

Influencia de la composición y el procesado en andamios elaborados con gelatina y quitosano

J.F. Rubio-Valle^{1*}, V. Perez-Puyana², M. Jiménez-Rosado² y A. Romero¹

¹Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Física, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla, Spain

²Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, 41012, Sevilla, Spain.

Influence of composition and processing in scaffolds elaborated with gelatin and chitosan

Influència de la composició i el processat en bastides elaborades amb gelatina i quitosà

RECEIVED: 8 JULY 2019; REVISED: 27 SEPTEMBER 2019; ACCEPTED: 16 OCTOBER 2019

SUMMARY

The present study consisted of the development of scaffolds based on gelatin (G) and/or chitosan (Q) through modifications in the main processing method. This process consists in the fabrication of a hydrogel which is, then, submitted to a freeze-drying stage. In order to compare the effect of the different modifications, the mechanical properties of the different systems were measured using dynamic compressive strain and frequency sweep tests. In addition, their porosity, through an analytic model, and their structure and fiber distribution, through scanning electron microscopy (SEM) were also evaluated. The obtained results have demonstrated that there is a strong dependence in the properties showed by the scaffolds with both the modifications introduced in the processing method and the proportion of the materials used (G y Q). Furthermore, the properties were found to improve for systems with a high chitosan content after being submitted to a heat treatment at 50 °C with agitation.

Keywords: Gelatin; chitosan; freeze-drying; scaffold; porosity; biopolymers

RESUMEN

El presente trabajo se centró en el desarrollo de andamios basados en gelatina (G) y/o quitosano (Q) mediante variaciones del método de fabricación basado en la creación de hidrogeles y posterior secado por liofilización. Con objeto de evaluar las distintas variantes en el método de fabricación y la composición, se evalúan sus propiedades mecánicas mediante barridos de de-

formación y de frecuencia; su porosidad mediante un modelo analítico; y su estructura y disposición de las fibras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados obtenidos demostraron que las propiedades de los andamios experimentan una fuerte dependencia con las variantes en el método de fabricación, así como con la proporción de las materias primas (G y Q). De hecho, se encontró que se obtienen mejores propiedades cuando se emplean sistemas con un alto contenido en quitosano y, además, se les aplica un tratamiento térmico a 50 °C con agitación.

Palabras clave: Gelatina; quitosano, liofilización, andamio, porosidad, propiedades mecánicas.

RESUM

El present treball es va centrar en el desenvolupament de bastides basades en gelatina (G) i / o quitosà (Q) mitjançant variacions del mètode de fabricació basat en la creació d'hidrogeles i posterior assecat per liofilització. A fi d'avaluar les diferents variants en el mètode de fabricació i la composició, s'avaluen les seves propietats mecàniques mitjançant escombrats de deformació i de freqüència; la seva porositat mitjançant un model analític; i la seva estructura i disposició de les fibres mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (SEM). Els resultats obtinguts van demostrar que les propietats

*Corresponding author: jrvalle@us.es

de les bastides experimenten una forta dependència amb les variants en el mètode de fabricació, així com amb la proporció de les matèries primeres (G i Q). De fet, es va trobar que s'obtenen millors propietats quan s'empren sistemes amb un alt contingut en quitosà i, a més, se'ls aplica un tractament tèrmic a 50 °C amb agitació.

Paraules clau: Gelatina, quitosà, liofilització, bastida, porositat, propietats mecàniques.

1. INTRODUCCIÓ

La Ingeniería Tisular, o Ingeniería de Tejidos (IT) surgió por primera vez en los años 80, tomando como punto de partida los estudios pioneros de Yannas, y, sobre todo Vacanti, quien concibió la idea de dotar a las células de un soporte para que pudieran crecer y, en último término, formar un tejido¹. No obstante, hasta el año 2000 no se obtuvo una definición de IT que fuera aceptada por la mayoría de las personas que trabajaban en el campo, definiéndose 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 enfermedades². De esta forma, la IT es un campo multidisciplinar donde interactúan distintas ramas de la ciencia como pueden ser la Química, Medicina, Biología e incluso la Ingeniería. Consta esencialmente de tres elementos: las células, los factores de crecimiento y los andamios, siendo estos últimos la plataforma de anclaje y adhesión para las células, dando lugar a su proliferación y diferenciación. Dentro de los andamios, aquellos con una determinada porosidad 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 y la estructura interna del andamio tienen 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 óptimo³. 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. 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.

Dichos andamios 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 día⁴, las opciones más atractivas son aquellas basadas en proteínas y polisacáridos, debido a su alta biocompatibilidad. Así, se pueden encontrar andamios de colágeno, fibrina, elastina, alginato, quitosano, etc. No obstante, entre todas las materias primas posibles,

destacan el colágeno y el quitosano que pueden adoptar multitud de estructuras, similares a las biológicas.

El colágeno es la principal proteína estructural en el espacio extracelular de los diversos tejidos conectivos del cuerpo. Como el componente principal del tejido conectivo, es la proteína más abundante en los mamíferos, constituyendo entre el 25% y 35% del contenido de proteínas de todo el cuerpo. El colágeno consiste en aminoácidos que se enrollan juntos para formar triples hélices de fibrillas alargadas⁵. Este compuesto se encuentra principalmente en tejidos fibrosos como tendones, ligamentos y piel. El colágeno desnaturalizado (denominado gelatina) tiene multitud de aplicaciones, entre las que destaca su aplicación en la industria farmacéutica y en la industria alimentaria⁶.

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 anélidos⁷. 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 biocompatible y biodegradable⁸. 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 procoagulante, por lo que en Estados Unidos y Europa se permite su uso como aditivo en gasas y vendajes, con el fin de evitar hemorragias.

Aunque existe una enorme cantidad de técnicas para la elaboración de andamios, como pueden ser el autoensamblaje, la bioimpresión 3D o el electrohilado, tradicionalmente la técnica desarrollada es la separación de fases⁹. Esta técnica consiste, en grandes rasgos, en preparar una disolución induciendo su gelificación y, a continuación, sublimar el disolvente mediante un proceso de liofilitzación. Además, modificando las condiciones de procesado, con la adición de otros procesos, como tratamientos térmicos, o la adición de diferentes disolventes o compuestos que favorecen el entrecruzamiento o reticulación de la estructura (por ejemplo, glutaraldehído o la elastina), se puede llegar a formar una enorme variedad de estructuras con multitud de microestructuras^{10,11}.

El objetivo global del presente trabajo fue el desarrollo de andamios basados en gelatina (G) y/o quitosano (Q), utilizando un método de fabricación derivado de la técnica de separación de fases. En este sentido, se realizaron andamios al 1% en peso de biopolímeros, utilizando diferentes variables del procesado y distintas proporciones de gelatina/quitosano. Con objeto de evaluar la influencia de la composición y las variables del método de fabricación de los andamios, se evaluaron tanto las propiedades mecánicas (mediante barridos de deformación y frecuencia), como la microestructura (mediante cálculo de porosidad y microscopía electrónica de barrido) de los mismos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

Para la fabricación de los andamios se utilizó como materias primas un aislado proteico de gelatina y quitosano. El aislado proteico de gelatina (G) provino de la piel de pescado (tipo B, Bloom 80-120 g) y fue suministrado por la empresa Henan Boom Gelatin Co. Ltd (China). Este presenta un contenido de proteínas superior al 95% en peso. El quitosano (Q), es un polisacárido de bajo peso molecular ($PM=130.000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), el cual fue suministrado por la empresa Sigma Aldrich (Alemania).

Otros reactivos utilizados como ácido acético y glicerina se adquirieron de Panreac Química, S.A. (España).

2.2 Procesado de andamios

Los andamios se procesaron de acuerdo con un nuevo método descrito previamente por Angulo et al. (2016)¹². Para ello, se prepararon las disoluciones al 1% en peso utilizando como disolvente ácido acético 0,05 M y como soluto una relación de 50G-50Q, ya que en estudios previos esta relación obtuvo la mejor relación de propiedades mecánicas y estructurales¹³. Para favorecer la disolución de los biopolímeros, se aplicó un tratamiento térmico, que consistió en mantener la disolución en agitación durante 2 h a 50°C. Después de esto, se añadió glicerina (0,3% en peso) y el pH se ajustó a 5 usando NaOH 4,0 M. Los diferentes sistemas elaborados se pasaron a una placa de petri de vidrio donde se congelaron durante 2 h a -40°C, para seguidamente liofilizarlos (liofilizadora LyoQuest, Teslar, España) durante 24 h a -80°C y 0,01 mbar.

A este sistema (composición 50G-50Q), se le realizó variaciones durante su procesado para evaluar su influencia. Así, se realizaron tres modificaciones: eliminación de la etapa de adición de glicerina, bajada de la temperatura en la agitación, de 50 a 20 °C, y eliminación de la etapa de agitación (Tabla 1). En este último caso, para solo evaluar la influencia de la agitación se realizó una etapa de calentamiento a 50 °C en un horno. Posteriormente, se eligió el procesado que exhibió mejores propiedades mecánicas para estudiar la influencia de la composición (relación G/Q) en las propiedades del andamio.

2.3 Caracterización de los andamios

2.3.1 Propiedades mecánicas

En primer lugar, se realizó la caracterización mecánica de los andamios mediante un analizador dinámico-mecánico modelo RSA3 (TA Instruments, USA) en modo compresión, usando un sensor de superficie circular (plato-plato) de 15 mm de diámetro. Se llevaron a cabo, en primer lugar, barridos de deformación entre 0,002 y 2% a una frecuencia constante de 1 Hz para determinar el intervalo viscoelástico lineal (LVE) y la deformación crítica (γ_c , mediante curvas esfuerzo-deformación). A continuación, se llevaron a cabo barridos de frecuencia desde 0,02 a 20 Hz y a una deformación dentro del intervalo viscoelástico lineal (inferior a la γ_c). De este ensayo, se obtuvo información de los módulos elástico (E') y viscoso (E''), así como de la relación entre ambos ($\tan(\delta)=E''/E'$) en todo el

intervalo de frecuencia estudiado. Además, con objeto de realizar una comparación más efectiva de los sistemas, se seleccionaron E' y $\tan(\delta)$ a 1 Hz (E'_1 , $\tan(\delta)_1$, respectivamente).

2.3.2 Porosidad

La porosidad (ϵ) de los andamios se obtuvo siguiendo el método descrito por Munajet et al.¹⁴. Así, las porosidades individuales se calcularon utilizando la ecuación 1:

$$\epsilon (\%) = \left(1 - \frac{\rho_s}{\rho_m}\right) \cdot 100 \quad (1)$$

Donde ρ_s es la densidad del andamio (calculada utilizando el peso y el volumen de cada andamio) y ρ_m es la densidad del sistema mixto de G/Q¹⁵, que tiene en cuenta la densidad de la gelatina (0,68 g·cm⁻³) y quitosano (1,456 g·cm⁻³), calculadas mediante Pentapyc 5200e (Quantachrome Instruments, EEUU).

2.3.3 Propiedades morfológicas

Finalmente se observó la microestructura y disposición de las fibras mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, se utilizó el equipo Zeiss AURIGA (EE.UU.) con un detector de electrones secundario a un voltaje de aceleración de 20 kV. No obstante, como los andamios no son conductores, se tuvieron que recubrir usando un tratamiento de "sputtering" que consiste en el recubrimiento con una capa muy fina de oro y paladio, lo que les otorga propiedades conductoras¹⁶. Además, se tuvo que realizar un tratamiento con vapor de tetraóxido de osmio al 1% durante 8 horas para conseguir la fijación del andamio y que este mantenga su estructura.

2.4. Análisis estadístico.

Se realizó un estudio estadístico sobre todos y cada uno de los parámetros seleccionados. Para este estudio se ha llevado a cabo un análisis de varianza de un factor (ANOVA), utilizando tres replicados de cada medida de forma independiente. Seguidamente se calcularon una serie de parámetros estadísticos, entre ellos la media y la desviación estándar. Además, se realizó un test de comparación de medias para evaluar si hay o no diferencias significativas ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Influencia del procesado

En primer lugar, se estudió la influencia del procesado en las propiedades finales del andamio. Para ello, se usó un sistema con una relación 50G-50Q, usando como referencia el procesado realizado mediante las etapas estándar explicado en la sección 2.2. Las modificaciones realizadas fueron, como se indicó en el apartado 2.2, la eliminación de la etapa de adición de glicerina, la bajada de temperatura en la agitación (de 50 a 20 °C) y la eliminación de la etapa de agitación (Tabla 1).

Tabla 1

Referencia	Glicerina	Temperatura (°C)	Agitación
A (Referencia)	SÍ	50	SÍ
B	NO	50	SÍ
C	SÍ	20	SÍ
D	SÍ	50	NO

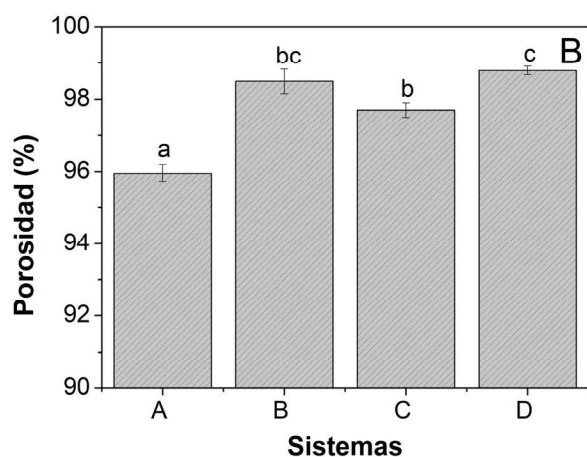
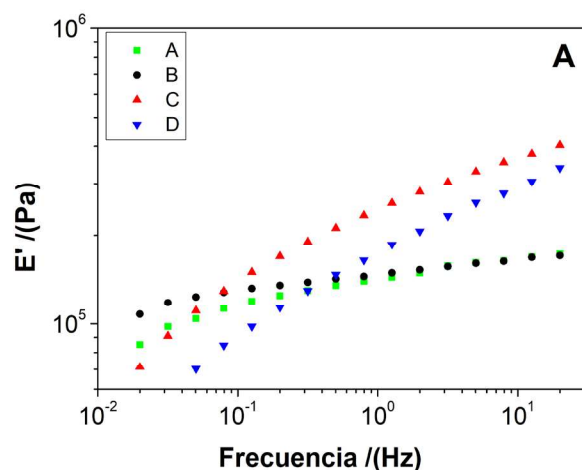


Figura 1: Propiedades mecánicas y porosidad de los andamios elaborados mediante diferentes procesados con una relación 1:1 de gelatina/quitosano (50G-50Q). A: Evaluación del módulo elástico (E') en un intervalo de frecuencia. B: Histograma de la porosidad (%). Las diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Propiedades mecánicas

La Figura 1 muestra los ensayos mecánicos y la porosidad de los sistemas elaborados con las diferentes condiciones de procesado. La Figura 1A muestra la evolución del módulo elástico (E') en función de la frecuencia. Se observa que, dependiendo de las condiciones de procesado utilizadas, E' se vuelve más dependiente o no de la frecuencia aplicada, siendo mayor esta dependencia cuando se disminuye la temperatura (C) o cuando se elimina la etapa de agitación (D). De esta forma, las propiedades mecánicas de estos sistemas van a depender

no solo de la fuerza aplicada, sino también del tiempo de aplicación de la misma. No obstante, aunque estos sistemas son los más dependientes (con respecto a su módulo elástico), son también en los que se obtienen valores de E' mayores. En cuanto al sistema en el que se ha eliminado la etapa de adición de glicerina (B), este no presenta diferencias significativas con respecto al sistema de referencia (A), siendo prácticamente estables en todo el intervalo de frecuencia estudiado. Estas variaciones en el comportamiento mecánico de los diferentes andamios pueden deberse a la diferente estructuración de la proteína en el mismo. Cuando se baja la temperatura en la agitación (C) o simplemente se elimina esta etapa (D) parece que el sistema presenta una mayor dificultad para reordenar su estructura, posiblemente al tener una menor solubilidad de las materias primas (G y Q), resultando en un sistema menos estable. No obstante, la adición o no de glicerina (A y B, respectivamente) parece ser indiferente, no necesitando la glicerina para obtener un sistema estable. Este comportamiento ha hecho que la mayoría de los estudios de andamios de este tipo no utilicen la glicerina en sus composiciones^{12, 17}.

Tabla 2

Referencia	γ_c	E'_1 (MPa)	$\tan(\delta)_1$
A	0,342 ^a	0,142 ^a	0,135 ^a
B	0,243 ^b	0,147 ^a	0,104 ^a
C	0,189 ^c	0,245 ^b	0,328 ^b
D	0,252 ^b	0,175 ^a	0,426 ^c

En la Tabla 2 pueden observarse el módulo elástico a 1 Hz (E'_1), la tangente de pérdidas a 1 Hz ($\tan(\delta)_1$) y la deformación crítica (γ_c) de los sistemas elaborados con los diferentes procesados. En E'_1 , se puede observar que los sistemas donde se ha disminuido la temperatura (C) y se ha eliminado la etapa de agitación (D) son los que obtienen mayores E'_1 , como se observó antes. Esto puede deberse a que estas etapas favorecen la estructuración del andamio haciendo que estos sean más rígidos. No obstante, la tangente de pérdidas a 1 Hz ($\tan(\delta)_1$) es inferior a 1 en todos los casos, por lo que todos los sistemas tienen un predominante carácter elástico, cualidad importante de los mismos para que puedan facilitar el crecimiento de las células en su interior. Este carácter sólido también se puede observar en sistemas similares a los de este estudio¹⁸. En cuanto a la deformación crítica (γ_c), su mayor valor se obtiene cuando el sistema se mantiene en agitación con calor durante 2 h a 50°C (A).

Porosidad

Por otro lado, la Figura 1B presenta un histograma de los valores de porosidad de los distintos sistemas elaborados. Se puede observar que, en todos los sistemas la porosidad es superior al 96 %, siendo una porosidad aceptable para la proliferación de las células¹⁴. Cuando se altera el método de referencia se consiguen porosidades ligeramente superiores, no habiendo diferencias significativas entre las diferentes modificaciones. Este

aumento puede ser el motivo por el que los andamios elaborados por el método C y D presentan un mayor módulo elástico, ya que tienen más volumen libre. No obstante, tienen menor estabilidad con la frecuencia, debido a que tienen una estructura más débil.

Finalmente, el sistema elaborado con el protocolo de referencia (A) es el que tiene una mayor estabilidad en sus propiedades mecánicas (E') y una mayor deformación crítica (γ_c), presentando, además, una porosidad adecuada. Por este motivo, es este el protocolo seguido para el estudio de la influencia de la composición de los andamios.

3.2 Influencia de la proporción gelatina/quitosano

Se han procesado andamios con diferentes proporciones de gelatina/quitosano utilizando el protocolo A como referencia (tratamiento térmico a 50°C durante 2 h con agitación) con el objetivo de estudiar el efecto de cada biopolímero en las propiedades finales de los andamios obtenidos. Los diferentes sistemas elaborados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Referencia	G (% peso)	Q (% peso)
0G-100Q	0	100
25G-75Q	25	75
50G-50Q	50	50
75G-25Q	75	25

Propiedades mecánicas

La Figura 2 muestra los ensayos mecánicos y la porosidad de los andamios elaborados con diferentes concentraciones de C y Q. Así, en la Figura 2A se muestra la evolución del módulo elástico (E') en función de la frecuencia, observándose la influencia que tiene la relación de C/Q con las propiedades mecánicas de los andamios. De esta forma, se ve que mientras mayor es el porcentaje de Q, mayor es el módulo elástico presentado por los sistemas. Además, aunque todos los sistemas son dependientes de la frecuencia, esta dependencia es mayor conforme se aumenta el porcentaje de Q. Esto inculca el mismo comportamiento observado en la Figura 1, es decir, los sistemas con mayor proporción de Q serán posiblemente los más porosos, teniendo un mayor volumen libre que hace que aumente su elasticidad, pero pierda su estabilidad. Comportamientos similares se observan en bibliografía^{17, 19, 20}.

Esta caracterización mecánica se puede completar con la Tabla 3, donde se muestran los valores del módulo elástico y la tangente de pérdidas a 1 Hz (E'_1 y $\tan(\delta)_1$, respectivamente) y la deformación crítica (γ_c). En cuanto a los valores de E'_1 , estos aumentan en los sistemas que tienen una mayor proporción de quitosano, como se comentó antes. No obstante, la $\tan(\delta)_1$ es inferior a 1 en todos los casos, siendo todos los sistemas predominantemente elásticos. Por último, el sistema que presenta una mayor γ_c es el sistema 0G-100Q, lo cual nos induce a pensar que al aumentar el contenido de

quitosano aumentan las propiedades mecánicas ya que, aunque no se trata del sistema más estable con la frecuencia, es el que posee mayor módulo elástico y mayor deformación crítica.

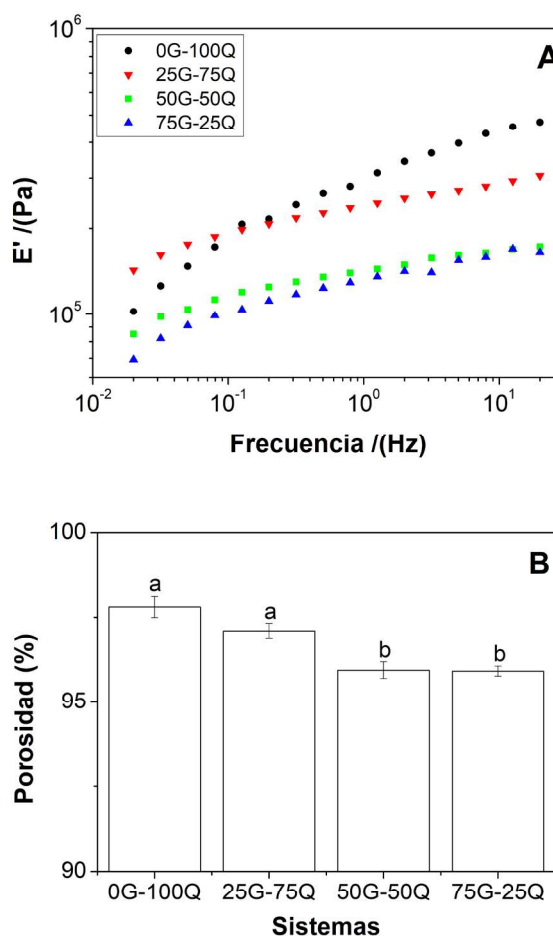


Figura 2: Propiedades mecánicas y porosidad de los andamios con diferentes proporciones de gelatina/quitosano (G/Q) elaborados mediante el método estándar (método A). A: Evaluación del módulo elástico (E') en un intervalo de frecuencia. B: Histograma de la porosidad (%). Las diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Porosidad

Los valores de porosidad de los distintos sistemas elaborados se encuentran representados en la Figura 2B. Se puede observar que, para todos los sistemas, la porosidad es superior al 96 %, obteniéndose una porosidad ligeramente mayor en los sistemas que tienen mayor proporción de Q, como se intuía con las propiedades mecánicas.

3.3 Propiedades morfológicas

Como el sistema 0C-100Q es el que mejores propiedades mecánicas y porosidad obtuvo fue el seleccionado para realizarle una caracterización morfológica mediante microscopía electrónica de barrido, donde se estudió su microestructura y disposición de fibras (porosidad e interconectividad de poros). La Figura 3 muestra la micrografía obtenida de este sistema. En la

imagen se aprecia una excelente interconectividad entre los poros dada la disposición de las fibras.

Estas propiedades morfológicas, tanto porosidad como interconectividad de poros, son un parámetro fundamental y excluyente a la hora de seleccionar un sistema como andamio, como se mencionó la introducción. Esto se debe a que una distribución de poros bien interconectados es necesaria en la mayoría de las aplicaciones de la IT con el fin de lograr un mejor transporte de nutrientes entre el medio y las células y facilitar la migración celular. También se suele requerir una porosidad elevada y una relación área superficial/volumen alta para optimizar el anclaje celular y el crecimiento de neo-tejidos, así como para un transporte uniforme de células. De esta forma, parámetros arquitectónicos de los poros tales como la geometría, el tamaño, la interconectividad, la orientación y la distribución también son importantes para el cultivo celular, el transporte de masa, la formación de tejido en tres dimensiones y las propiedades mecánicas teniendo en cuenta que las estructuras deben ser procesables fácilmente en estructuras tridimensionales. Todo esto nos hace indicar que la muestra 0G-100Q realizada con el protocolo estándar, es adecuada para las aplicaciones de la Ingeniería de Tejidos³.

Tabla 4

Referencia	γ_c (%)	E'_1 (MPa)	$\tan(\delta)_1$
0G-100Q	0,597 ^a	0,297 ^a	0,327 ^a
25G-75Q	0,330 ^b	0,241 ^a	0,162 ^b
50G-50Q	0,342 ^b	0,142 ^b	0,135 ^b
75G-25Q	0,345 ^b	0,132 ^b	0,151 ^b



Figura 3: Micrografía tomada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) al sistema con una proporción 0:100 de gelatina/quitosano (G/Q) elaborada mediante el protocolo estándar (método A).

4. CONCLUSIONES

En base a los resultados, se han obtenido matrices proteicas porosas (andamios) mediante el proceso de separación de fases (congelación de una solución y liofilización de la misma) con adecuadas propiedades

mecánicas y morfológicas para su uso en Ingeniería de Tejidos.

Se ha observado que la relación gelatina/quitosano usada para la elaboración de andamios hace que estos tengan diferentes propiedades mecánicas y porosidad. En general, un mayor porcentaje de quitosano conduce a andamios con mejores cualidades. Por otro lado, el cambio en las condiciones también afecta a las propiedades del andamio, siendo el tratamiento térmico con agitación el que mayor estabilidad del módulo elástico y mayor deformación crítica presenta debido a la mejor estructuración de las cadenas de la matriz biopolimérica.

No obstante, independientemente de la composición y el método de fabricación, los andamios obtenidos en el presente trabajo constituyen a una matriz biopolimérica con adecuadas propiedades mecánicas, porosidad e interconectividad de poros, lo que es beneficioso para el crecimiento y proliferación de las células en su interior.

5. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es parte de un proyecto de investigación (Ref. RTI2018-097100-B-C21) de MICINN, los autores agradecen su apoyo financiero. Los autores también agradecen al Servicio de Microscopía (CITIUS-Universidad de Sevilla) por proporcionar acceso completo y asistencia en las mediciones de SEM. Finalmente, los autores agradecen las becas predoctorales de Víctor Pérez-Puyana (VPPI-US) y Mercedes Jiménez-Rosado (FPU17/01718-MEFP).

6. REFERENCIAS

1. N. Dagalakis, J. Flink, P. Stasikelis, J. F. Burke, and I. V. Yannas, "Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 511–528, Jul. 1980.
2. M. Machluf, A. Atala, and A. Reddi, "Tissue engineering; emerging concepts," *Graft*, vol. 1, pp. 1–31, 2000.
3. E. Sachlos and J. T. Czemuszka, "Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds," *Eur. Cells Mater.*, vol. 5, pp. 29–40, 2003.
4. P. J. Geutjes, W. F. Daamen, P. Buma, W. F. Feitz, K. A. Faraj, and T. H. Van Kuppevelt, "From Molecules to Matrix: Construction and Evaluation of Molecularly Defined Bioscaffolds," in *Tissue Engineering*, Boston: Springer, 2006, pp. 279–295.
5. G. A. Di Lullo, S. M. Sweeney, J. Körkkö, L. Ala-Kokko, and J. D. San Antonio, "Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 6, pp. 4223–4231, Feb. 2002.
6. Q. Liang, L. Wang, W. Sun, Z. Wang, J. Xu, and H. Ma, "Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (Acipenser

- schrenckii),” *Process Biochem.*, vol. 49, no. 2, pp. 318–323, 2014.
7. H. Hernández, E. Águila, O. Flores, E. L. Viveros, and E. Ramos, “Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón,” *Superf. y Vacío*, vol. 22, no. 3, pp. 57–60, 2009.
 8. E. Khor and L. Y. Lim, “Implantable applications of chitin and chitosan,” *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2339–2349, Jun. 2003.
 9. S.-N. Park, J.-C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, and H. Suh, “Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 4, pp. 1205–1212, 2002.
 10. V. M. Perez-Puyana, M. Jiménez-Rosado, A. Romero, and A. Guerrero, “Highly porous protein-based 3D scaffolds with different collagen concentrates for potential application in tissue engineering,” *J. Appl. Polym. Sci.*, p. 47954, May 2019.
 11. V. Perez-Puyana, A. Romero, and A. Guerrero, “Influence of collagen concentration and glutaraldehyde on collagen-based scaffold properties,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 104, no. 6, pp. 1462–1468, Jun. 2016.
 12. D. E. L. Angulo and P. J. do A. Sobral, “The Effect of Processing Parameters and Solid Concentration on the Microstructure and Pore Architecture of Gelatin-Chitosan Scaffolds Produced by Freeze-Drying,” *Mater. Res.*, vol. 19, no. 4, pp. 839–845, 2016.
 13. W. W. Thein-Han, J. Saikhun, C. Pholpramoo, R. D. K. Misra, and Y. Kitiyanant, “Chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP–buffalo embryonic stem cells,” *Acta Biomater.*, vol. 5, no. 9, pp. 3453–3466, Nov. 2009.
 14. A. A. Al-Munajjed, M. Hien, R. Kujat, J. P. Gleeson, and J. Hammer, “Influence of pore size on tensile strength, permeability and porosity of hyaluronan-collagen scaffolds,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 19, no. 8, pp. 2859–2864, Aug. 2008.
 15. Y. Yang, X. Zhu, W. Cui, X. Li, and Y. Jin, “Electrospun Composite Mats of Poly [(D, L - lactide) -co- glycolide] and Collagen with High Porosity as Potential Scaffolds for Skin Tissue Engineering,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 294, pp. 611–619, 2009.
 16. S. K. L. Levengood and M. Zhang, “Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 21, p. 3161, 2014.
 17. R. Tylingo, G. Gorczyca, S. Mania, and P. Szweda, “Preparation and characterization of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite,” vol. 103, pp. 131–140, 2016.
 18. V. Perez-Puyana, M. Felix, A. Romero, and A. Guerrero, “Influence of the processing variables on the microstructure and properties of gelatin-based scaffolds by freeze-drying,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 136, no. 25, pp. 1–8, 2019.
 19. Z. Shahbazarab, A. Teimouri, A. N. Chermahini, and M. Azadi, “Fabrication and characterization of nanobiocomposite scaffold of zein/chitosan/nanohydroxyapatite prepared by freeze-drying method for bone tissue engineering,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 108, pp. 1017–1027, Mar. 2018.
 20. A. Martínez, M. D. Blanco, N. Davidenko, and R. E. Cameron, “Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 132, pp. 606–619, 2015.