

03-009

FRUCTOSE CROSSLINKED SCAFFOLDS OBTAINED WITH COLLAGEN VIA FREEZE-DRYING FOR TISSUE ENGINEERING.

Pérez Puyana, Víctor Manuel ⁽¹⁾; Sánchez-Cid, Pablo ⁽¹⁾; Rubio Valle, José Fernando ⁽²⁾;
Jiménez Rosado, Mercedes ⁽¹⁾; Romero, Alberto ⁽¹⁾

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

Tissue Engineering has led to the development of this field by designing scaffolds with better properties that can fulfill its purpose of better tissue regeneration, consequently improving people's quality of life. Scaffolds are matrix, predominantly composed by polymeric materials, which main function is giving support to cell adhesion and the subsequently growth, leading to the regeneration of the damaged tissue. Collagen is one of the most abundant proteins in animals and widely used biopolymer in Tissue Engineering, due to its structure, biocompatibility and the ease of its modification and processability. In this study, collagen scaffolds with different concentrations and processing techniques, by obtaining hydrogels and aerogels, will be prepared and then characterized, specially looking at its morphology and mechanical properties. Moreover, fructose was added as a chemical crosslinking agent to study the influence on scaffolds' properties. The results obtained revealed that scaffolds with higher collagen concentrations were stiffer and more deformable. Comparing both systems, aerogels were stiffer but hydrogels were more deformable and with higher pore size homogeneity. Fructose addition produced a slight increase in the critical strain, together with an increase in the elastic modulus.

Keywords: Collagen; fructose; scaffolds; tissue engineering.

ANDAMIOS ENTRECruzADOS CON FRUCTOSA OBTENIDOS A PARTIR DE COLÁGENO MEDIANTE SECADO POR LIOFILIZACIÓN PARA INGENIERÍA DE TEJIDOS.

La Ingeniería de Tejidos ha propiciado el desarrollo de andamios con mejores propiedades que pueden cumplir su propósito de una mejor regeneración de tejidos, mejorando consecuentemente la calidad de vida de las personas. Los andamios son matrices cuya función principal es dar soporte a la adhesión celular y su posterior crecimiento, lo que lleva a la regeneración del tejido dañado. El colágeno es una de las proteínas más abundantes en animales y biopolímero ampliamente utilizado en Ingeniería de Tejidos, por su estructura, biocompatibilidad y la facilidad de su modificación y procesabilidad. En este estudio se prepararán y caracterizarán andamios de colágeno con diferentes concentraciones y técnicas de procesamiento, mediante la obtención de hidrogeles y aerogeles, atendiendo especialmente a su morfología y propiedades mecánicas. Además, se utilizó fructosa como agente químico de entrecruzamiento para estudiar su influencia en las propiedades de los andamios. Los resultados obtenidos revelaron que los andamios con mayores concentraciones de colágeno eran más rígidos y deformables. Comparando ambos sistemas, los aerogeles eran más rígidos pero los hidrogeles, aunque más deformables y con mayor homogeneidad de tamaño de poro. La adición de fructosa produjo un ligero aumento de la deformación crítica, junto con un aumento del módulo elástico.

Palabras claves: Colágeno; fructosa; andamios; ingeniería de tejidos.

Correspondencia: Víctor Manuel Pérez Puyana vperez11@us.es

Este trabajo es parte de un proyecto de investigación (Ref RTI2018-097100-B-C21) del Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación (MINECO/AEI/FEDER, EU). Los autores agradecen su apoyo financiero y también al servicio de microscopía del CITIUS (Universidad de Sevilla) por dar acceso y asistencia técnica. Finalmente, los autores agradecen a la Universidad de Sevilla y la Junta de Andalucía por el contrato postdoctoral de Víctor M. Pérez Puyana (PAIDI-DOCTOR) y al Ministerio de Educación y Formación Profesional por la beca predoctoral de Mercedes Jiménez Rosado (FPU2017/01718).



©2021 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 de tejidos se define como un campo multidisciplinar que aplica principios y métodos de la ingeniería y de las ciencias de la salud, para el desarrollo de sustitutos biológicos con el objetivo de restaurar, mantener y mejorar la función tisular (Reddi, 2000). Se basa en tres elementos básicos: células, factores de crecimiento y andamios (Van Vlierberghe et al., 2011). Así, los factores de crecimiento se encargan de favorecer el crecimiento y proliferación celular (Dagalakis et al., 1980), mientras que los andamios son biomateriales biocompatibles diseñados fundamentalmente para sustentar las necesidades biológicas de las células involucradas (Arias et al., 2018). Esto es posible debido a que permiten ofrecer el soporte mecánico y estructural necesario para la formación del nuevo tejido (Sachlos y Czernuszka, 2003). La mayoría de los estudios en este campo tratan sobre el desarrollo de estructuras 3D con alta porosidad (andamios o *scaffolds*) para proporcionar un ambiente ideal para la regeneración de tejidos y órganos (Perez-Puyana et al., 2020).

En este estudio, dos tipos de andamios fueron sintetizados y caracterizados, a saber, hidrogeles y aerogeles. Según Hoffman, los hidrogeles son redes de polímeros hidrofílicos que pueden absorber entre un 10-20% y hasta miles de veces su peso seco en agua. Los hidrogeles pueden ser químicamente estables o pueden degradarse y al final desintegrarse y disolverse. Pueden ser químicos o físicos dependiendo de las interacciones intermoleculares (Hoffman, 2012). Por otra parte, los aerogeles son sistemas sólidos con meso- y macroporos, cuyos diámetros pueden ser de hasta unas centenas de nanómetros. Además, los aerogeles tienen una alta porosidad (hasta un 95%), siendo la fase dispersa gaseosa. Algunos estudios señalan la posibilidad de fabricar aerogeles en condiciones de secado a temperatura ambiente, aunque generalmente se requieren condiciones supercríticas (Perez-Puyana et al., 2019a).

La ingeniería de Tejidos incluye el diseño y modificación de los biomateriales que induzcan la formación de tejido en un ambiente biomimético con propiedades bioquímicas apropiadas. Los polímeros son los materiales más prometedores para la consecución de estos requisitos, ya que están disponibles en un amplio rango de composiciones, propiedades y formas, además de permitir procesar estructuras complejas. En este sentido, el uso de polímeros naturales, como proteínas y polisacáridos, es especialmente interesante, dado que son los principales componentes de o tienen propiedades macromoleculares similares a las de las matrices extracelulares nativas como, por ejemplo, proteínas como el colágeno, la elastina o combinaciones de ambas proteínas. El colágeno es el biopolímero más abundante en animales y, por lo tanto, es uno de los materiales más empleados en ingeniería de tejidos para la producción de andamios.

Entre los diferentes tipos de colágeno, el colágeno fibrilar es el más abundante en los vertebrados, desempeñando un importante papel estructural, que consiste en proporcionar a los tejidos una arquitectura molecular, forma y resistencia, como resistencia a tracción en piel y ligamentos. Su popularidad en ingeniería tisular se basa en su biocompatibilidad, bioabsorbabilidad y no inmunogenicidad. Puede ser procesado de diferentes formas (láminas, esponjas, espumas, polvos, matrices de nanofibras, etc.) y es soluble en disoluciones ácidas. Además, un factor clave en ingeniería tisular es la capacidad de modular la tasa de degradación mediante diferentes métodos de reforzamiento como pretratamientos enzimáticos o estrategias de entrecruzamiento (Nair y Laurencin, 2007).

El entrecruzamiento consiste en la formación de nuevos enlaces o secuencias de enlaces químicos relativamente cortos para enlazar o conectar cadenas poliméricas. Este fenómeno puede suceder durante la reacción de polimerización, empleando los monómeros apropiados o en una etapa posterior a la polimerización utilizando agentes de entrecruzamiento que promuevan las reacciones necesarias para unir diferentes moléculas poliméricas (Perez-Puyana et al., 2019a). La importancia de los procesos de entrecruzamiento recae en la mejora

de las propiedades mecánicas y estabilidad a altas temperaturas, dando lugar a materiales con propiedades óptimas para su aplicación en industria. Los compuestos naturales que pueden actuar como agentes de entrecruzamiento químico resultan de especial interés, dado que no reducen la biocompatibilidad del andamio, por ejemplo, la fructosa, que es un carbohidrato presente en diversas verduras, frutas y en la miel. Se trata de un monosacárido con la misma estructura que la glucosa, puesto que son isómeros (Ibrahim et al., 2006). La fructosa se obtiene empleando enzimas microbianas para hidrolizar el almidón extraído de distintos cereales y transformarlo en glucosa que, mediante un proceso de isomerización, se convierte en fructosa, concretamente D-fructosa. La fructosa, y generalmente los azúcares, pueden originar entrecruzamiento químico mediante la conocida como glicación no enzimática o reacción de Maillard (Mentink et al., 2002).

2. Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue el de desarrollar andamios basados en colágeno con propiedades morfológicas y mecánicas adecuadas para su potencial aplicación en el crecimiento de tejido muscular. Para lograr ese objetivo global, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de hidrogeles y aerogeles con el mismo protocolo de procesado.
- Evaluación comparativa de las propiedades mecánicas y morfológicas de hidrogeles y aerogeles con distintas concentraciones de colágeno.
- Evaluación de la incorporación de la fructosa como agente de entrecruzamiento natural para la modificación de las propiedades mecánicas y morfológicas de los aerogeles de colágeno seleccionados.

3. Metodología

3.1 Materiales

Para este estudio se empleó colágeno de cerdo (Tipo I, con un contenido proteico superior al 95% en peso), proporcionado por Essentia Protein Solutions (Dinamarca). El ácido acético y la fructosa ($\geq 99\%$) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (Alemania).

3.2 Preparación de andamios

Los andamios fueron preparados siguiendo el procedimiento descrito en estudios previos (Perez-Puyana et al., 2019b). Se empleó el mismo procedimiento de síntesis para ambos sistemas (hidrogeles y aerogeles), con la diferencia de que, para obtener los aerogeles, se requirieron dos etapas posteriores tras la formación del hidrogel para eliminar el agua por liofilización. Se llevó a cabo un proceso de gelificación para obtener los hidrogeles, que consiste en la elaboración de disoluciones de colágeno a diferentes concentraciones (5 y 10 mg/ml) utilizando ácido acético 0,05 M como disolvente. Posteriormente, las disoluciones fueron centrifugadas a 12.000 rpm y a 4 °C (J.P Selecta, España). Una vez centrifugadas, la fase líquida fue separada y almacenada en un frigorífico (Equitec, España) a 4 °C durante 1 h. Tras esto, la formación de los hidrogeles quedó completada. Los aerogeles se obtuvieron posteriormente mediante liofilización (< 15 Pa durante 24 h), eliminando el disolvente por sublimación, utilizando un liofilizador (TELSTAR, España).

Para el estudio del entrecruzamiento con fructosa, se seleccionó el aerogel con una concentración de 10 mg/ml de colágeno y se añadió un 10% en peso de fructosa (respecto a la concentración de proteína) a las disoluciones en la primera etapa del procedimiento. El proceso de fabricación seguido fue el mismo que el descrito para los andamios sin agente de

entrecruzamiento. Por último, se estudiaron y compararon las propiedades mecánicas y estructurales de los sistemas preparados.

3.3 Caracterización de andamios

3.3.1 Caracterización de los hidrogeles

Evaluación reológica

En los hidrogeles, las propiedades viscoelásticas fueron evaluadas empleando dos tipos de ensayos reológicos. En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de barrido de deformación (0,1-100% a 1 Hz y 20 °C) para determinar el rango viscoelástico lineal y la deformación crítica. También se realizaron barridos de frecuencia (0,02-20 Hz a 20 °C y a una deformación específica), donde se midieron y compararon los valores de G' , G'' y η^* (módulos elástico y viscoso y viscosidad compleja, respectivamente). Esta caracterización se llevó a cabo en un reómetro oscilatorio AR 2000 (TA Instruments, EEUU) con una geometría de superficie rugosa con un diámetro de 40 mm.

Evaluación morfológica

Los hidrogeles fueron evaluados utilizando un microscopio Crio-SEM (Zeiss EVO, Alemania), con un voltaje de aceleración de 10 kV. Todas las muestras fueron congeladas previamente con nitrógeno a -190 °C y recubiertas con una fina capa de oro/paladio. Se empleó el software *Image-J*, para evaluar el tamaño de poro de los sistemas seleccionados.

3.3.2 Caracterización de los aerogeles

Evaluación reológica

Se llevaron a cabo ensayos de compresión dinámica utilizando un reómetro RSA3 (TA Instruments, EEUU) con una geometría de superficie lisa (15 mm de diámetro) para realizar los ensayos de barrido de deformación ($2,5 \times 10^{-4}$ -2,5% a 1 Hz y 25 °C) y barrido de frecuencia (0,02-20 Hz a 25 °C y una deformación específica). En estos ensayos, se determinaron los valores de E' y E'' (módulos elástico y viscoso) junto con $\tan \delta$ (tangente de pérdidas) y μ^* (viscosidad compleja).

Evaluación morfológica

Los aerogeles fueron analizados morfológicamente utilizando un microscopio SEM (Zeiss EVO, Alemania) con un voltaje de aceleración de 20 kV. Todas las muestras fueron tratadas previamente con vapor de Osmio (1%) en campana durante 8 h para fijar las muestras y facilitar su observación en el microscopio. Posteriormente, se cubrieron las muestras con una película de oro/paladio mediante *sputtering* (Leica, Alemania), para mejorar la calidad de la micrografía (al mejorar la conductividad de la muestra). Las imágenes fueron analizadas (tamaño de poro y su distribución) utilizando el software *Image-J*.

Grado de hinchamiento

Esta propiedad es importante para predecir el comportamiento de un biomaterial en el cuerpo, donde estará en contacto estrecho con fluidos biológicos. Para su evaluación, las estructuras fueron sumergidas en agua destilada a 25 ± 2 °C, pesándolos 24 h después. El grado de hinchamiento fue calculado por la diferencia de peso inicial y final (después de la inmersión en agua).

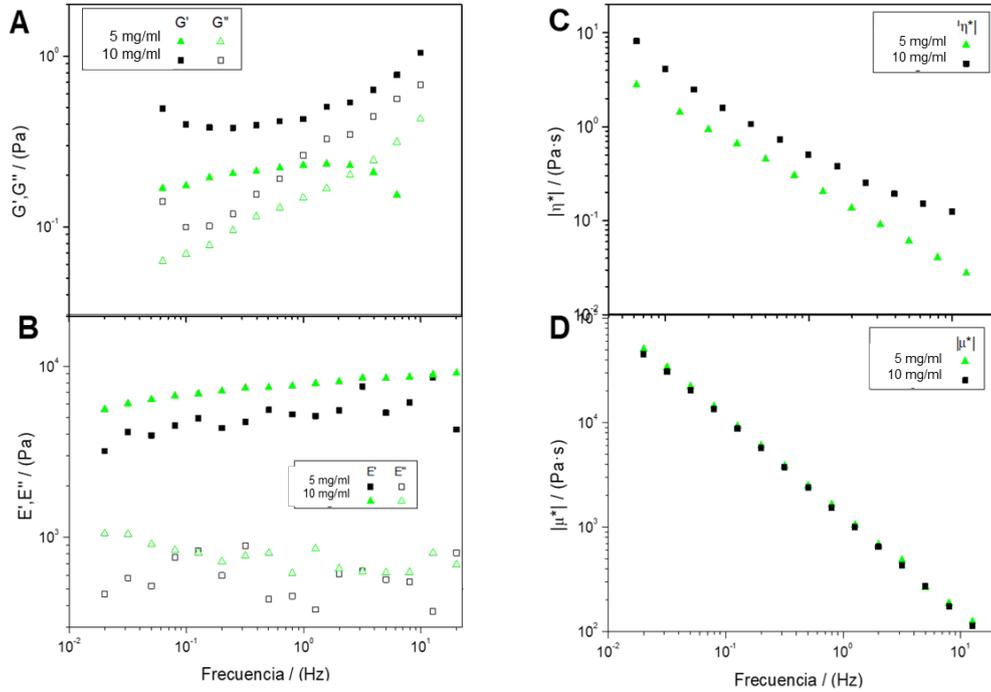
4. Resultados y discusión

4.1 Hidrogeles y aerogeles a diferentes concentraciones de colágeno

La Figura 1 muestra la evolución de los módulos elástico y viscoso (Figuras 1A y 1B, respectivamente) y la viscosidad compleja (Figuras 1C y 1D) con la frecuencia tanto de los

hidrogeles (Figuras 1A y 1C) como de los aerogeles (Figuras 1B y 1D), con diferentes concentraciones de colágeno (5 y 10 mg/ml).

Figura 1: Evolución del módulo elástico y viscoso y la viscosidad compleja de hidrogeles (Figuras A y C) y aerogeles (Figuras B y D) de colágeno (5 y 10 mg/ml).



Ambos sistemas mostraron un comportamiento de gel, donde el módulo elástico estaba por encima del módulo viscoso, sin grandes variaciones con la frecuencia. Estos resultados indicaron que todos los sistemas tenían suficiente estabilidad, permitiendo predecir el comportamiento independientemente del tiempo de aplicación de la deformación. Además, aunque no se observaron diferencias significativas en las tendencias de las curvas con la frecuencia, un aumento de la concentración de colágeno se tradujo en un incremento de los módulos elástico y viscoso correspondientes. En cuanto a la viscosidad compleja (Figuras 1C y 1D), se pudo observar la misma tendencia, donde las concentraciones de 5 y 10 mg/ml casi aparecen superpuestas.

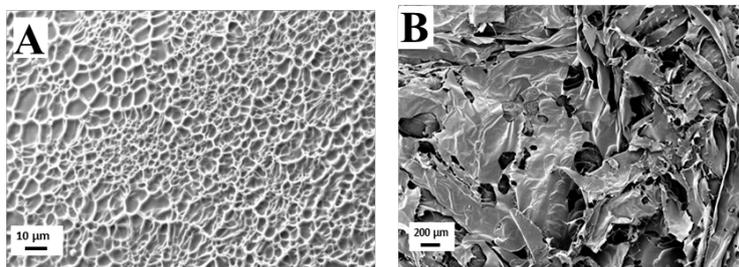
Tabla 1. Deformación crítica de los distintos sistemas estudiados

Sistemas		Deformación crítica (%)
Hidrogeles	5 mg/ml	0,62 ± 0,05
	10 mg/ml	1,01 ± 0,10
Aerogeles	5 mg/ml	0,80 ± 0,18
	10 mg/ml	1,29 ± 0,22

En la Tabla 1 vienen representados los valores de deformación crítica tanto de los hidrogeles como de los aerogeles. De estos resultados, se puede confirmar que, un aumento de la concentración de colágeno no suponía diferencias significativas entre los sistemas de 5 y 10 mg/ml. Además, cabe destacar que los aerogeles eran más rígidos y viscosos que los

hidrogeles con las mismas concentraciones. No obstante, el hidrogel con mayor concentración de colágeno era más deformable que el aerogel con la misma concentración.

Figura 2: Imágenes microscópicas de un (A) hidrogel y un (B) aerogel de colágeno a una concentración de 10 mg/ml



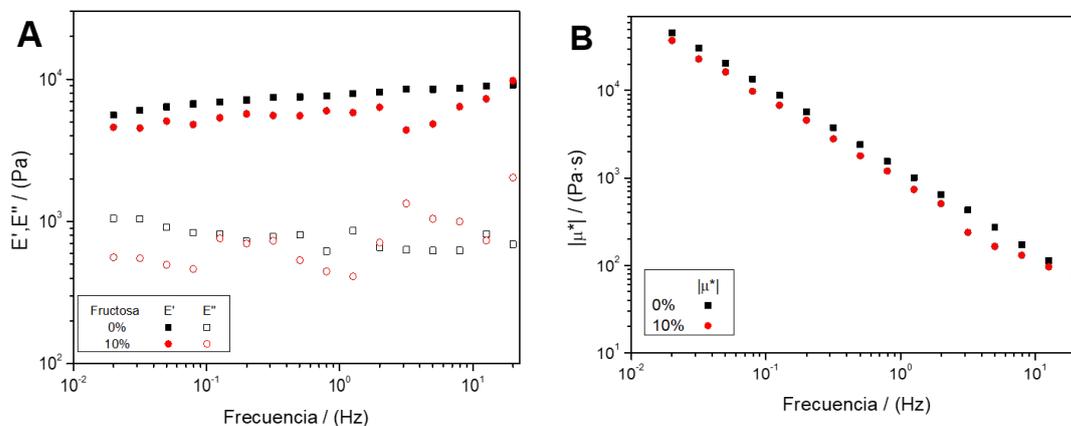
En la Figura 2 se incluyen imágenes que muestran una visión microscópica del hidrogel y aerogel con concentración de 10 mg/ml de colágeno. La microestructura del hidrogel, analizada por Crio-SEM, viene representada en la Figura 2A. Como se puede observar, existe un importante grado de estructuración con una distribución de tamaño de poro mucho más homogénea que la observada en el aerogel con la misma concentración (Figura 2B), ya que el andamio presenta una mayor porosidad con una gran cantidad de poros de gran tamaño, dado que su fase dispersa es un gas, mientras que la del hidrogel es líquida. Esto explicaría la diferencia entre las estructuras de ambos sistemas. Sin embargo, la característica más distintiva del aerogel es la heterogeneidad en el tamaño de los poros, ya que están comprendidos en un rango entre 130-300 μm , encontrándose en el esperado para aerogeles de colágeno (120-200 μm). Además, cabe mencionar que el alto grado de interconectividad entre los poros, junto con su tamaño de poro propicio, favorecerían la implantación celular y el crecimiento de estas, así como la consiguiente regeneración del tejido. Por otra parte, existe una gran uniformidad en el tamaño de poro de los hidrogeles (Figura 2A), aunque hay que destacar que los poros con mayor tamaño se encuentran aparentemente en las regiones externas del hidrogel, mientras que los de menor tamaño se localizan en las zonas más internas. Los poros observados en la imagen tienen un tamaño aproximado de 1-11 μm , que está por debajo del rango favorable para la proliferación celular (20-125 μm) (Yannas, 2013). Para tamaños de poro inferiores a este rango, como en este caso, las células quedan excluidas del interior de la matriz, lo que supondría un problema para su potencial aplicación en ingeniería tisular.

4.1.2 Influencia de la adición de fructosa

Tras realizar la comparación de las propiedades mecánicas y morfológicas de ambos sistemas, los aerogeles fueron los seleccionados para el estudio de entrecruzamiento con fructosa, debido a su mayor rigidez y viscosidad, así como su mejor rango de tamaño de poro para la proliferación celular de tejido muscular. Se escogió la mayor concentración para esta evaluación. Se ha elegido la fructosa como agente de entrecruzamiento químico en base al hecho de que cualquier azúcar reductor puede inducir una reacción de Maillard en proteínas (Gaar et al., 2020). La fructosa, específicamente, reaccionaría con los residuos de lisina del

colágeno, provocando una modificación de la microestructura y, por lo tanto, en las propiedades de los aerogeles.

Figura 3: Evolución del módulo elástico y viscoso y la viscosidad compleja de aerogeles de colágeno (10 mg/ml) con diferentes concentraciones de fructosa (0 y 10 mg/ml).



La Figura 3 muestra los resultados de los ensayos de frecuencia de los aerogeles de 10 mg/ml de colágeno a los que se han adicionado fructosa (10% en peso), tal y como se describió anteriormente. Se ha incluido también el aerogel de colágeno sin fructosa a modo de referencia. Los resultados muestran un comportamiento predominantemente elástico con una leve influencia de la frecuencia (Figura 3A). Para el sistema con fructosa, el módulo elástico resultó ser menor que el aerogel sin agente de entrecruzamiento. Esto podría deberse a que añadir bajas concentraciones de agente de entrecruzamiento a los sistemas provoca el comienzo de la reacción de entrecruzamiento, pero no el fortalecimiento de la estructura. En la Figura 3B se representaron los resultados de la variación de la viscosidad compleja para cada sistema con la frecuencia. Como se puede observar, la adición de fructosa genera un aerogel menos viscoso, aunque sin diferencias significativas respecto al andamio sin agente de entrecruzamiento.

Tabla 2. Deformación crítica y grado de hinchamiento de los distintos aerogeles estudiados

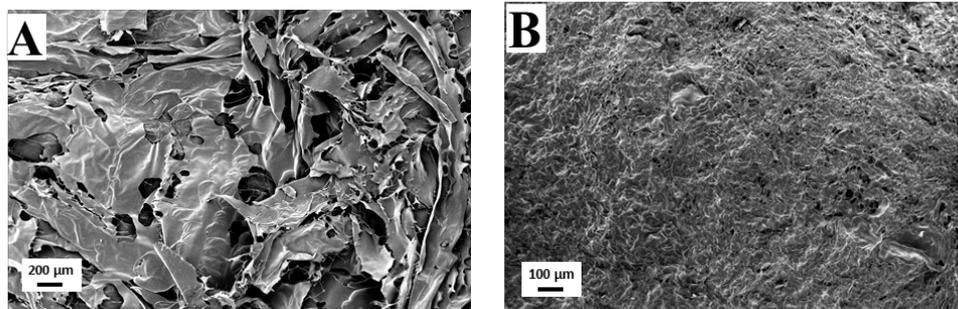
Sistema	Concentración de fructosa	Deformación crítica (%)	Grado de Hinchamiento (%)
Aerogel colágeno	0 %	1,29 ± 0,22	113 ± 11
10 mg/ml	10 %	2,00 ± 0,34	70 ± 17

En la Tabla 2 vienen recogidos los valores de deformación crítica de los aerogeles con y sin fructosa. A partir de estos resultados, se puede señalar que, para bajas concentraciones de fructosa añadida, se observó un ligero aumento de la deformación crítica. Además, la Tabla 2 también muestra los valores de grado de hinchamiento de los aerogeles con fructosa añadida, comparados con el sistema referencia. Se observó un descenso para aquellos sistemas que contenían fructosa, probablemente debido a la mayor estructuración del sistema, y por ende menor capacidad de absorción de agua en la estructura.

La Figura 4 incluye imágenes microscópicas de los aerogeles con diferentes concentraciones de fructosa (0 y 10 % en peso). La adición de fructosa modificó la microestructura de los andamios, como se desprende de la comparación de las imágenes SEM obtenidas. El andamio sin agente de entrecruzamiento presenta una microestructura similar a hojas, con gran heterogeneidad en el tamaño de poro y su distribución (Figura 4A), mientras que la

presencia de fructosa derivó a una microestructura más homogénea y estructurada (Figura 4B). La adición de un 10% de fructosa generó una estructura porosa con poros de tamaños entre 6-55 μm . En general, las imágenes de SEM revelaron que la microestructura del colágeno cambiaba notablemente con la adición de fructosa debido a la posible agregación que sucedería por la reacción de Maillard entre el colágeno y la fructosa.

Figura 4: Imágenes microscópicas de aerogeles de colágeno (10 mg/ml) con diferentes concentraciones de fructosa: (A) 0 y (B) 10 mg/ml.



5. Conclusiones

Este estudio ha permitido avanzar en el desarrollo de biomateriales con aplicación en Ingeniería de Tejidos, conectando con el objetivo principal del proyecto global que se está llevando a cabo. De esta forma, el estudio de estos andamios ha permitido desarrollar un mayor conocimiento de las propiedades mecánicas y morfológicas de estos materiales, consensuando un avance hacia un sistema idóneo para su estudio *in vitro* e *in vivo*. Todo esto siendo de gran interés para el proyecto global, cuyo objetivo principal es la regeneración de tejidos musculares a través de la Ingeniería de Tejidos. Además, dicho objetivo coincide con uno de los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030: Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades.

En concreto, se desarrollaron hidrogeles y aerogeles de colágeno con propiedades mecánicas adecuadas para su potencial aplicación en ingeniería de tejidos. A partir de la morfología de ambos sistemas, se pueden extraer diferentes conclusiones:

La comparativa entre hidrogeles y aerogeles refleja que los aerogeles eran más rígidos que los hidrogeles, mientras que con la deformabilidad sucedía lo contrario. Además, el estudio morfológico probó que ambos sistemas tenían una alta porosidad, aunque los hidrogeles tenían mayor homogeneidad en el tamaño de poro que los aerogeles. No obstante, el tamaño de poro de los hidrogeles (1-11 μm) no resultó ser adecuado de acuerdo con el rango crítico para la proliferación de células de tejido muscular (20-125 μm), al contrario que el de los aerogeles (130-300 μm).

Por otra parte, la evaluación de diferentes concentraciones de colágeno ha permitido verificar que una mayor concentración genera mejores propiedades mecánicas, reflejándose en el aumento de la deformación crítica y el módulo elástico de los andamios, independientemente de que sean hidrogeles o aerogeles.

En cuanto a la adición de fructosa a los andamios liofilizados (aerogeles) con una mayor concentración de colágeno (10 mg/ml), esta mejoró la deformabilidad de los sistemas, pero disminuyó su grado de hinchamiento, por lo que es necesario llegar a un punto de equilibrio entre ambas propiedades para optimizar el rendimiento del andamio en la generación de tejidos.

En definitiva, se puede concluir que los aerogeles son más apropiados para aplicaciones en ingeniería tisular, mientras que los hidrogeles presentaron limitaciones relacionadas con problemas asociados al tamaño de poro. Así, como posibles estudios futuros se plantea

necesario modificar la composición o las condiciones de procesado de los sistemas para vencer esta limitación. Además, de realizar un estudio biológico de los sistemas más idóneos para continuar con el siguiente paso del proyecto que se está llevando a cabo.

Referencias

- Arias, D. G., Agudelo, A. G., & López, E. C. (2018). Evaluación del crecimiento de fibroblastos humanos en andamios de fibroma de Bombyx mori L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20, 47-56.
- 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, 511–528.
- Gaar, J., Naffa, R., & Brimble, M. (2020). Enzymatic and non-enzymatic crosslinks found in collagen and elastin and their chemical synthesis. *Organic Chemistry Frontiers*, 7, 2789–2814.
- Hoffman, A.S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18-23.
- Ibrahim, M., Alaam, M., El-Haes, H., Jalbout, A.F., & De Leon, A. (2006). Analysis of the structure and vibrational spectra of glucose and fructose. *Eclética Química Journal*, 31, 15–21.
- Mentink, C.J., Hendriks, M., Levels, A.A., & Wolffenbuttel, B.H. (2002). Glucose-mediated cross-linking of collagen in rat tendon and skin. *Clinica Chimica Acta*, 321, 69-76.
- Nair, L.S., & Laurencin, C.T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32, 762–798.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019a). Crosslinking of hybrid scaffolds produced from collagen and chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 262–269.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2019b). Highly porous protein-based 3D scaffolds with different collagen concentrates for potential application in tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, 136, 47954.
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A., & Guerrero, A. (2020). Polymer-based scaffolds for soft-tissue engineering. *Polymers*, 12, 1566.
- Reddi, A. (2000). Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue Engineering*, 6, 351-359.
- Sachlos, E., & Czemuszka, J. (2003). Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials*, 5, 29–40.
- Van Vlierberghe, S., Dubrue, P., & Schacht, E. (2011). Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, 12, 1387–1408.

Yannas, I.V. (2013). Emerging rules for inducing organ regeneration. *Biomaterials*, 34, 321–330.

Objetivos de Desarrollo Sostenible

