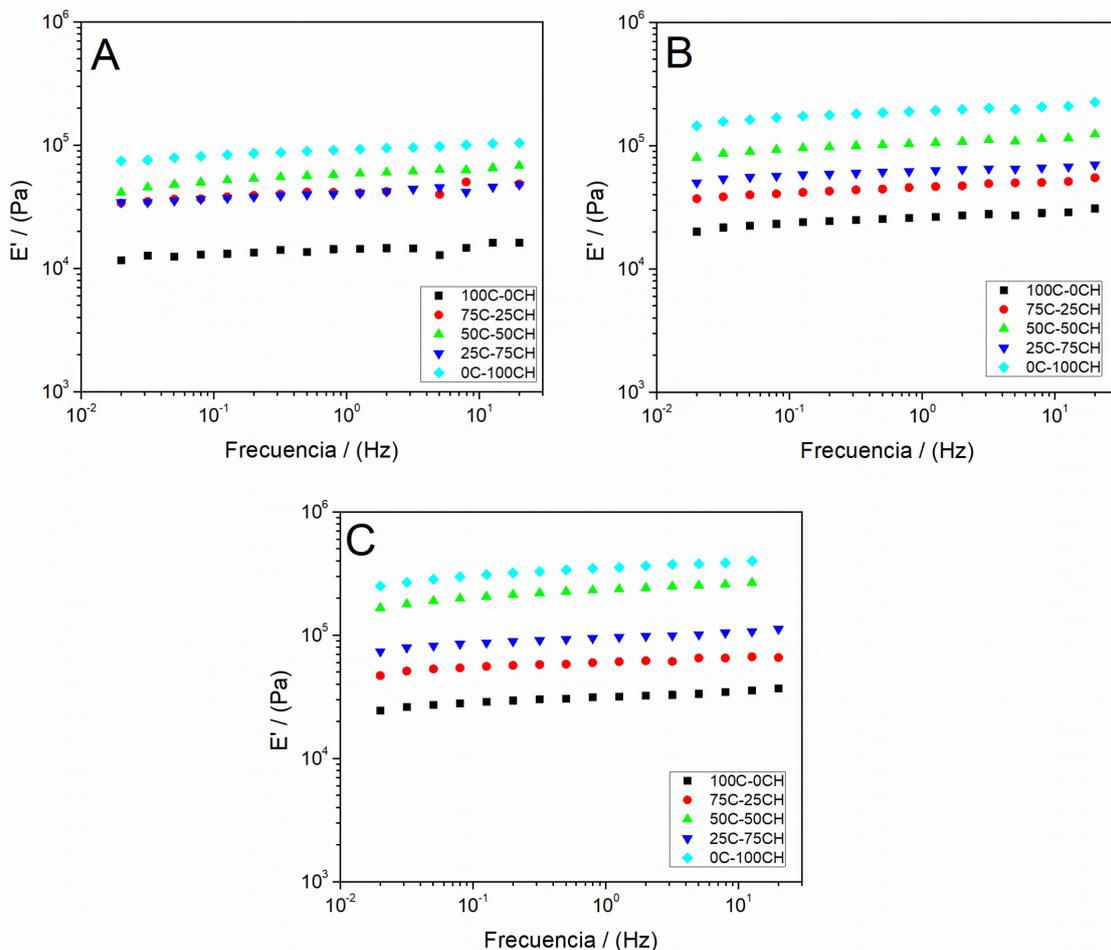
Se realizó un estudio estadístico sobre cada uno de los parámetros seleccionados en los ensayos de caracterización. Para este estudio, se realizó un análisis de la varianza de un factor (ANOVA), utilizando tres réplicas de cada medida de forma independiente. Posteriormente, se calcularon una serie de parámetros estadísticos, incluida la media y la desviación estándar. Además, se realizó una prueba de comparación de medias para evaluar si existen diferencias significativas ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Propiedades reológicas

En la Figura 2 se muestran los valores del módulo elástico (E') en función de la frecuencia de los diferentes andamios producidos a partir de los protocolos 1, 2 y 3 (Figuras 2A, 2B y 2C, respectivamente). Se puede observar que existe una ligera variación de E' con la frecuencia, que muestra suficiente estabilidad y carácter sólido, como los andamios estudiados en trabajos anteriores (Arévalo et al., 2018).

Figura 2. Evolución del módulo elástico (E') en función de la frecuencia de andamios al 1% en peso de biopolímeros con distintas proporciones de gelatina (G) y quitosano (CH), para el: (A) Protocolo 1, P1, (B) Protocolo 2, P2 y (C) Protocolo 3, P3



Con respecto a la relación G-CH, una mayor concentración de CH produce mejores propiedades mecánicas en los andamios. Este hecho es corroborado por el aumento observado en el E' , que muestra un perfil similar para todos los sistemas evaluados. Sin embargo, se produce sinergia en las composiciones de 50% en peso de G y 50% en peso de CH (50G-50CH). Esta sinergia es evidente en todos los protocolos, aunque no alcanzó los niveles de los sistemas 0G-100CH.

Para comparar los diferentes sistemas de una manera más adecuada, la Tabla 2 contiene los valores de la deformación crítica (γ_c), del módulo elástico (E'_1) y la tangente de pérdida ($\tan(\delta)_1$) a 1 Hz. Este último parámetro se incluyó para evaluar no solo el comportamiento elástico de los andamios sino también el impacto que tiene la componente viscosa en los sistemas.

Tabla 2. Valores de deformación crítica (γ_c), tangente de pérdida a 1 Hz ($\tan(\delta)_1$), módulo elástico a 1 Hz (E'_1) y porosidad de los andamios con diferentes proporciones de gelatina (G) y quitosano (CH) obtenidas por los diferentes protocolos (P1, P2 y P3)

Protocolo	Referencia	γ_c (%)	$\tan(\delta)_1$	E'_1 (kPa)	ϵ (%)
P1	100G-0CH	0,19 ^a	0,085 ^b	14,34 ^a	99,15 ^a
	75G-25CH	0,33 ^b	0,058 ^a	41,15 ^c	99,05 ^a
	50G-50CH	0,46 ^c	0,065 ^a	58,15 ^d	98,90 ^b
	25G-75CH	0,37 ^b	0,061 ^a	41,32 ^c	99,10 ^a
	0G-100CH	0,31 ^b	0,095 ^c	91,81 ^e	98,70 ^b
P2	100G-0CH	0,25 ^a	0,094 ^c	21,41 ^b	98,27 ^c
	75G-25CH	0,38 ^b	0,057 ^a	45,23 ^{cd}	98,12 ^c
	50G-50CH	0,58 ^d	0,085 ^b	92,79 ^e	97,96 ^d
	25G-75CH	0,41 ^c	0,074 ^b	52,34 ^d	98,03 ^d
	0G-100CH	0,42 ^c	0,065 ^a	198,23 ^f	97,62 ^e
P3	100G-0CH	0,37 ^b	0,107 ^c	23,41 ^b	98,05 ^d
	75G-25CH	0,42 ^c	0,076 ^b	49,21 ^d	98,25 ^c
	50G-50CH	0,68 ^e	0,065 ^a	203,68 ^f	97,13 ^f
	25G-75CH	0,39 ^c	0,057 ^a	85,19 ^e	97,77 ^e
	0G-100CH	0,44 ^c	0,076 ^b	317,55 ^g	97,61 ^e

Nota: Letras diferentes corresponden a valores significativamente diferentes

Se observa en los resultados de los diferentes métodos de fabricación que se encuentra el mismo patrón de comportamiento cuando se modifica la relación G-CH. En general, una mayor proporción de CH conduce a un mayor E' con diferencias significativas en los valores, aunque también se obtiene un efecto sinérgico para los andamios 50G-50CH. Por otro lado, los valores de $\tan(\delta)_1$ no siguen un patrón definido, aunque los valores más altos corresponden a los sistemas unitarios (100G-0CH y 0G-100CH), siendo el E'' más influyente en el protocolo 1. Además, también debe tenerse en cuenta que los valores de la deformación crítica (γ_c) son más altos en la relación 50C-50CH, con una diferencia significativa. Esto es muy importante para las aplicaciones de IT, ya que se puede producir una amplia gama de cepas sin abandonar el rango lineal viscoelástico y sin producir modificaciones en los andamios. Esta sinergia observada en las mezclas de gelatina-quitosano podría ser consecuencia de una organización óptima de la cadena. Por tanto, denominaremos a esta proporción 50G-50CH, muestra de referencia, la cual será utilizada para los posteriores ensayos de caracterización morfológicas de los andamios como son la distribución del tamaño de poro y la microscopia electrónica de barrido (SEM).

Centrándose en los resultados obtenidos en los diferentes protocolos y comparándolos, el protocolo 3 destaca de los demás, obteniendo las mejores propiedades mecánicas, que se reflejan en las mayores deformaciones críticas (γ_c) y en lo mayores valores del E' a 1 Hz (E'_1). Sin embargo, en el protocolo 2 también se obtuvo mejores propiedades con respecto al protocolo 1, aunque sin alcanzar los valores obtenidos en el protocolo 3. Esta comparación entre los protocolos se puede evaluar mejor observando la Tabla 3, que muestra los valores de K_{r1} de los diferentes sistemas calculados utilizando la ecuación 1.

Tabla 3. Valores de K_{i1} para los andamios con diferentes proporciones de gelatina (G) y quitosano (CH). K_{21} : relación entre los protocolos 2 y 1. K_{31} : relación entre los protocolos 3 y 1

Referencia	K_{21}	K_{31}
100G-0CH	1,49 ^a	1,63 ^b
50G-50CH	1,60 ^b	3,50 ^d
0G-100CH	2,16 ^c	3,46 ^d

Nota: Letras diferentes corresponden a valores significativamente diferentes

Se puede observar que cuando se aplicó TT en los métodos de fabricación (protocolos 2 y 3), las muestras de 0G-100CH aumentan sus E' más que en aquellas composiciones en las que la gelatina está en mayor proporción (50G-50CH y 100G-0CH). Esto ocurre posiblemente porque el efecto térmico induce mejor las interacciones producidas entre las cadenas de CH, que no son las mismas en la G debido al impedimento estérico producido por las ramificaciones de la cadena, lo que dificulta su reordenamiento. Por lo tanto, se deduce que los aumentos en las relaciones de los protocolos 2 y 3 con respecto a 1 se deben principalmente al quitosano (CH). Por otro lado, el protocolo 3 mejora significativamente al protocolo 2 en todas las composiciones.

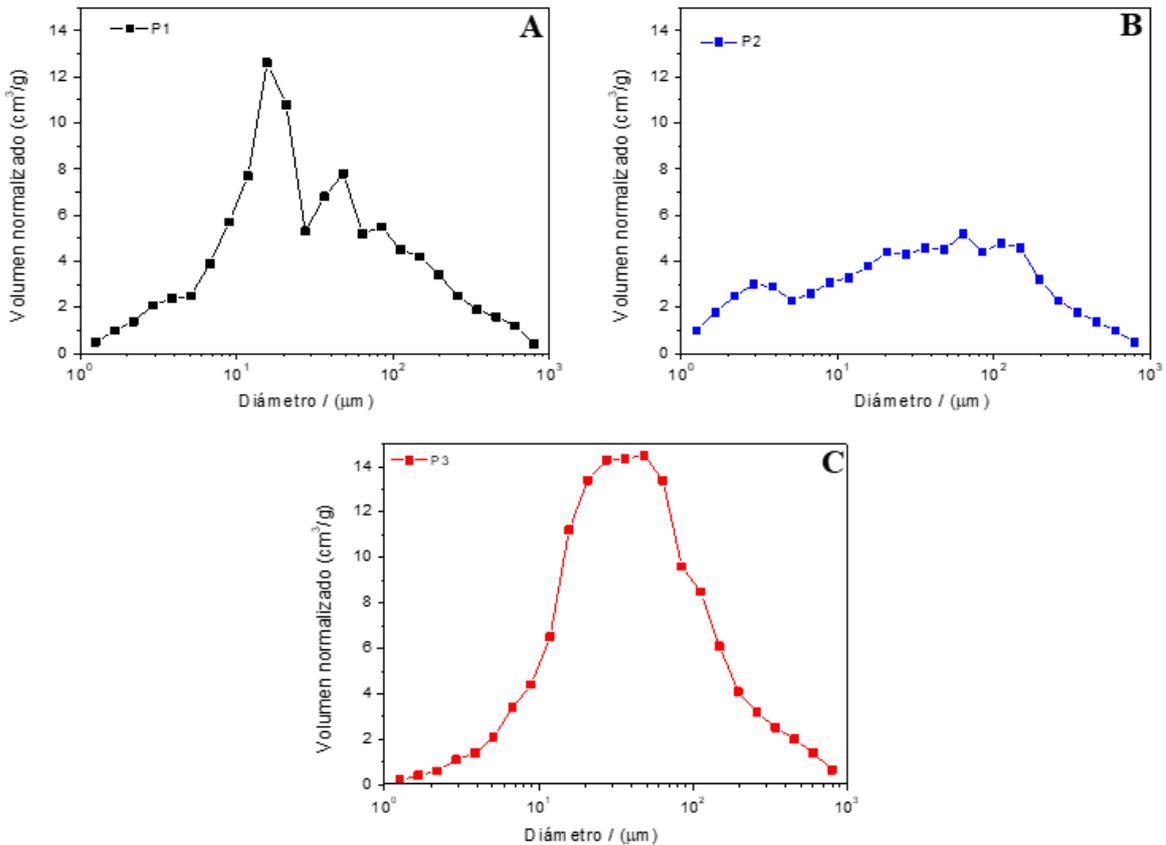
4.2 Propiedades morfológicas

Porosidad y distribución del tamaño de poro

En la Tabla 2 se muestran los valores de la porosidad analítica de los diferentes andamios. Como se puede observar, los andamios obtenidos por el protocolo 1 tuvieron la mayor porosidad, aunque con ligeras diferencias (no más del 2%). Esto podría conducir a que estos sistemas tengan las propiedades reológicas más bajas. Además, la relación G-CH también influyó, causando que, en general, la porosidad disminuya a medida que aumenta el porcentaje de CH en los sistemas.

La Figura 3 muestra las distribuciones de tamaño de poro promedio de la composición de referencia (50G-50CH), para los tres métodos de fabricación (P1, P2 y P3). En la Figura 3A (protocolo 1), se puede observar un perfil que muestra una distribución bimodal con dos picos de aproximadamente 15 y 45 μm . Este hecho sugiere que la polidispersión de los tamaños fue alta (baja uniformidad), presentando también altos porcentajes de poros en tamaños altos. Esto puede significar que, aunque no había muchos poros grandes, su presencia puede haber afectado las propiedades mecánicas. En cualquier caso, el tamaño de poro promedio fue de 35,6 μm . El tamaño medio de poro de los andamios fabricados con el protocolo 2 fue de 28,7 μm . Sin embargo, este sistema (Figura 3B) fue el sistema más polidisperso sin ninguna distribución unimodal, presentando porcentajes de poros casi uniformes en todo el rango de diámetro estudiado. Finalmente, en la Figura 3C, que corresponde a los andamios fabricados mediante el protocolo 3, hay una distribución unimodal con un pico de alrededor de 50 μm . Aunque la distribución fue menos polidispersa, este sistema tenía un tamaño de poro medio mayor que los otros (51,2 μm). En cualquier caso, este tamaño de poro más grande no implica ningún inconveniente, ya que facilitará la entrada de células y la neovascularización de los andamios una vez implantados. En general, se establece que, para el desarrollo de andamios de tejidos blandos, se requiere un rango de tamaño de poro entre 20 y 200 μm (Esteve, 2013).

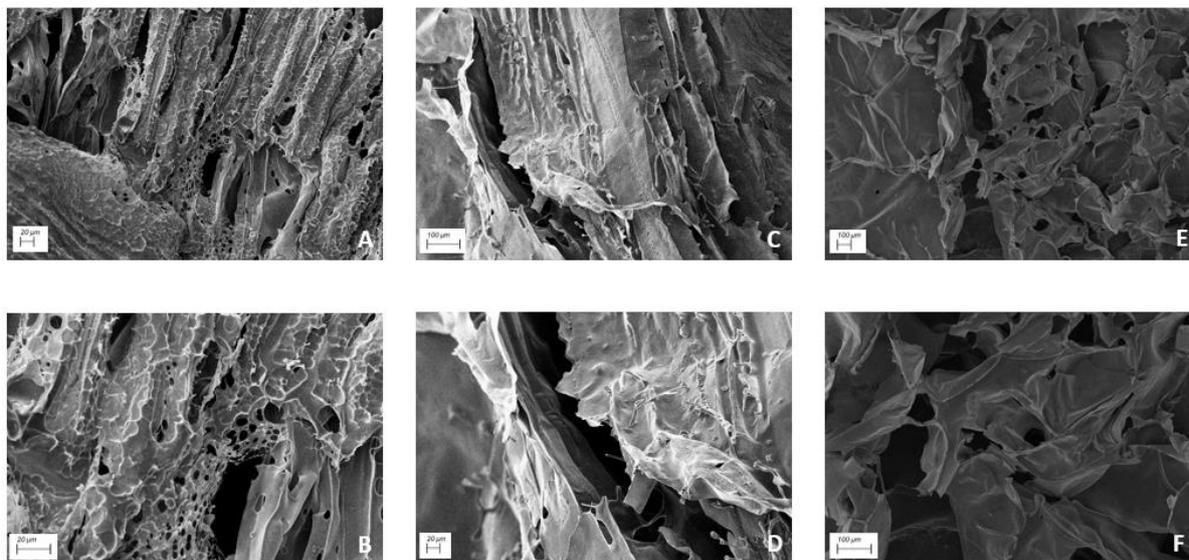
Figura 3. Distribución del tamaño de poros para sistemas binarios con proporciones de 50G-50CH, usando los diferentes métodos de fabricación: (A) Protocolo 1, (B) Protocolo 2 y (C) Protocolo 3



Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La Figura 4 muestra las micrográficas para los andamios 50G-50CH obtenidos por los tres protocolos (protocolo 1: 4A y 4B, protocolo 2: 4C y 4D y protocolo 3: 4E y 4F). Las Figuras 4A y 4B muestran que hay porosidad en todo el andamio, lo que confirma los valores obtenidos por el método analítico (alrededor del 98%). También muestra que los poros se distribuyen de manera heterogénea en todo el andamio procesado por el protocolo 1, con una pequeña distribución de poros grandes (en forma de agujeros) y principalmente una pequeña distribución de poros, que corrobora lo que se discutió en la sección anterior (Figura 3). Por otro lado, las Figuras 4C y 4D muestran que el andamio obtenido por el protocolo 2 tiene una gran heterogeneidad, como se obtuvo en las mediciones de porosimetría (con respecto al tamaño de poro). Finalmente, las Figuras 4E y 4F muestran la porosidad presentada a través del andamio procesado por el protocolo 3, corroborando los valores obtenidos en el método analítico (una porosidad alrededor del 97%). En este caso, se observa más de cerca una distribución más homogénea.

Figura 4. Micrografías de SEM de los andamios con 50% en peso de gelatina y 50% en peso de quitosano (50G-50CH) fabricados por los diferentes protocolos. A-B: Protocolo 1. C-D: Protocolo 2. E-F: Protocolo 3



5. Conclusiones

Se ha logrado el desarrollo de un andamio poroso de biopolímeros a través de un proceso que consta de dos etapas: preparación de una solución y una etapa de liofilización. Se estudiaron diferentes sistemas (diferentes relaciones en la proporción de G-CH con diferentes protocolos) analizando sus propiedades reológicas y microestructurales. Los resultados que se obtienen demuestran que las propiedades de los andamios experimentan una fuerte dependencia: con la proporción y tipo de las materias primas usadas, así como del método de preparación, es decir, depende de la forma en que se procese el andamio.

Los andamios se pueden obtener con diferentes propiedades mecánicas dependiendo de la proporción de gelatina (G) y quitosano (CH). En general, un mayor porcentaje de quitosano conduce a andamios con mayores módulos elásticos. Sin embargo, se detectó un efecto sinérgico para el sistema 50G-50CH en las propiedades mecánicas, lo cual es relevante para su uso potencial como andamio en Ingeniería de tejidos. Más específicamente, este sistema muestra una mejora aparente en el módulo elástico, los valores del tamaño de poro y, especialmente, en la deformación crítica.

Por otro lado, las propiedades mecánicas se ven afectadas por el método de fabricación con el que se realiza el andamio. Se puede afirmar que la aplicación de un tratamiento térmico (protocolo 2 y 3) produce un aumento considerable en las propiedades mecánicas, posiblemente debido a alguna mejora en la solubilidad y, sobre todo, a la estructuración de la cadena que se produce en la matriz del biopolímero cuando se le aplica.

En cualquier caso, independientemente de la composición y el método de fabricación utilizados, los andamios obtenidos en el presente trabajo constituyen matrices de biopolímeros (ya que están formados por G y CH), con una porosidad superior al 95% (modelo analítico de porosidad) y tamaños de poros e interconectividad adecuados para aplicación en Ingeniería de tejidos.

5.1 Limitaciones encontradas y posibles líneas futuras

La principal limitación que se encuentra en el presente trabajo viene dada por la propia técnica en sí. Una de las limitaciones que presenta es el tiempo de procesado, independientemente del protocolo utilizado, la obtención de un andamio se demora mínimo 27 horas. Otra limitación es la geometría de los andamios ya que estos obtienen la del molde donde se realizan.

Una posible línea futura que actualmente se está desarrollando, es combinar esta técnica con la bioimpresión 3D, cuyo objetivo final es que el andamio posea una estructura biomimética, la cual le otorgue la posibilidad de adoptar cualquier estructura macroscópica que imite al tejido a sustituir.

Referencias

- Al-Munajjed, A. A., Hien, M., Kujat, R., Gleeson, J. P., Hammer, J., 2008. Influence of pore size on tensile strength, permeability and porosity of hyaluronan-collagen scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(8), 2859-2864.
- Arévalo, F. R., Osorio, S. A., Valcárcel, N. A., Ibarra, J. C., Valero, M. F., 2018. Characterization and in vitro Biocompatibility of Binary Mixtures of Chitosan and Polyurethanes Synthesized from Chemically Modified Castor Oil, as Materials for Medical Use. *Polymers from Renewable Resources*, 9(1), 23-38.
- Dagalakis, N., Flink, J., Stasikelis, P., Burke, J. F., Yannas, I. V., 1980. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *Journal of biomedical materials research*, 14(4), 511-528.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., Chiellini, E., 2011. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, 36(8), 981-1014.
- Esteve, L. S., 2013. Síntesis y caracterización de scaffolds poliméricos para la ingeniería de tejidos (Doctoral dissertation, Universitat de València).
- Geutjes, P. J., Daamen, W. F., Buma, P., Feitz, W. F., Faraj, K. A., van Kuppevelt, T. H., 2006. From molecules to matrix: construction and evaluation of molecularly defined bioscaffolds. In *Tissue Engineering* (pp. 279-295). Springer, Boston, MA.
- Levengood, S. K. L., Zhang, M., 2014. Chitosan-based scaffolds for bone Tissue Engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(21), 3161-3184.
- Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., De Yao, K., 2003. Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067-1074.
- Offeddu, G. S., Ashworth, J. C., Cameron, R. E., Oyen, M. L., 2015. Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for Tissue Engineering applications. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 42, 19-25.
- Perdivara, I., Yamauchi, M., Tomer, K.B., 2013. Molecular Characterization of Collagen Hydroxylysine O-Glycosylation by Mass Spectrometry: Current Status. *Australian Journal of Chemistry*, 66, 760-769.
- Perez-Puyana, V., Felix, M., Romero, A., Guerrero, A., 2019. Influence of the processing variables on the microstructure and properties of gelatin-based scaffolds by freeze-drying. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(25), 47671.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Rubio-Valle, J. F., Guerrero, A., Romero, A., 2019. Gelatin vs collagen-based sponges: evaluation of concentration, additives and

- biocomposites. *Journal of Polymer Research*, 26(8), 190.
- Perez-Puyana, V., Romero, A., Guerrero, A., 2016. Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(6), 1462-1468.
- Sachlos, E., Czernuszka, J. T., 2003. Making Tissue Engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of Tissue Engineering scaffolds. *Eur Cell Mater*, 5(29), 39-40.
- Senaratne, L. S., Park, P. J., Kim, S. K., 2006. Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource technology*, 97(2), 191-197.
- Vacanti, C. A., Kim, W., Upton, J., Vacanti, M. P., Mooney, D., 1993. Tissue Engineered growth of bone and cartilage. In *Transplantation proceedings* (Vol. 25, No. 1, pp. 1019-1021).
- Van den Bosch, E., Gielens, C., 2003. Gelatin degradation at elevated temperature. *International journal of biological macromolecules*, 32(3-5), 129-138.
- Yannas, I. V., Burke, J. F., 1980. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. *Journal of biomedical materials research*, 14(1), 65-81.
- Zhang, H., Neau, S. H., 2001. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22(12), 1653-1658.
- Zhang, Q., Lv, S., Lu, J., Jiang, S., Lin, L., 2015. Characterization of polycaprolactone/collagen fibrous scaffolds by electrospinning and their bioactivity. *International journal of biological macromolecules*, 76, 94-101.

Objetivos de desarrollo sostenible

El objetivo de desarrollo sostenible que se persigue en este trabajo es garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades, el cual corresponde con el objetivo de desarrollo sostenible número 3.

Figura 5. Imagen del objetivo de desarrollo sostenible número 3

