

Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Física

ESTRUCTURAS CELULARES BIOBASADAS A PARTIR DE PROTEÍNAS FIBRILARES DE COLÁGENO

Autora: Sara López Valle

Tutoras: Dra. Karina Carla Núñez Carrero y Dra. Judith Martín de León

2024







Índice

| 1 | Introdu | cción: motivación, planteamiento de los retos científicos y metodología |
|--------|-------------------|--|
| di | señada | |
| 2 | ESTADO | 0el arte |
| | 2.1 Coldg | Plastificación |
| | 2.1.1 | Entrocruzzmiento 10 |
| | 2.1.2 2.2 Moto | unie colular basado en colágono (ocnumo) |
| 2 | | |
| 3 4 | Objetiv | 05 14 miento experimental 15 |
| - | 4.1 Mate | eriales |
| | 4.2 Obte | nción de los precursores (filmes de colágeno)15 |
| | 4.2.1 | Influencia del plastificante (Glicerina) en el precursor (DoE 1, 8 experimentos)15 |
| | 4.2.2 | Influencia del entrecruzante (Glutaraldehído) en el precursor (DoE 2, 16 experimentos)16 |
| | 4.2.3 | Influencia del cambio de pH en la disolución usada para obtener el precursor17 |
| | 4.3 Cara | cterización de los precursores (filmes de colágeno)18 |
| | 4.3.1 | Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)18 |
| | 4.3.2 | Análisis termogravimétrico (TGA)18 |
| | 4.3.3 | Análisis por Infrarrojo transformada de Fourier (FTIR)18 |
| | 4.3.4 | Solubilidad en agua como medida del grado de reticulación19 |
| | 4.3.5 | Propiedades mecánicas19 |
| | 4.4 Obte | nción de la estructura celular de colágeno19 |
| | 4.4.1 | Solubilidad en CO2 en colágeno saturado20 |
| | 4.5 Cara | cterización de las estructuras celulares de colágeno20 |
| | 4.5.1 | Microscopia electrónica de barrido (SEM)20 |
| | 4.5.2 | Densidad20 |
| | 4.5.3 | Propiedades mecánicas20 |
| 5 | Resulta | dos y discusión 21 |
| | 5.1 Estuc | dio de los precursores21 |
| | 5.1.1 | Influencia del plastificante en el precursor (DoE 1)21 |
| | 5.1.2 | Influencia del entrecruzante en el precursor (DoE 2)25 |
| | 5.1.3 | Influencia del cambio de pH en el precursor32 |
| | 5.2 Estuc | dio de la estructura celular35 |
| | 5.2.1 | Influencia del proceso de espumado35 |
| | 5.2.2 | Influencia del tipo de precursor |
| 6 | Conclus | siones |
| _ | Trabajo | os futuros |
| 7 2 | Glosario | 0 |
| 9 | Anexo. | 42 |







Resumen

El objetivo de este trabajo es obtener estructuras celulares de colágeno como alternativa a los embalajes alimentarios de origen sintético. Para ello, se estudió con el Diseño de Experimento (DoE), las variables experimentales (plastificante, entrecruzante, tiempo, temperatura y pH de la disolución) que afectan a las propiedades mecánicas de los filmes precursores (necesarios para el proceso de espumado). A través de técnicas de caracterización microestructural, se determinaron las relaciones entre las estructuras y las propiedades mecánicas finales de los filmes obtenidos. Se encontró que el porcentaje de plastificante (glicerina) es el factor determinante para las propiedades finales.

Finalmente, fueron elegidos ocho tipos de precursores diferenciales para estudiar la relación de sus propiedades mecánicas con el proceso de espumado y con las propiedades mecánicas finales del material celular resultante. Se empleó el proceso de espumado de disolución de gas con sCO₂. Los resultados demostraron que, independientemente del tipo de filme estudiado, el colágeno es sensible al proceso de saturación en sCO₂, ya que no permite medir su saturación en él y además experimenta una pérdida de peso molecular que imposibilita llevar a cabo la fase de expansión en agua, por el aumento de la hidrosolubilidad. Al cambiar el medio de expansión (horno), los materiales celulares, aunque mostraron estructuras heterogéneas con tamaños de celdas entre 2 y 120 µm, alcanzaron una pérdida de densidad cercana al 80 % sin apenas perder dureza con respecto al sólido. Todos estos fenómenos abren una importante ventana para seguir avanzando en el conocimiento de estas estructuras.

Palabras clave: colágeno, filme, plastificante, entrecruzante, estructura celular, densidad relativa.

Abstract

The aim of this study is to develop collagen cellular structures as an alternative to synthetic food packaging materials. To achieve this, we utilised Design of Experiment (DoE) methodologies to examine the experimental variables (plasticiser, cross-linker, time, temperature, and pH solution) that influence the mechanical properties of precursor films, which are crucial for the foaming process. Microstructural characterisation techniques were employed to elucidate the relationships between the microstructures and the final properties of the obtained films. It was found that the plasticiser content (glycerine) is the most significant factor in determining these properties.

Finally, eight distinct types of precursor films were selected to study the relationship between their mechanical properties and the foaming process, as well as the final mechanical properties of the obtained cellular material. The foaming was conducted using the gas dissolution process in supercritical CO_2 (s CO_2). The results demonstrated that, regardless of the type of film studied, collagen exhibits sensitivity to the s CO_2 saturation process. This sensitivity precludes accurate measurement of CO_2 saturation and results in a molecular weight loss that prevents effective expansion in water due to increased solubility. When the expansion medium was changed to an oven, the resulting foams exhibited heterogeneous structures with cell sizes ranging from 2 to 120 μ m. Despite this heterogeneity, the foams achieved a density reduction of approximately 80 % while maintaining nearly the same hardness as the solid precursor. These findings provide a significant opportunity for further research and development in understanding and utilising these structures.

Keywords: collagen, film, plasticizer, crosslinker, cellular structure, relative density.







1 Introducción: motivación, planteamiento de los retos científicos y metodología diseñada

Esta investigación nace con el objetivo de hacer una contribución científico-tecnológica en el contexto de los retos que plantea la economía circular. Particularmente, en el tópico relacionado con la sustitución de materias primas fósiles por materias primas biobasadas.

En el marco de muchas normativas (ejemplo: EN 13432) y textos científicos [1], [2], [3] se considera que **los materiales biobasados liderarán la transición sostenible hacia una economía circular**. Pero se entiende que, para ello, en primer lugar, hay que conocer el origen y la disponibilidad de las materias primas biobasadas. Asimismo, **comprender la naturaleza** de éstas para poder explotar correctamente su valor y darles un uso eficiente, dentro de las especificaciones que se puntualizan en los modelos de economía circular actualmente establecidos.

En este contexto, parece claro que el **principal problema contra el que se lucha actualmente es la contaminación por plástico.** Esto es debido al consumo masivo de estos materiales y a la corta vida útil en muchas de sus aplicaciones (envases de un solo uso, etc.). Se ha documentado la presencia de residuos de plásticos en playas, en dunas, en la atmósfera y en puntos tan remotos del mundo como son el Everest y el fondo de los océanos [4].

Sin embargo, no hay que apelar a zonas tan recónditas como el fondo del océano para ver la magnitud del problema. Es suficiente con recordar el desastre ocurrido a finales del año 2023 en las Costas Gallegas de España, donde se produjo un vertido accidental de granza polimérica (materia prima utilizada en la mayoría de los sectores de transformación de productos plásticos) [5]. Además, el aumento descontrolado de la producción de estos materiales en los últimos años (desde 1,5 millones de toneladas métricas en 1950 hasta 359 millones de toneladas métricas en 2018, [6]) agrava aún más la situación en todos los ecosistemas.

Como consecuencia de este **vertiginoso aumento de producción y, su consecuente generación de residuos, los seres vivos que habitan en estos entornos se ven seriamente afectados.** Burger y colaboradores realizaron un estudio en el norte del Pacífico encontrando que de cada 11 aves marinas 8 tienen plásticos en su estómago [7]. Otro estudio desvela que la contaminación afecta al menos a 267 especies de animales globalmente, lo que implica al 86 % de todas las especies de tortuga, el 44 % de las especies de aves marinas y el 43 % de todas las especies de mamíferos marinos. Aun así, debido a que el océano es inabarcable, no se puede saber con certeza cuál es la envergadura del impacto sobre la vida marina. En cuanto a los seres humanos, Buitrago y colaborares reportan que una persona media ingiere 50.000 micro plásticos al año en alimentos y bebidas [4].

Por otro lado, es importante poner el foco de atención en las principales fuentes de contaminación por plástico. Las evidencias son claras: **más del 60 % de los residuos plásticos que están presentes en nuestro ecosistema provienen del envase alimentario y/o del embalaje** [8]. Con la agravante de que debido a las medidas de protección contra el COVID-19, durante la pandemia hubo un incremento de compras online de un 40 % en España [9]. Además, se promovió el uso de embalajes de un solo uso para evitar contagios [9], [10]. Situación que no ha sido reversible tras controlar la pandemia y que contribuye incluso más al problema.



Como ya se ha comentado, algunas soluciones para este desolador panorama se han puesto en marcha desde la Unión Europea en forma de directivas como, por ejemplo, la Directiva de la UE 2019/904. Esta directiva afronta, entre otras cosas, el problema de los plásticos de un solo uso, con propuestas enfocadas a **prohibir**, **reducir**, **reusar o reciclar plásticos fósiles**, **el ecodiseño de los productos fabricados plásticos**, **y/o la producción y uso masivo de bioplásticos** [11].

Bajo este marco, la idea de la presente investigación se gesta en el último punto: **sustituir las materias primas fósiles por materias primas biobasadas** que disminuyan el impacto ambiental, además de que mantengan las prestaciones actuales en productos usados para el packaging y el embalaje. El **cambio no es evidente y pasa por entender las complejas estructuras de las materias primas naturales**. En este sentido, esta investigación se centra en una familia de complejas bioestructuras de proteínas animales, como es **el colágeno**. Este material tiene el potencial de desempeñar un papel crucial en la transición hacia la sostenibilidad. Aunque su compleja bioestructura (distribución fibrilar de alto peso molecular, compuesta por más de 20 aminoácidos diferentes, etc.) es la responsable de sus notables propiedades estructurales, también plantea desafíos en su caracterización precisa y, por ende, en la **atribución adecuada de la relación entre estructura y propiedades**. Sin embargo, abordar esta complejidad es fundamental para utilizarlo como herramienta valiosa e indispensable en el diseño de nuevos materiales derivados de él.

Asumir el reto de estudiar la microestructura y la capacidad de moldeo del colágeno queda perfectamente justificado cuando se sopesa su reducida huella de carbono, su menor consumo energético durante su extracción, la emisión reducida de gases de efecto invernadero y su abundancia. Además de estar exento de toxinas, lo que es ideal para el sector del embalaje alimentario [12]. No obstante, además de los retos tecnológicos mencionados, existen otros desafíos a mayor escala, como su coste superior (en comparación con los plásticos convencionales), la inexistencia de líneas de reciclaje para estos materiales (necesitan tratamientos de compostaje especiales no establecidos), el uso de materias primas proteicas que compiten con la industria de la alimentación, la falta de información entre los consumidores y la falta de legislación al respecto [12].

Como consecuencia de todos estos inconvenientes, queda mucho camino por recorrer para que sean unos sustitutos reales de los plásticos fósiles. Por ello, la comunidad científica tiene un importante interés y continúa estudiándolos como potentes materias primas para la fabricación de bioplásticos, de acuerdo con los **objetivos de la Agenda 2030**.

La presente investigación se centra en estudiar la obtención de filmes (precursores) y estructuras celulares (espumas) basadas en colágeno que reemplacen los embalajes de un solo uso, tanto en el sector de la alimentación como en el transporte de mercancías.

Estudiar tanto filmes como materiales celulares basados en colágeno, se deriva principalmente de que ambos formatos son interesantes en los sectores mencionados. Por su parte, los filmes de colágeno funcionan como envoltorios de alimentos que pueden ser incluso comestibles, además de ser los precursores (formato intermedio) para la fabricación de estos materiales celulares (espumas).



En cuanto a estas últimas, las estructuras celulares pueden ofrecer una contribución significativa a la mejora del impacto ambiental en comparación con los biopolímeros densos (filmes, en este caso) debido a su estructura porosa y ligereza (menor densidad). Estas características permiten una reducción en el uso de materia prima, lo que disminuye la cantidad de recursos naturales consumidos. Además, al pesar menos, los materiales celulares de colágeno pueden reducir los costes de transporte y almacenamiento, lo que a su vez disminuye las emisiones de gases de efecto invernadero asociadas con estas actividades. Finalmente es importante mencionar sus inherentes propiedades asociadas con el aislamiento acústico, térmico y con la absorción de impacto (características esenciales en los materiales usados en embalaje).

En la Figura 1, se pueden observar el número de publicaciones científicas que mencionan la palabra colágeno, biomateriales, espuma polimérica o de colágeno en los últimos 20 años. Se demuestra el interés que existe en estos campos: un promedio de 6000 artículos/año en cada temática, salvo en el campo de espumas de colágeno que es muy incipiente y que están relacionadas, principalmente con aplicaciones médicas (para la regeneración ósea [13], [14], para el tratamiento de la enfermedad de la córnea [15], cicatrización de heridas [15] o para la suministración de fármacos [16]).



Figura 1. Representación del número de publicaciones en los últimos 20 años que contienen las palabras colágeno, biomateriales, espuma polimérica o de colágeno en función de los años. Datos obtenidos de Google Scholar.

El salto en el estado del arte de esta investigación radica en dar el paso de las bioespumas de colágeno usadas en aplicaciones médicas a las aplicaciones de embalajes alimentarios, donde sobre todo los requerimientos mecánicos son más exigentes. Para conseguir el espumado de estas bioestructuras, se usará la técnica de espumado por disolución de gas.



La metodología de trabajo consiste principalmente, en dos partes esquematizadas en la Figura 2. Por una parte, **conseguir un precursor denso** (filmes) para fabricación posterior de la estructura celular con óptimas propiedades mecánicas (ejemplo: alta rigidez sin perder tenacidad). Para ello, se estudian dos fenómenos claves en el procesado del colágeno: **la plastificación y el entrecruzamiento**. Como se explicará con detalle en el estado del arte, este estudio plantea un gran reto científico-tecnológico: lograr la desnaturalización de la proteína sin inducir a su degradación.

El colágeno es una bioestructura de triple hélice, de estructura cuaternaria [17], [18], lo que implica que posee una conformación restringida, que no permite que las cadenas del colágeno tengan movilidad. Por ello, trabajar con su forma nativa se dificulta. Para solucionar este problema, se recurre al concepto de plastificación. El siguiente reto es mejorar las propiedades mecánicas de las estructuras plastificadas. Para ello, se plantea entrecruzar los filmes plastificados inmovilizando la estructura final por la vía química (agente entrecruzante o cambio de pH [19], [20]).



Figura 2. Representación esquemática de la metodología seguida en la investigación.

Por otra parte, las estructuras biobasadas exhiben una estrecha ventana de procesamiento en términos de tiempo, temperatura y resistencia química, dentro de los cuales, se mantiene su estabilidad sin inducir degradación durante los ensayos. Debido a esta particularidad, la experimentación es meticulosa, requiriendo el empleo de herramientas como el diseño de experimentos de tipo factoriales completos (DoEs-FFC). El fin es identificar las variables más influyentes en los cambios de microestructura y, por ende, en las propiedades físicas finales de los precursores bajo estudio.



Para finalizar, una vez elegidos los mejores precursores y establecida la relación procedimiento experimental-microestructura-propiedades físicas finales para fabricarlos a medida, se pasará a la etapa de **espumado por disolución de gas**. Hasta la fecha no se ha encontrado en la literatura el uso de esta técnica para espumar filmes de colágeno. Algunos trabajos reportan su uso exitoso en bioplásticos como PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico) [21] y PHB (polihidroxibutirato) [22]. Las ventajas que presenta el espumado por disolvente, no dejan residuo tóxico dentro del material [21], no hay que usar ningún material adicional (al contrario que la lixiviación con sal) y produce una gran cantidad de poros que están interconectados entre sí [23], lo que es crucial para el desempeño mecánico final del material celular.

En esta segunda etapa de la investigación, el reto es estudiar cuáles son las mejores condiciones de espumado para los filmes de colágeno obtenidos y establecer la relación entre la microestructura inicial de los filmes y la microestructura final del material celular. Así, se obtiene el conocimiento necesario para diseñar estos materiales a medida. Finalmente, se establecerá la influencia que tiene la exposición de las fibras de colágeno plastificadas al sCO₂ usado en los procesos de espumado.

Una vez constituido el contexto global de la investigación, se presenta en el siguiente apartado, el estado del arte, una descripción de los conceptos relevantes. Esto se realiza con el fin de facilitar la comprensión tanto de la metodología empleada como de los resultados obtenidos.

2 Estado del arte

2.1 Colágeno

Las proteínas son biomoléculas formadas básicamente, por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Pueden considerarse macromoléculas de aminoácidos que están unidos mediante enlaces peptídicos. Estas cadenas se pliegan adquiriendo una estructura tridimensional, que les permite llevar a cabo sus funciones biológicas. Las proteínas están codificadas en el material genético de cada organismo, donde se especifica su secuencia de aminoácidos. Éstos desempeñan un papel fundamental en los seres vivos y son las biomoléculas más versátiles y diversas. Realizan una enorme cantidad de funciones diferentes, entre ellas funciones estructurales, enzimáticas, transportadora, de reserva, etc.

Durante muchos años se ha reconocido la utilidad de las proteínas, no sólo dentro de los propios organismos vivos, sino también se han utilizado proteínas animales, vegetales o de origen microbiano (principalmente de tipo enzimáticas) en distintas aplicaciones industriales, como la alimentación, textil, cosmética, entre otras.

Desde el siglo XIX, también se ha reconocido el valor de las cadenas proteicas no reactivas como materias primas de distintos procesos industriales. Para entonces, las proteínas de origen vegetal, animal o microbianas ya habían desempeñado un papel importante en la industria química. Por ejemplo, como lubricantes, aglutinantes de tintes y como materiales de partida en el campo de la química de polímeros.



En este sentido, en 1840 ya se había sintetizado la Galatita (bio-polímero obtenido a partir de la proteína de la leche: caseína), que tuvo una importante repercusión en la fabricación de botones, joyas, artículos eléctricos como carcasas de radio entre muchos otros, con un uso intensivo, principalmente en Alemania y Francia. Pero fue la aparición de las petroquímicas, lo que hizo que estas materias primas perdieran importancia y fueran reemplazadas por el desarrollo de nuevos materiales plásticos de origen fósil [24]. Con los años y en pleno siglo XXI, **el surgimiento de inquietudes como la sostenibilidad medioambiental, ha hecho que se retomen las investigaciones en estas materias primas renovables** en aplicaciones de mayor valor tecnológico, sobre todo en lo que en bioplásticos se refiere.

Las propiedades físicas y químicas de las proteínas (solubilidad, emulsión y comportamiento de flujo, así como la capacidad de formar películas proteico-lipídicas, etc.) varían considerablemente según su composición de aminoácidos. Dado que las proteínas están formadas por aminoácidos con cadenas laterales, tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, pueden en relación con su hidrofobicidad o hidrofilia, actuar como tensioactivos, solubilizadores y potenciadores de la dispersión. Las modificaciones y sustituciones de estos aminoácidos consiguen cambiar las propiedades de las proteínas y abrir un abanico de posibilidades para su explotación industrial.

Esa variedad de funcionalidades que ofrecen las diferentes composiciones (los 20 tipos de aminoácidos proteicos, dispuestos en distintas secuencias y conformaciones), hacen que las proteínas animales, vegetales y microbianas tengan un papel importante en muchas aplicaciones industriales, además del interés por su procedencia natural y por su coste. En décadas pasadas, estas estructuras tan complejas han sido muy difíciles de descifrar y establecer la relación estructura-propiedades. Sin embargo, el conocimiento generado hasta ahora permite validar distintos modelos que explican la estructura y morfología de las proteínas y, con ello, diseñar procesos de modificación basados en los requerimientos de diversos sectores industriales como el cosmético, alimentario, biomédico, etc.

En la Figura 3 se representa un modelo que describe, a día de hoy, los niveles estructurales de una proteína: la estructura primaria muestra la cadena peptídica unitaria formada por los aminoácidos, en la estructura secundaria se describe el patrón local de plegamiento de algunas de éstas secuencias de la proteína, en la estructura terciaria se puede observar la conformación plegada de la cadena peptídica de forma tridimensional y, por último, en la estructura cuaternaria, se puede observar la interacción entre las cadenas peptídicas de una misma proteína [25]. Es importante resaltar que las proteínas adquieren su estructura instantáneamente, no pasan por cada una de las estructuras descritas y pueden estar presente varios tipos de conformación. Lo más importante es reconocer que **esta disposición "nativa" condiciona las propiedades de las proteínas** y si se alteran estas conformaciones con estímulos externos: cambios en sus propiedades [26]. **Por lo que es de vital importancia poder caracterizar correctamente la evolución de estas conformaciones y asociar éstas a su comportamiento, con el objetivo de modificar proteínas "a la carta".**





Figura 3. Estructura y modelos conformacionales de las proteínas.

El avance en técnicas de caracterización microestructurales como, por ejemplo, de tipo espectroscópicas y termo-mecánicas, han podido hacer una buena aproximación del modelo conformacional y estructural de cada tipo de proteína conocida. Hoy en día, estos estudios han permitido hacer **dos grandes clasificaciones según su forma y solubilidad** (esta clasificación tiene en cuenta que se tratan solo de cadenas peptídicas):

a) Fibrilares (insolubles): presentan cadenas polipeptídicas largas de forma filamentosa o alargada y una estructura secundaria atípica. Confieren fuerza y elasticidad a la molécula. Son insolubles en agua y en disoluciones acuosas. Algunos ejemplos de éstas son colágenos, queratinas, elastinas, etc.

b) Globulares (solubles): se caracterizan por doblar sus cadenas en una forma esférica compacta dejando grupos hidrófobos hacia dentro de la proteína y grupos hidrófilos hacia fuera, lo que hace que sean solubles en disolventes polares como el agua, por ejemplo: las Prolaminas, Gluteninas, Albúminas, etc. [27].



Figura 4. Clasificación de las estructuras de las proteínas según su forma.

Una representación gráfica de estos dos tipos de estructuras se muestra en la Figura 4. En esta representación se puede observar que las proteínas globulares tienen un plegamiento jerárquico sucesivo que las lleva a formar una proteína en forma esferoidal. Son las proteínas mejor caracterizadas y más estudiadas en los últimos años en aplicaciones industriales como, por ejemplo: en la fabricación de bioplásticos solubles basados en caseína o suero de la leche, suplementos alimenticios para deportistas, elaboración de alimentos para animales, fármacos, aditivos alimentarios, etc.



Por su parte, las proteínas fibrosas son estructuras alargadas, muy resistentes e insolubles, de ahí que su principal función biológica sea estructural (soportar cargas). Adicionalmente, su característica principal es su elevado peso molecular (PM), lo que las hace interesantes para aplicaciones industriales de mayor valor añadido, por ejemplo: en el sector de la fabricación de nuevos materiales sostenibles para packaging, estructuras biomédicas altamente jerárquicas y/o estructurales, etc.

Dentro de este grupo de proteínas fibrilares se encuentra el **COLÁGENO**. Esta proteína es una de las más interesantes y estudiadas dentro de este grupo. La presente investigación pretende generar mayor conocimiento sobre su relación microestructura-propiedades y mejorar así sus posibilidades de uso como materia prima sostenible para la obtención de filmes y estructuras celulares.

El colágeno es la proteína más importante producida por los seres vivos. La forman el aminoácido glicina (33 %), la prolina e hidroxiprolina (22 %) (estructura primaria) en una triple hélice formada por tres cadenas. Cada cadena está compuesta por 1014 aminoácidos aproximadamente. Las cadenas interaccionan entre sí en una triple hélice para formar una estructura rígida y muy estable debido a los enlaces de hidrógeno intramoleculares entre la glicina de las cadenas adyacentes. Esta súper hélice representa la estructura básica del colágeno (una estructura cuaternaria [26]).

Se debe tener en mente que **el colágeno, como materia prima, presenta una gran incertidumbre en cuanto a su composición y estructura de partida**. Esto es porque estas propiedades no se deben a su origen, ya que cada especie de donde se extrae el colágeno tiene una expresión genética única. Es decir, no todo el colágeno que se extrae de la piel bobina, por ejemplo, es igual. La condición genética del animal, la edad, la alimentación, etc., aportará una estructura y una composición diferente.

El colágeno, además de ser una proteína no reactiva y estructuralmente fibrilar e insoluble y de composición según los factores mencionados, tiene un problema añadido. Su estructura y su alto peso molecular (en la mayoría de los tipos conocidos) dificultan la caracterización cuantitativamente según la medida de la longitud de las cadenas de la triple hélice en su estado nativo. Esta información es realmente útil para establecer la relación estructura-propiedades y seguir avanzando en el conocimiento. En la Figura 5 se describe de manera visual la complicación.



Figura 5. Estructuras del colágeno.



Las fibras de colágeno en su estado nativo se forman por la unión de distintas fibrillas que están compuestas, a su vez, por triples hélices y éstas, a su vez, están formadas por tres cadenas peptídicas. Esta composición compleja se muestra gráficamente en la Figura 5. Adicionalmente se representa la necesidad de "desgranar" la estructura para poder encontrar la unidad básica. Ésta es de suma importancia porque emula la estructura de un polímero fósil y con ello su desempeño, ya que las "cadenas sueltan" tienen capacidad de moldeo.

Separar las hélices y las cadenas peptídicas significa vencer las interacciones entre cadenas (pasar de la estructura cuaternaria a la primaria, por ejemplo). Este fenómeno se conoce como **desnaturalización de la proteína**. Es muy importante entender que la desnaturalización no afecta a los enlaces peptídicos, solo a las conformaciones estructurales. Es un estado que podría definirse como una cadena aislada, "totalmente libre de interacción con otras cadenas".

Los cambios que provocan la desnaturalización pueden ser variaciones bruscas de temperatura, pH, fuerza iónica, presión osmótica o presión hidrostática o la adición de solventes orgánicos (por ejemplo: acetona, hexanos, tolueno). Los agentes desnaturalizantes desestabilizan a las proteínas y provocan que pierdan su plegamiento, o lo que es lo mismo, vuelven al estado desnaturalizado más favorable (de menor energía), en comparación con el estado plegado compacto. Los distintos desnaturalizantes actúan por mecanismos diferentes, pero es probable que muchos (como los disolventes orgánicos, sales, ácidos y bases) actúen por medio de uniones favorables con la columna vertebral de enlaces peptídicos. De esta manera estabilizan a la forma desnaturalizada. Algunos de estos agentes desnaturalizantes provocan la ruptura de enlaces covalentes cuando están en concentraciones muy elevadas o en condiciones muy severas (por ejemplo: hidrólisis ácida de los enlaces peptídicos). En estas circunstancias es imposible la recuperación de la conformación nativa. A este estado se le conoce como **la degradación de la proteína** [28].

Es precisamente la desnaturalización del colágeno el gran problema que se suscita como paso previo para poder moldear filmes. **Su estructura es extremadamente sensible a estímulos externos y su ventana de desnaturalización es muy pequeña** [29]. Con lo cual, cuando se quieren procesar como un típico termoplástico (con presión y temperatura), se **degradan las estructuras**. En la Figura 5 se describe cómo la desnaturalización de la triple hélice puede llevar al desdoblamiento de las cadenas principales, pero si estas condiciones no son controladas, ocurre de forma casi conjunta la degradación (disminución del tamaño de las cadenas). **Esto hace que los filmes que se obtengan carezcan de buenas propiedades mecánicas.** En este punto es donde entra el concepto de plastificación.

2.1.1 Plastificación

La plastificación es un proceso ampliamente conocido en la ciencia de los materiales, específicamente en el mundo de los polímeros. Es un fenómeno que implica la adición de sustancias (conocidas como lubricantes o plastificantes) a un polímero para aumentar su flexibilidad, maleabilidad y facilidad de procesamiento. Son pequeñas moléculas con baja volatilidad, dirigidas a reducir las interacciones cadena-cadena e inducir flexibilidad y extensibilidad (Ver Figura 6 (a)). Este proceso es fundamental en la industria de los plásticos para la producción de materiales en condiciones de procesado menos severas [30].



Lo mismo ocurre en el caso de las proteínas, la suma de las interacciones entre sus cadenas conduce a una estructura rígida y frágil (Ver Figura 6 (b)), lo que requiere la incorporación de un plastificante. El agua es el plastificante más estudiado para los biopolímeros. No obstante, también se han estudiado el efecto de otros plastificantes comunes, como el glicerol, sorbitol y xilitol [31], [32], azúcares [32], trietanolamina [33], glicoles: EG (EtilenGlicol), DEG (DietilenGlicol), TEG (TrietilenGlicol), TEEG (TetraetilenGlicol) [34], [35] y algunos alcoholes como 1,3-propanediol y 1,4butanediol [34], en estructuras basadas en proteínas.

Al elegir un plastificante, es importante considerar varios aspectos clave. Los plastificantes con pesos moleculares más pequeños suelen ser más eficientes. Mientras que aquellos con baja polaridad son menos efectivos comparados con los plastificantes altamente polares. Esto es debido a su menor competencia con los lugares donde se forman los enlaces de hidrógeno [36]. Además, algunos plastificantes pueden migrar fuera de la matriz de la película si no son compatibles con la proteína, como ocurre con algunos glicoles. Esta compatibilidad depende de la naturaleza química, tamaño y estructura tanto de la macromolécula como la del plastificante, requiriendo estudios de compatibilidad para asegurar una adecuada sinergia y mejorar las propiedades estructurales de la película [37]. En este sentido, el glicerol ha demostrado ser el más efectivo en películas basadas en proteínas [33].



Figura 6. Esquematización del mecanismo de plastificación con glicerina en (a) las cadenas poliméricas y en (b) proteínas.

2.1.2 Entrecruzamiento

Aunque la plastificación es considerada como un pretratamiento de las macromoléculas proteicas para lograr movilidad y con ello el moldeo de formas concretas, en este caso filmes, es importante tener en cuenta cómo afecta esta plasticidad inducida en las propiedades finales de los filmes. Está ampliamente reportado que los plastificantes disminuyen la resistencia mecánica y aumenta la elongación a la rotura. Por lo que es necesario, después del moldeo, revertir el procedimiento para disminuir la capacidad de deformación y aumentar la estabilidad del producto final. **El entrecruzamiento es el proceso en el que se crea una red tridimensional mediante la formación de enlaces covalentes o no covalentes entre las cadenas** [38]. Este proceso suele ser empleado en biopolímeros para mejorar su rendimiento. Aunque el entrecruzamiento reduce la movilidad de la estructura, mejora las propiedades mecánicas, las de barrera y la resistencia al agua. Igualmente mejora la resistencia al calor, a la luz e incluso se reduce la biodegradación [38]. Es decir, es un postratamiento, que inmoviliza y conecta la estructura plastificada.



Para entrecruzar el colágeno, se han estudiado dos tipos de agentes entrecruzantes: químicos y físicos. En la química se usan compuestos como el glutaraldehído (GA), la genipina, el EDC-NHS (1etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS), el almidón dialdehído y el chitosan [19]. Los físicos son la temperatura (con la técnica de DHT, deshidrotérmico), modificaciones enzimáticas e irradiación [19] (donde destacan la radiación ultravioleta [19] y la radiación gamma [39], [40]).

Los entrecruzantes químicos tienen la desventaja de que pueden dejar restos de sustancias que son citotóxicas (dañan células o tejidos) y no se sabe, a priori, hasta qué punto son biodegradables. Mientras que los físicos, en principio, no incorporan ningún agente que pueda resultar dañino [19] ni tampoco afectan a la biodegradabilidad del material. Aun así, los físicos pueden degradar la proteína y hacer un entrecruzamiento no uniforme en los precursores de mayor espesor [41].

Dentro de los entrecruzantes químicos, el glutaraldehído (GA), es de los más populares debido a su bajo coste, a su alta reactividad y a su alta solubilidad en agua. Cabe destacar que se han realizado ensayos que indican que el GA con colágeno es adecuado para estudios *in vivo* [19]. En la Figura 7, se esquematiza cómo se entrecruza el GA con el colágeno.



Figura 7. Entrecruzamiento del colágeno y del glutaraldehído (GA). Extraído de [19].

Por otro lado, en la literatura se han encontrado investigaciones en la que se estudió el cambio de pH en la proteína como medio de entrecruzamiento. El punto isoeléctrico es la condición de equilibrio en la cual una proteína tiene carga neta neutra [42]. En este caso, cuando el pH del colágeno está entre 6 y 7'5 [43]. Cuando se aleja del punto isoeléctrico, las fuerzas repulsivas dentro de la cadena molecular aumentan, estrechándose la cadena y dando lugar a que grupos internos surjan a la superficie. Estos grupos reaccionan entre sí, produciendo un aumento del grado de reticulación, lo que deriva en una mejora de las propiedades mecánicas [43], [44]. Dependiendo de si el pH es ácido o básico, la reticulación se va a dar a nivel intramolecular o intermolecular respectivamente.

Basados en estas evidencias científicas, en el presente estudio se utilizará glicerina como agente plastificante en el proceso de moldeo. Se evaluarán los efectos del glutaraldehído, los cambios de pH y la combinación de ambos en el entrecruzamiento de los materiales. Antes del proceso de espumado, en cada caso se determinará la variable que más influye en la obtención de precursores con diferentes microestructuras y propiedades mecánicas.



2.2 Material celular basado en colágeno (espuma)

En la literatura, los métodos más tradicionales para realizar el espumado del colágeno son la llamada **técnica SFF** ("Solid Freeform Fabrication", Fabricación de Forma Libre Sólida) que consiste en la impresión de moldes en negativo que posteriormente se rellenan con colágeno [45]; **la liofilización** que consiste en congelar la muestra muy rápidamente, someterla a sublimación para eliminar el agua y aplicar calor para que vuelva al estado sólido [46]; el moldeo con disolvente o **lixiviación con sal**, consiste en mezclar colágeno con partículas de sal, moldear y solidificar la mezcla, y luego eliminar la sal mediante lixiviación para crear una estructura porosa (este último método permite controlar la porosidad del material [21]). Por último, algunos más recientes como la **bioimpresión 3D**, que consiste en imprimir la estructura celular diseñada por ordenador, donde se utilizan biotintas de colágeno [47]. En general, estas técnicas son utilizadas para obtener material celular de colágeno en aplicaciones biomédicas como la ingeniería de tejidos, liberación controlada de fármacos, andamios porosos, etc., donde las solicitaciones mecánicas no son exigentes, ni prioritarias.

Por otra parte, existen técnicas muy extendidas en materiales poliméricos pero poco explorada en biomateriales, como la de **espumado con agentes químicos** (proceso donde se introducen compuestos que liberan gas al activarse, creando burbujas y formando una estructura porosa en la matriz del material) y el **espumado por disolución de gas** (técnica que utiliza la disolución y posterior despresurización de un gas en una matriz polimérica para formar una estructura porosa controlada [48], [49], [23]).

El espumado por disolución de gas presenta varias ventajas frente a las anteriores mencionadas. Primordialmente es una técnica física que además de no introducir compuestos complementarios, no deja restos tóxicos dentro del material [21], también forma una gran cantidad de poros que pueden estar interconectados entre sí, lo que se traduce en propiedades interesantes para aplicaciones de mayor valor añadido [23]. En esta técnica hay involucradas cuatro etapas: saturación, despresurización, expansión (o espumado) y estabilización.

El primer paso es el de la saturación. En un autoclave se introduce el material que se va a espumar en una atmósfera de alta presión y temperatura de gas (normalmente CO₂), que serán las condiciones de saturación. Esto da lugar a la difusión del gas en el interior del material. El gas se difunde por la muestra ocupando lo que se conoce como volumen libre, es decir, el hueco entre las cadenas del material. Este proceso acaba cuando el material no acepta más gas a las condiciones de presión y temperatura, es decir, hasta que el material está saturado [50]. En la Figura 8 (a) se ilustra la fase de saturación.

El segundo paso es la despresurización. El gas presurizado sale con una velocidad determinada, reduciendo bruscamente la presión hasta presión atmosférica, lo que da lugar a una inestabilidad termodinámica dentro del material. Cuando la muestra de colágeno estaba sometida a altas presiones, admitía mayor cantidad de gas, pero al bajar la presión a la atmosférica, se produce un estado de supersaturación. El material ya no acepta la misma cantidad de gas. Esto provoca una separación de fases entre el gas y la matriz, generando lo que se conocen como puntos de nucleación [50]. En la Figura 8 (b) se puede ver la fase de despresurización.



Tras la despresurización, el material es calentado a una cierta temperatura, donde comienza el espumado o expansión. En estas condiciones, el material se encuentra en un estado maleable, permitiendo que los puntos de nucleación crezcan y formen las celdas finales [50]. En la Figura 8 (b) se ilustra la fase de expansión o espumado.

El último paso, la estabilización de la estructura celular, ocurre cuando una vez extraída la muestra de la temperatura, se deja enfriar. De esta forma las celdas dejan de crecer, evitando fenómenos de degeneración y se obtiene una estructura estable [50]. En la Figura 8 (c) está esquematizado todo el proceso por el que transcurre la muestra seleccionada.



Figura 8. En (a) se ilustra el paso de la saturación. En (b) se ilustra el paso de la despresurización al espumado. En (c) se representa un esquema de los estados por los que pasa la muestra a lo largo del proceso de disolución de gas y su estabilización en el paso 5. Extraído de [50].

Como se ha comentado, esta técnica de disolución de gas ha sido poco explorada para biomateriales. Algunos ejemplos que pueden citarse son los siguientes: Heura Ventura y colaboradores espumaron materiales como PHAs (polihidroxialcanoatos) y sus composites con fibras naturales con esta técnica, con el objetivo de obtener estructuras de menor densidad y para el mayor aprovechamiento de las materias primas. Encontraron densidades relativas finales cercanas a 0,5 [22]. Por otro lado, con el propósito de elaborar andamios celulares para aplicarse en el campo de la ingeniería de tejidos, Hongyun Tai y colaboradores obtuvieron espumas de biopolímeros, como el PLGA (Poli(ácido láctico-co-glicólico)) y $P_{DL}LA$ (Poli(ácido D,L-láctico)), derivado del PLA (ácido poliláctico), con poros de diámetros de entre 40 µm y 600 µm. Además, se menciona que para obtener poros de mayor tamaño se debe de incrementar la temperatura de espumado, mientras que, si se busca poros de menor tamaño, lo ideal es aumentar la presión del gas espumante y el tiempo de saturación [21].



Por otro lado, en la patente US20030153638A1 de Industrial Technology Research Institute ITRI en Taiwan (2003) [51], se describe el procedimiento general para espumar biopolímeros, entre ellos el colágeno o la gelatina junto a un solvente, obteniendo poros del tamaño de entre 50 μm y 200 μm. En estos estudios mencionados, se utilizó como agente espumante CO₂ en condiciones supercríticas. Alternativamente, Andrea Barbetta y colaboradores [52] y Marco Costantini y colaboradores [53] emplearon argón como agente espumante para el colágeno y PVA¹ (Polivinil alcohol). En el caso de esta investigación se empleó sCO₂. Sin embargo, ninguno de estos trabajos estudia las características de los precursores de partida y menos aún, el comportamiento mecánico de los materiales celulares finales, ya que estos, en la mayoría de los casos, están pensados para aplicaciones médicas de bajos requerimientos mecánicos.

Finalmente, este trabajo da el salto en el estado de la técnica para estudiar las propiedades mecánicas de las estructuras celulares basadas en colágeno, encontrando las relaciones entre los filmes precursores, los parámetros experimentales y la microestructura de éstas.

3 Objetivos

El objetivo general es estudiar las condiciones (tipo de precursor y parámetros experimentales) que afectan a la estructura celular de materiales basados en colágeno, obtenidos mediante la técnica de espumado por disolución de gas. Este objetivo se sustenta, a su vez, en los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar diferentes condiciones de plastificación y de entrecruzamiento de los precursores (filmes de colágeno), variando la concentración de plastificante, la temperatura y el tiempo de mezclado, la cantidad de entrecruzante y el pH durante la obtención de los filmes por la vía del "casting" (filmes por disolución).
- Estudiar las características microestructurales de los filmes de colágeno obtenidos y relacionarlas con su respuesta mecánica.
- Utilizar una herramienta de predicción e interpretación de datos (DoE) debido al volumen de ensayos y al complejo comportamiento del colágeno, con el fin de encontrar las variables más significativas en la obtención de filmes con diferentes microestructuras, para ser testados en las pruebas posteriores de espumado.
- Poner a punto ensayos de espumado por disolución de gas, estableciendo los efectos de la saturación del sCO₂ sobre la microestructura del colágeno.
- Relacionar cómo afectan las propiedades que tienen los filmes iniciales con las microestructuras celulares finales obtenidas.
- Potenciar el uso del colágeno como materia prima bio-basada de menor impacto ambiental, en comparación con las materias primas de origen fósil.
- Impulsar futuras alternativas al embalaje alimentario e industrial que cumplan los objetivos marcados por la Agenda 2030.

¹ PVA no es un biopolímero, pero es considerado como tal por su solubilidad en agua y su uso en biomedicina.



4 Procedimiento experimental

4.1 Materiales

El colágeno utilizado fue el Kapro B95 C procedente al 100 % de materias primas bovinas en forma de fibras o copos blancos y facilitada por la empresa DCP company. Glutaraldehído diluido al 50% suministrado por Sigma-Aldrich. Glicerina bidestilada al 99,5 % suministrada por VWR. Hidróxido de sodio de concentración 3 M y ácido acético de concentración 5 M de Sigma-Aldrich. El agente espumante utilizado en la técnica de la disolución de gas es dióxido de carbono al 99,9 % de pureza de Air Liquid.

4.2 Obtención de los precursores (filmes de colágeno)

Para la elaboración de los filmes precursores, se utilizó el método de "casting" (elaboración de una disolución cuyo disolvente se deja evaporar para extraer la película [35], [54]). Se prepararon varias disoluciones que consistían en 6 g de colágeno (Kapro B95 C) en 100 g de agua destilada, mezcladas con un agitador térmico (RSLab) durante una hora y mantenidas a temperatura ambiente. Superada la hora, se ajustaron las condiciones de mezclado (tiempo y temperatura) y la adición de diferentes cantidades de glicerina (Gly) como agente plastificante y/o Glutaraldehído (GA) como agente entrecruzante, ajustando el pH, según sea el caso. Una vez transcurrido el tiempo de mezclado establecido, se repartieron los 100 g de la disolución en dos placas Petri vertiendo 50 g en cada una. A continuación, se dejaron secar durante aproximadamente 7 días en un cuarto acondicionado a 25 °C/50 %HR. Finalmente, al evaporarse el disolvente por completo, se extrajo el filme. De cada disolución se obtuvieron 2 filmes y de ahí las probetas para ensayos mecánicos y los precursores de espumado. El procedimiento se describe en la Figura 9.



Figura 9. (a) Imágenes del proceso de casting. (b) Esquema del método de casting extraído de [55].

4.2.1 Influencia del plastificante (Glicerina) en el precursor (DoE 1, 8 experimentos)

Debido a la complejidad de la experimentación y en aras de encontrar la influencia en la respuesta de la combinación o interacción de los parámetros usados, se emplea el diseño de experimentos, DoE. Esta herramienta se basa en modelos predictivos estadísticos que permiten diseñar la experimentación de manera óptima y encontrar las variables más significativas según la variable de respuesta estudiada, con el análisis de la varianza (ANOVA) [56].



El programa que se utilizó para el diseño del DoE fue el MiniTab 17[®]. El objetivo del primer DoE diseñado fue estudiar qué factores afectan a las propiedades mecánicas de los filmes durante el proceso de plastificación. Se estudiaron tres factores a dos niveles cada uno (inputs): el tiempo de mezclado en caliente (5 min y 20 min), la temperatura (30 °C y 60 °C) y la cantidad de glicerina que se vierte (20 % y 50 %). En total 8 experimentos que se describen en la Tabla 1 según un diseño factorial completo (2³). Como variables de salida (outputs) se midieron las siguientes propiedades mecánicas: el módulo de Young (MPa), el esfuerzo máximo de tracción (MPa), la elongación al máximo esfuerzo de tracción (%), el esfuerzo máximo de rotura (MPa) y la elongación máxima de rotura (%). El procedimiento de caracterización de estas propiedades se describe en el apartado correspondiente. Finalmente, después de resolver la ANOVA (ANalysis Of VAriance, análisis de la varianza), se repitieron ensayos de comprobación para determinar la fiabilidad de la predicción matemática.

| | | Inputs | | | | | | |
|-----|--------------|---------------|----------------|--|--|--|--|--|
| Run | Factor A (%) | Factor B (ºC) | Factor C (min) | | | | | |
| 1 | 20 | 60 | 5 | | | | | |
| 2 | 50 | 60 | 5 | | | | | |
| 3 | 20 | 30 | 20 | | | | | |
| 4 | 20 | 30 | 5 | | | | | |
| 5 | 50 | 60 | 20 | | | | | |
| 6 | 50 | 30 | 5 | | | | | |
| 7 | 50 | 30 | 20 | | | | | |
| 8 | 20 | 60 | 20 | | | | | |

 Tabla 1. Experimentación dada por el DoE 1. Factor A: Porcentaje de Gly (% en masa), Factor B: Temperatura de mezclado

 (°C) y Factor C: Tiempo de mezclado (min).

4.2.2 Influencia del entrecruzante (Glutaraldehído) en el precursor (DoE 2, 16 experimentos)

De la misma manera que el DoE 1, se diseñó otro DoE para estudiar de manera separada el proceso de entrecruzamiento. El mismo procedimiento fue repetido usando estos inputs, en un DoE factorial completo de tipo 2⁴: la cantidad de glicerina (20 % y 50 %), la cantidad de GA (0,25 % y 1 %), la temperatura (30 °C y 60 °C) y el tiempo de mezclado en caliente (5 min y 20 min). En total 16 experimentos descritos en la Tabla 2. En la Figura 10 se puede observar a nivel macroscópico el efecto del entrecruzamiento. A mayor concentración de GA, más oscuro se vuelve el aspecto de los filmes.

| Run | Factor A (%) | Factor B (ºC) | Factor C (%) | Factor D (min) | | | | |
|-----|--------------|---------------|--------------|----------------|--|--|--|--|
| 1 | 20 | 30 | 1,00 | 20 | | | | |
| 2 | 50 | 60 | 0,25 | 20 | | | | |
| 3 | 50 | 30 | 1,00 | 5 | | | | |
| 4 | 20 | 60 | 1,00 | 20 | | | | |
| 5 | 50 | 60 | 1,00 | 20 | | | | |
| 6 | 20 | 60 | 1,00 | 5 | | | | |
| 7 | 50 | 60 | 0,25 | 5 | | | | |
| 8 | 20 | 30 | 0,25 | 5 | | | | |
| 9 | 50 | 30 | 0,25 | 5 | | | | |

 Tabla 2. Experimentos dados por el DoE 2. Factor A: Porcentaje de Gly (% en masa), Factor B: Temperatura de mezclado

 (°C), Factor C: Porcentaje de GA (%en masa) y Factor D: Tiempo de mezclado (min).



| 10 | 50 | 30 | 1,00 | 20 |
|----|----|----|------|----|
| 11 | 50 | 30 | 0,25 | 20 |
| 12 | 20 | 30 | 0,25 | 20 |
| 13 | 20 | 30 | 1,00 | 5 |
| 14 | 20 | 60 | 0,25 | 5 |
| 15 | 50 | 60 | 1,00 | 5 |
| 16 | 20 | 60 | 0,25 | 20 |





4.2.3 Influencia del cambio de pH en la disolución usada para obtener el precursor

Una vez estudiadas las respuestas de los DoEs anteriores, se eligieron las mejores condiciones de plastificación (50 % Gly, temperatura: 30 °C y tiempo: 5 min) y se cambiaron sistemáticamente la cantidad de GA (0 %, 0,25 % y 1 %) y el pH de las disoluciones a tres niveles (ácido pH:3. neutro pH:7 y básico pH:9). Para obtener pH ácido se vertieron 11 gotas de ácido acético y para obtener pH básico se vertieron 20 gotas de hidróxido de sodio. Se utilizó papel tornasol para identificar cualitativamente el grado de acidez o basicidad de la disolución. Durante la agitación prolongada, se evidenció el entrecruzamiento del colágeno por la formación de material insoluble, como se muestra en la Figura 11. En la Tabla 3 se recogen las propiedades de los experimentos realizados para este apartado.

| Run | GA (%) | рН | | |
|-----|--------|----|--|--|
| 1 | 0,00 | | | |
| 2 | 0,25 | 3 | | |
| 3 | 1,00 | | | |
| 4 | 0,00 | | | |
| 5 | 0,25 | 7 | | |
| 6 | 1,00 | | | |
| 7 | 0,00 | | | |
| 8 | 0,25 | 9 | | |
| 9 | 1,00 | | | |

| Tabla 3. E | xperimentos | con 50%Gly, | 30 ºC y 5 min | diseñados p | ara estudiar el | cambio de pH. |
|------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-----------------|---------------|
| | | | , | | | |





Figura 11. Formación de aglomerados insolubles durante el entrecruzamiento de colágeno por al cambio de pH.

4.3 Caracterización de los precursores (filmes de colágeno)

4.3.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido) es una técnica que mide la diferencia de flujo de calor entre una muestra y una referencia según la temperatura. Permite cuantificar la energía involucrada en las transiciones que experimenta la muestra durante un aumento de temperatura [57]. El protocolo de calentamiento que se usó abarcaba un intervalo de temperaturas que iba desde 10 °C hasta 150 °C a una velocidad de calentamiento de 5 °C/min. Las muestras tenían una masa de aproximadamente 10 mg. Se utilizó un flujo de 60 ml/min de nitrógeno de alta pureza. El equipo utilizado fue el modelo DSC 3+ de Mettler Toledo. Con este ensayo se midió la temperatura de la primera transición o movimiento molecular (T_g) (que se determinó como el punto medio de la primera caída) y la entalpía de los precursores y de la estructura celular (que se calculó como el área bajo la curva).

4.3.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

El TGA (Análisis Termogravimétrico) es una técnica analítica utilizada para evaluar la estabilidad térmica de un material y determinar la cantidad de componentes volátiles presentes mediante el análisis de la variación de masa durante el calentamiento controlado [58]. El protocolo empleado barría un rango de temperaturas desde 30 °C hasta 900 °C a una velocidad de 20 °C/min y las muestras fueron de 7 mg de masa aproximadamente. Se utilizó un flujo de 60 ml/min de nitrógeno de alta pureza. La unidad utilizada fue el modelo TGA/SDTA 861, de Mettler Toledo. Con este ensayo se obtuvo la composición de las muestras (ejemplo: cantidad de agua, de plastificante, etc.).

4.3.3 Análisis por Infrarrojo transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros infrarrojos de las películas de colágeno se obtuvieron mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Bruker Tensor27) equipado con reflexión total atenuada (ATR) a temperatura ambiente. Los espectros abarcaron desde 4000 cm⁻¹ hasta 500 cm⁻¹. Todos los espectros representaron el promedio de 32 escaneos consecutivos. Se midieron la vibración de los enlaces significativos que demostraron entrecruzamiento de las muestras (ejemplo: aminas).



4.3.4 Solubilidad en agua como medida del grado de reticulación

La solubilidad en agua se probó mediante el procedimiento de Gómez-Estaca y colaboradores [59]. Una porción de película se colocó en un horno a 60 °C durante 24 h y luego se pesó. Esta es la masa inicial. A continuación, las películas secas se colocaron en un vaso de precipitados con agua destilada (pH:6, en una relación agua/muestra de 450), se agitó suavemente a 23 °C durante 24 h. El residuo no soluble se secó de nuevo a 60 °C durante 24 h dentro de un horno bajo una presión de 30 mbar. La reticulación de las películas se calculó como la Ecuación (1.):

Reticulación (%) =
$$\frac{M_0 - M_f}{M_0} \cdot 100$$
 (1.)

donde, M₀ = Masa inicial de la muestra, M_f = Masa del residuo de películas desecadas no disueltas.

4.3.5 Propiedades mecánicas

Los filmes se troquelan según la norma ISO 527-3 en forma de probetas para ser sometidas a ensayos de tracción. La troqueladora es de modelo Instron 3369 clase 05 y el error de medida respecto del patrón es del 0,5 %. La norma que se aplica para este tipo de ensayos con plásticos es la ISO 527-2. El programa del ensayo se realizó a una velocidad de 1 mm/min para medir el Módulo de Young. Después de alcanzar la zona plástica, se llegó a la rotura a una velocidad de 50 mm/min. En el Anexo 1 se puede ver un esquema de cómo se calcularon los valores de las propiedades mecánicas. Se troquelan varias probetas por experimento para repetir los ensayos al menos 3 veces.

Los datos para cada propiedad mecánica se generaron por duplicado en cada nivel. Por lo tanto, el diseño factorial completo consistió en 16 y 32 ejecuciones para DoE 1 y DoE 2 respectivamente. Todos los experimentos se realizaron de forma aleatoria, evitando sesgos en las mediciones.

El análisis estadístico incluyó la ANOVA para determinar la importancia de cada variable independiente, sus interacciones, efecto principal y gráficos de interacción. El modelo lineal de regresión general utilizado para el diseño experimental siguió la Ecuación (2.):

$$y = \theta_0 + \theta_1 X_1 + \theta_2 X_2 + \dots + \theta_{12} X_1 X_2 + \dots + \varepsilon$$
 (2.)

donde "y" es la respuesta (propiedad mecánica); X_1 y X_2 son las variables; β_0 es el término constante; β_1 y β_2 son los coeficientes del polinomio para efectos lineales; β_{12} es el coeficiente del polinomio para el efecto de interacción y ε representa el término asociado al error.

4.4 Obtención de la estructura celular de colágeno

Para el espumado por disolución de gas de los precursores de colágeno, se siguió el proceso en dos pasos descrito en el estado del arte. Se recortaron pequeños trozos de los filmes elegidos y fueron depositados en un autoclave (BombaNEX10). Para la etapa de saturación, se introdujo el material a una presión de 160 bares, a una temperatura de 50 °C en CO₂. El tiempo de saturación fue de 3 días. El tiempo de desorción fue de aproximadamente 3 minutos. Un set de muestras se sometió a un espumado en el baño de agua a una temperatura de espumado de 80 °C y otro set de muestras en un horno a 90 °C durante un minuto para la fase de expansión. Se dejan reposar las estructuras celulares finales al menos un día antes de comenzar la caracterización.



4.4.1 Solubilidad en CO₂ en colágeno saturado

La solubilidad del colágeno en CO_2 durante el proceso de espumado, se calculó como el aumento porcentual de masa entre el precursor inicial y la muestra saturada. Esta diferencia de masa se debe al CO_2 disuelto en la matriz y se midió utilizando una balanza Mettler-Toledo. Para obtener el valor de saturación inicial, como se muestra en la Figura 12 (a), la pérdida de masa se representó gráficamente en función de la raíz cuadrada del tiempo dividida por el espesor. Para tiempos próximos a 0 s, la pérdida de masa es lineal, por lo que se utilizaron los primeros valores para extrapolar el valor de concentración de CO_2 en t = 0 s. (Figura 12 (b)). Procedimiento extraído de [50].



Figura 12. Procedimiento de cálculo de la solubilidad de Colágeno en CO₂. Extraído de [50].

4.5 Caracterización de las estructuras celulares de colágeno

4.5.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para estudiar la microestructura de las espumas, se fracturaron las mismas con ayuda de nitrógeno líquido para no modificar la estructura celular. Posteriormente, se metalizaron con oro y se colocaron en un soporte. Con el SEM (Microscopio Electrónico de Barrido) se barrió la zona de la fractura y se capturaron fotos de las zonas donde hay mayor homogeneidad. Se realizaron varias fotos con distintas escalas. El SEM utilizado era de modelo FlexSEM 1000, Hitachi. El equipo de pulverización catódica (unidad con la que se realizó la metalización) era del modelo Balzers SCD 004. A partir de las imágenes obtenidas, se midieron los tamaños de celda. Este parámetro se relaciona con la fase gaseosa del material e indica cuál es el tamaño promedio de los poros de la espuma [50]. El tamaño de celda se determina con el valor medio de los diámetros medidos en una zona homogénea de la espuma. Se usó el software libre "Fiji".

4.5.2 Densidad

Se dejaron reposar las espumas durante un día y posteriormente se midió su densidad con una balanza hidrostática (METTLER TOLEDO) (también se midió la densidad de los sólidos precursores correspondientes). El funcionamiento de la balanza se basa en el Principio de Arquímedes. Se utilizó en lugar de agua etanol, ya que se ha observado que el agua interactúa con el colágeno [38]. Con la densidad de la espuma y del sólido se define la densidad relativa como la Ecuación (3.):

$$\rho_{Relativa} = \frac{\rho_{espuma}}{\rho_{sólido}} \qquad (3.)$$

4.5.3 Propiedades mecánicas

Se realizó un ensayo de dureza a los precursores y a las espumas finales con la unidad de trabajo DIGI TEST de bareiss. El procedimiento utiliza la norma UNE-EN ISO 868, con un tipo de dureza SHORE A y de tiempo de medición de 3 s. Las muestras deben tener un espesor de aproximadamente 4 mm para asegurar el rigor de la medida. Las medidas se repitieron 5 veces.



5 Resultados y discusión

5.1 Estudio de los precursores

Para cumplir con el objetivo de establecer la relación entre las propiedades mecánicas de los filmes precursores y la microestructura del material celular final, se analizó cuáles de los factores estudiados afectan significativamente a las propiedades mecánicas de los precursores.

Como fue descrito en el apartado experimental, se empleó la herramienta de diseño de experimentos (DoE) para estudiar el precursor mediante diseños de factorial completo a dos niveles. Los experimentos diseñados por el software para estudiar la plastificación (DoE 1), el entrecruzamiento (DoE 2) y los realizados para el cambio de pH (sin el uso del DoE), fueron presentados en la sección experimental. Las propiedades mecánicas establecidas como "outputs" fueron: el módulo de Young, el esfuerzo de fluencia, la elongación de fluencia, el esfuerzo de rotura y la elongación de rotura. Estas fueron medidas y alimentadas en el software para obtener las ANOVAS (análisis de varianza).

5.1.1 Influencia del plastificante en el precursor (DoE 1)

En la Tabla 4 están recogidas las propiedades mecánicas medidas en la experimentación del DoE 1.

| | | Inputs | | Outputs | | | | |
|-----|-----------------|------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Run | Factor A (%) | Factor B (ºC) | Factor C (min) | Módulo de Young (MPa) | σ _{Fluencia} (MPa) | ε _{Fluencia} (%) | σ _{Rotura} (MPa) | ε _{Rotura} (%) |
| 1 | 20 | 60 | 5 | 1801,68 ± 91,21 | 49,30 ± 2,55 | 4,95 ± 0,06 | 47,96 ± 1,97 | 15,54 ± 3,22 |
| 2 | 50 | 60 | 5 | 176,72 ± 20,03 | 5,01 ± 0,53 | 71,03 ± 1,50 | 18,79 ± 2,81 | 71,08 ± 1,54 |
| 3 | 20 | 30 | 20 | 1995,81 ± 169,87 | 52,99 ± 3,63 | 5,68 ± 0,85 | 52,62 ± 3,31 | 7,77 ± 1,51 |
| 4 | 20 | 30 | 5 | 1718,73 ± 303,32 | 48,34 ± 2,81 | 7,01 ± 1,82 | 48,27 ± 2,77 | 7,37 ± 1,22 |
| 5 | 50 | 60 | 20 | 142,99 ± 10,39 | 5,03 ± 0,95 | 85,55 ± 0,84 | 19,22 ± 1,81 | 85,57 ± 0,85 |
| 6 | 50 | 30 | 5 | 106,47 ± 27,90 | 4,96± 0,92 | 72,06 ± 4,03 | 17,84 ± 1,57 | 72,05 ± 3,98 |
| 7 | 50 | 30 | 20 | 148,00 ± 14,58 | 4,05 ± 0,81 | 81,77 ± 3,79 | 17,76 ± 0,81 | 81,86 ± 3,88 |
| 8 | 20 | 60 | 20 | 1129,19 ± 122,50 | 50,80 ± 2,05 | 5,08 ± 0,40 | 49,24 ± 1,01 | 11,63 ± 6,52 |

 Tabla 4. Experimentos del DoE 1 y sus propiedades mecánicas correspondientes. Factor A: Porcentaje de Gly (% en masa),

 Factor B: Temperatura de mezclado (°C) y Factor C: Tiempo de mezclado (min).

En la Figura 13 se presentan los diagramas de Pareto correspondientes con la interpretación de estos datos. Estas gráficas indican cuáles de los factores estudiados en la experimentación, son los más significativos estadísticamente sobre las propiedades mecánicas de los filmes. Para ello, el software calcula lo que se conoce como la línea de referencia para establecer el nivel de importancia, aplicando un nivel de confianza del 95% [60]. En otras palabras, las barras de los factores que atraviesen esta línea (de color rojo) son determinantes para las propiedades mecánicas medidas. Además, los resultados de los gráficos de Pareto muestran los valores absolutos de los efectos estandarizados de mayor a menor efecto.





mecánicas y las gráficas de las interacciones entre los factores en función de cada propiedad mecánica.



Como se puede observar en la Figura 13, el único factor significativo para las propiedades asociadas con la rigidez del material (módulo de Young, el esfuerzo de fluencia y el esfuerzo de rotura) es la cantidad de glicerina (Factor A). La relación entre el Factor A y estas propiedades es inversamente proporcional: cuanto más crece el Factor A, menor es la rigidez de las muestras. Cuando se grafican las curvas esfuerzos deformación (ver Figura 14) se puede observar, claramente, dos grupos de comportamiento. Uno de ellos, menos rígido, con bajos valores de esfuerzo a la fluencia (cercanos a 5 MPa, ver Figura 14 (a)) y otro más rígido, con altos esfuerzos a la fluencia (cercanos a 50 MPa, ver Figura 14 (b)). Se demuestra que prácticamente la rigidez es dependiente sólo de este factor, tal como lo predice el software.



Figura 14. Curvas esfuerzo deformación para la experimentación del DoE 1. (a) muestras con 50%Gly (b) muestras con 20%Gly.

Este resultado puede atribuirse a que, a mayor cantidad de glicerina hay mayor movilidad molecular. Según distintos autores, la glicerina interactúa con los grupos -OH mediante la creación de un enlace con el hidrógeno, evitando el contacto entre las cadenas proteicas y generando mayor volumen libre [36], [37]. Esto es debido a que la glicerina aumenta la movilidad del material, provocando que el módulo de Young decrezca y aumente la elasticidad del material, influyendo a su vez, en que el esfuerzo de fluencia y de rotura disminuyan. Como consecuencia, el material es menos resistente a la deformación plástica y a la de rotura [36].

Cuando se analiza cómo la cantidad de glicerina modifica las transiciones térmicas de los materiales estudiados, en ensayos de DSC, se demuestra que a mayor cantidad de glicerina las **temperaturas de desnaturalización o el primer movimiento molecular ocurre antes** (primera señal en las endotermas de la Figura 15 (a)). En aquellas con más cantidad de plastificante añadido (50%Gly) ocurre cerca de los 50 °C y en aquellas con menor cantidad (20%Gly) ocurre cerca de los 90 °C. Es decir, la plastificación se da de manera más efectiva a mayor cantidad de plastificante y esta transición parece constante para iguales cantidades de glicerina añadidas. A su vez, es independiente de la temperatura y el tiempo de mezclado (Ver datos cuantitativos de la interpretación de las endotermas en Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4).



En cuanto a este último punto, el análisis termogravimétrico demuestra que prácticamente las cantidades de glicerina añadida (con una descomposición cercana a las 250 ºC [43]) no dependen del tiempo de exposición, ni de la temperatura (Ver Figura 15 (b) y datos cuantitativos en Anexo 2). Esto es así incluso cuando parece lógico que mayor tiempo de exposición y mayor movilidad molecular por la excitación térmica, mejorarían la impregnación con el plastificante.

En este punto es importante resaltar que, por una parte, aumentar la plastificación también puede exponer mayor cantidad de grupos hidrofílicos (inter o intramoleculares) que al estar en contacto con el medio donde se fabrica el filme (agua), aumenta la cantidad de ésta, ya que se introduce entre las cadenas y a su vez actúa como un plastificante adicional. Por este motivo, en alguna de las muestras estudiadas, se puede ver un lomo de descomposición cercano a los 100 ºC correspondiente al agua (Ver Figura 15 (b) y datos cuantitativos en Anexo 2). Sin embargo, está tipificado en la literatura que, aumentar la temperatura de las cadenas de colágeno por encima de su primer movimiento molecular, puede llevar a que estos grupos hidrofílicos se encuentren entre sí, creando un tipo de entrecruzamiento entre ellos [61]. Es decir, ocurre el efecto contrario a la plastificación, de ahí que existen efectos contrapuestos que puedan estar anulándose entre ellos y sean imperceptibles para el tratamiento estadístico.



Figura 15. (a) Endotermas por DSC y (b) primera derivada por TGA de los materiales estudiados en el DoE 1.

Otro efecto interesante observado en las curvas de DSC (Figura 15 (a)), es que no solo la cantidad de glicerina, en sí misma, está actuando como un lubricante y como una fase importante dentro de la mezcla (es la mayor responsable de modular las propiedades mecánicas de los filmes), sino que ésta es capaz de destruir la estructura jerárquica de las fibras de colágeno [62]. Sí se observan las muestras con menor cantidad de glicerina, aparecen endotermas con áreas bajo la curva mayor (entalpías) que desaparecen conforme aumenta la plastificación (Ver, particularmente, endoterma del Run 1, en la Figura 15 (a)).





Figura 16. Representación del fenómeno de endurecimiento por deformación. Extraído de [63].

Por otra parte, con respecto a la rigidez de las muestras estudiadas, es importante describir el fenómeno de endurecimiento por deformación que se presentan en las muestras con mayor plastificación (50%Gly, Figura 14 (a)). Aunque son las muestras con menor módulo de Young y su fluencia se alcanza antes (menos resistentes al requerimiento mecánico), estas tienen la movilidad suficiente para que, durante la deformación plástica y en la dirección del esfuerzo, puedan reordenarse, estableciendo fuertes interacciones cadena-cadena en una especie de acoplamiento tipo "lego" que ofrece mayor resistencia a la deformación en esos estadios. Esta capacidad de orientación con el esfuerzo que ofrece la plastificación puede ser muy interesante en el proceso de espumado, como está reportado para algunos polímeros

convencionales [63]. En la Figura 16 se muestra una representación gráfica del fenómeno.

Finalmente, en cuanto a las propiedades asociadas a la deformación a la rotura, se muestra en el diagrama de Pareto que todos los factores estudiados y sus interacciones afectan a esta propiedad de forma aditiva, pero no de forma proporcional entre ellas. De todos los factores, la cantidad de plastificante usado es la más significante. Está ampliamente probado que la rigidez y la elongación de las muestras en un ensayo de tracción simple suelen ser propiedades antagónicas [33], [36], [37]. En este caso, no es diferente: mayor plastificación promueve más movilidad y con ello mayor capacidad de deformación, a expensas de perder rigidez.

En último lugar, para el espacio estudiado, las regresiones lineales obtenidas con ajustes del modelo de datos con R² > 91 % se presentan a continuación en la Tabla 5, como una herramienta para modelar las propiedades mecánicas de los filmes. Los ensayos fueron repetidos y las regresiones lineales fueron comprobadas. Se puede observar que, en los datos de deformación, las constantes asociadas a los Factores B y C son pequeñas, por lo que sus contribuciones son menores. Es importante recordar que esta es una propiedad muy delicada de medir en filmes de menos de 50 micras y sus errores suelen ser grandes, debido a la importancia del troquelado y la preparación de la muestra.

| | mezclado (⁰C) y Factor C: Tiempo de mezclado (min). | |
|--------------------------|---|------------------------|
| Módulo de Young (MPa) | y = 2673 - 50,60·A | R ² = 91,64 |
| Esfuerzo Fluencia (%) | y = 71,62 - 1,0633·A | R ² = 99,31 |
| Deformación Fluencia (%) | y = 41,6412 + 35,9613·A + 2,8787·C + 0,6762·A·B + 3,1787 A·C + 0,7838 B·C + 0,4187 A·B·C | R ² = 95,30 |
| Esfuerzo Rotura (MPa) | y = 70,27 - 1,0373·A | R ² = 99,22 |
| | y = 48,841 + 33,498·A + 1,8463·B+ 5,0243 C - 0,7118 ·A·B + 11,066·A·C+ | |

Tabla 5. Regresiones lineales obtenidas para el DoE 1. Factor A: Porcentaje de Gly (% en masa), Factor B: Temperatura de

5.1.2 Influencia del entrecruzante en el precursor (DoE 2)

2,1726·A·B·C

Deformación Rotura (%)

Al igual que en el apartado anterior, las propiedades mecánicas de los ensayos propuestos para el DoE 2 fueron medidas y alimentadas en el software y los diagramas de Pareto de efectos significativos fueron generados. (Ver Tabla 6 y Figura 17, respectivamente).

 $R^2 = 96,75$



| | 70 | mperutui | u ue mez | 201000 (-0), | actor C. Porcentaje de GA (zen masa) y ractor D. Hempo de mezcidad (min). | | | | | |
|-----|-------|----------|----------|--------------|---|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--|
| | | In | puts | | Outputs | | | | | |
| Run | A (%) | B (ºC) | C (%) | D (min) | Módulo de Young (MPa) | σ _{Fluencia} (MPa) | ε _{Fluencia} (%) | σ _{Rotura} (MPa) | ε _{Rotura} (%) | |
| 1 | 20 | 30 | 1,00 | 20 | 1706,14 ± 15,26 | 48,69 ± 1,95 | 4,39 ± 0,23 | 46,60 ± 0,96 | 6,88 ± 2,62 | |
| 2 | 50 | 60 | 0,25 | 20 | 146,92 ± 6,67 | 5,15 ± 1,14 | 76,34 ± 6,03 | 17,15 ± 1,15 | 76,38 ± 6,05 | |
| 3 | 50 | 30 | 1,00 | 5 | 58,79 ± 1,80 | 2,18 ± 1,45 | 92,42 ± 1,32 | 12,46 ± 1,56 | 93,18 ± 1,12 | |
| 4 | 20 | 60 | 1,00 | 20 | 1741,65 ± 279,92 | 47,76 ± 5,58 | 3,23 ± 1,04 | 47,38 ± 5,64 | 3,36 ± 1,14 | |
| 5 | 50 | 60 | 1,00 | 20 | 101,23 ± 28,92 | 4,80 ± 0,36 | 70,59 ± 11,35 | 14,66 ± 0,37 | 70,77 ± 11,51 | |
| 6 | 20 | 60 | 1,00 | 5 | 1394,21 ± 123,93 | 45,55 ± 0,37 | 4,04 ± 0,55 | 44,36 ± 1,31 | 6,04 ± 3,09 | |
| 7 | 50 | 60 | 0,25 | 5 | 289,98 ± 37,93 | 9,92 ± 1,72 | 53,90 ± 3,05 | 23,24 ± 1,72 | 53,93 ± 3,10 | |
| 8 | 20 | 30 | 0,25 | 5 | 2404,97 ± 156,00 | 50,86 ± 3,62 | 4,12 ± 0,76 | 49,91 ± 4,34 | 4,98 ± 1,75 | |
| 9 | 50 | 30 | 0,25 | 5 | 140,56 ± 31,57 | 6,29 ± 1,11 | 80,04 ±8,91 | 19,60 ± 1,02 | 80,25 ± 8,87 | |
| 10 | 50 | 30 | 1,00 | 20 | 63,27 ± 12,17 | 3,14 ± 1,12 | 81,01 ± 6,77 | 14,67 ± 1,17 | 87,03 ± 6,87 | |
| 11 | 50 | 30 | 0,25 | 20 | 152,14 ± 20,94 | 5,71 ± 0,70 | 59,13 ± 6,26 | 12,70 ± 0,66 | 59,34 ± 6,41 | |
| 12 | 20 | 30 | 0,25 | 20 | 1730,01 ± 127,08 | 46,95 ± 0,45 | 4,80 ± 0,81 | 46,12 ± 0,35 | 8,45 ± 4,55 | |
| 13 | 20 | 30 | 1,00 | 5 | 1677,91 ± 258,26 | 49,80 ± 3,14 | 3,81 ± 0,91 | 47,05 ± 2,85 | 6,31 ± 3,07 | |
| 14 | 20 | 60 | 0,25 | 5 | 2067,76 ± 329,65 | 53,43 ± 3,11 | 4,70 ± 0,24 | 53,23 ± 3,23 | 5,29 ± 0,24 | |
| 15 | 50 | 60 | 1,00 | 5 | 90,98 ± 17,66 | 3,14 ± 2,33 | 77,54 ± 9,47 | 14,62 ± 2,21 | 77,61 ± 9,32 | |
| 16 | 20 | 60 | 0,25 | 20 | 1545,21 ± 144,47 | 51,59 ± 2,69 | 5,23 ± 0,06 | 50,56 ± 2,10 | 7,93 ± 2,41 | |

Tabla 6. Experimentos del DoE 2 con sus propiedades mecánicas. Factor A: Porcentaje de Gly (% en masa), Factor B:

 Temperatura de mezclado (°C), Factor C: Porcentaje de GA (%en masa) y Factor D: Tiempo de mezclado (min).

Los diagramas de Pareto demuestran que introducir GA hace que, a diferencia del DoE anterior, el resto de los parámetros y sus interacciones sean significantes en las propiedades mecánicas medidas. Aun así, el Factor A, la cantidad de glicerina (asociada con la movilidad molecular) vuelve a ser el factor más determinante en las propiedades. En la Figura 17 (a) y (b), las muestras ensayadas se reagrupan en función de este factor, revelando, nuevamente, la presencia de dos poblaciones claramente diferenciadas: aquellas que presentan mayor flexibilidad, asociadas a un mayor contenido de Gly, y aquellas que son más rígidas, correspondientes a un menor contenido de Gly.

Si estas curvas se representan en función del Factor C (%GA), (Ver Figura 17 (c) y (d)), se observa, de nuevo, las dos poblaciones marcadas por el efecto del Factor A y la antagónica relación entre la rigidez y la elongación a la rotura. No obstante, tal como predicen los diagramas de Pareto, además de la cantidad de glicerina, el óptimo de rigidez en ambas poblaciones parece alcanzarse a porcentaje intermedios de GA (0,25 %) y a tiempos altos de exposición en el mezclado.

Para explicar este resultado, se debe que tener en cuenta que hay dos mecanismos que hacen que el entrecruzamiento con GA actúe sobre la rigidez y la deformabilidad de las muestras. El primero de ellos es que se forma una red densa entre las cadenas que las inmoviliza, aumentando la resistencia ya que evita que el colágeno deslice sobre sí mismo, es decir, gana rigidez. El segundo mecanismo está asociado con las conexiones o puentes que crea el GA entre las cadenas, aumentando la longitud de estas, lo que puede mejorar, a su vez, su elongación, aunque se necesite mayor fuerza para deformarlas [64]. Las propiedades finales dependerán de ambos efectos que, simultáneamente, dependen de la cantidad y distribución del entrecruzante en la estructura final.





Figura 17. Diagramas de Pareto para las propiedades mecánicas estudiadas en el DoE 2, las gráficas del comportamiento de los factores significativos con las propiedades mecánicas y las gráficas de las interacciones entre los factores en función de cada propiedad mecánica.





Figura 18. Curvas esfuerzo deformación para la experimentación del DoE 2. (a) muestras con 50%Gly, (b) muestras con 20%Gly. (c) Módulo de Young y (d) Elongación a la rotura en función de %GA.

La cantidad de entrecruzante injertado se puede estudiar con los porcentajes de entrecruzamiento obtenidos a partir de un ensayo de solubilidad en agua. Los resultados mostrados en la Figura 19 arrojan dos importantes conclusiones: por una parte, cuanto más %Gly (plastificante) hay en el medio, más entrecruzado está el material (cerca del 30 % en todos los casos con 50%Gly y sobre el 15 % cuando tienen 20%Gly). Por otra parte, cuanto más %GA (entrecruzante) hay en el medio, pocas diferencias se observan, aunque ligeramente son menos solubles, es decir, hay mayor entrecruzamiento.

Los resultados permiten concluir que **a mayor movilidad de la estructura hay mayor capacidad para que el entrecruzante penetre en ella y mayor sea su rendimiento.** En este punto es importante conocer el mecanismo por el cual el GA se adhiere a las fibras de colágeno. Según la literatura, el entrecruzamiento con GA se debe principalmente a la **formación de una base de Schiff (Ver Figura 20)**, que es una reacción química en la que se condensa el grupo amina (-NH₂) presente en la lisina e hidroxilisina [65].





Figura 19. % de reticulación calculado a partir de la solubilidad de las muestras en agua.



Figura 20. Reacción que resulta en la formación de una base de Schiff.

Estos grupos aminas son los mismos que reaccionan con el agua y la glicerina en la plastificación. Por lo que a mayor cantidad de Gly, aunque hay mayor movilidad para que penetre el entrecruzante, también hay menor disponibilidad de estos grupos para interactuar, lo que describe una relación de competencia. Según los datos de entrecruzamiento obtenidos, prevalece el primer efecto sobre el segundo. En otras palabras, la movilidad es crucial en la disminución del número de grupos amina libres para injertar más GA. Ahora bien, a igual cantidad de plastificante, al aumentar el GA se incrementa la reticulación porque mayor cantidad de entrecruzante se está adhiriendo. Estos dos fenómenos se corroboran en ensayos de FTIR mostrados en la Figura 21 (a), (b) y (c).



Figura 21. Espectros de FTIR de las muestras entrecruzadas estudiadas en el DoE 2. Comparación de los cambios de intensidad en los picos de la Amida A para (a) muestras con 0,25%GA con diferentes %GIy, (b) muestras con diferentes %GA y 50%Gly y (c) muestras con diferentes %GA y 20%Gly. *Las muestras estudiadas se obtuvieron a la misma temperatura (60 ºC) y tiempos de mezclado (20 min).



Los espectros mostrados en la Figura 21, muestran los picos característicos de absorción de los filmes de colágeno entrecruzados con GA. El pico sobre 3300 cm⁻¹ corresponde con la conocida como Amina A (debida a la vibración de estiramiento del grupo N-H y a la vibración de estiramiento O-H). Este pico es característico porque engloba las vibraciones de todos los tipos de amina presentes en la estructura del colágeno (primaria: 1630 cm⁻¹, secundaria: 1540 cm⁻¹ y terciaria: 1240 cm⁻¹). Como se observa en la Figura 21, el seguimiento de la evolución de estos grupos aminas durante el entrecruzamiento, da una idea del porcentaje de entrecruzamiento obtenido, puesto que se asocia menor intensidad de señal, con menor cantidad de grupos amina disponibles [66].

El aumento de la reticulación por la disminución de la solubilidad y por la pérdida de intensidad de la banda característica conforme aumenta la cantidad de GA añadido, no explica por qué existe un máximo de rigidez cuando se añade 0,25%GA. En este punto, la literatura describe que el proceso de reticulación con GA produce **entrecruzamientos tanto a nivel intermolecular como intramolecular**, y éstos son los responsables de inmovilizar y aumentar la rigidez de la macromolécula. Pero a su vez, también dan lugar a la formación de **segmentos alifáticos cortos o largos entre las cadenas del colágeno**, que son a su vez, los responsables de aumentar la elongación a la rotura [43].

En este último punto, hay que considerar que el GA es un aldehído saturado de cadena lineal con cinco carbonos, que produce enlaces cruzados a través de una reacción de los grupos aldehído finales. Éste tiene varias formas moleculares diferentes en solución acuosa, incluido el aldehído libre, hemiacetal cíclico, formas poliméricas del hemiacetal, etc. [67] y con estas diferentes formas puede incorporarse a la cadena de la proteína, influyendo de forma determinante en las propiedades finales (Ver Figura 22). Así, por ejemplo, un exceso de GA en el medio (ejemplo: 1%GA) puede hacer que el entrecruzante dimerice y se incorpore al colágeno en forma de una cadena larga lineal que disminuya la rigidez, aumentando la deformabilidad. Esto podría explicar el comportamiento obtenido en los precursores entrecruzados, donde hay un óptimo de rigidez en 0,25%GA. Estudios más detallados deben llevarse a cabo para poder demostrarlo.



Figura 22. Diferentes formas del GA en soluciones acuosas y su forma de enlazar con fibras de colágeno (a) injerto lineal simple (b) injerto ciclado (c) injerto dimerizado lineal [43].

Tener en cuenta todos estos fenómenos pueden explicar por qué todos los factores estudiados influyen en las propiedades mecánicas tal como lo predice la ANOVA y más aún, el por qué hay competencia de fenómenos que dan un punto óptimo en la rigidez de las muestras.



Para estudiar el entrecruzamiento, también se analizó la primera transición térmica de los filmes entrecruzados por DSC (Ver Figura 23 (a)). Al igual que en los resultados del DoE 1, en éste también se dejan ver dos marcadas tendencias en la primera transición de los filmes: todas las muestras con 50%Gly tienen la transición a más baja temperatura, es decir, se mueven antes que aquellas con 20%Gly. Además, la primera transición aparece a más temperatura, entre las análogas del DoE 1 y el DoE 2. Así, por ejemplo, el grupo de muestras con 50%Gly tiene su primera transición cerca de los 50 °C en el DoE 1 y sobre 70 °C en el DoE 2, demostrando la inmovilización que produce el uso de GA en todos los casos. Adicionalmente, en comparación con el DoE 1, todas las endotermas poseen menor área bajo la curva (entalpía), demostrando que el GA ha afectado a la conformación de las cadenas en todos los casos.

Si las endotermas son agrupadas para estudiar el efecto del %GA (Ver Figura 23 (b)), es claro que independientemente del %Gly y de las condiciones de tiempo y temperatura de obtención de los filmes, usar 0,25%GA rigidiza la estructura (mueve la primera transición a más alta temperatura). Sin embargo, si se usa 1%GA, la transición empieza antes y es menos marcada, corroborando que el mecanismo de entrecruzamiento favorece la movilidad y disminuye la rigidez de la muestra.



Figura 23. Endotermas de DSC del DoE 2 de (a) todos los ensayos, (b) ensayos de iguales condiciones variando %GA.

En cuanto al análisis termogravimétrico (Ver Anexo 3) al igual que en el DoE 1, como es de esperar, todas las muestras con 20%Gly muestran una descomposición cercana al 20 % sobre los 250 °C. Análogamente, los porcentajes de descomposición son proporcionales en las muestras con 50%Gly. Sin embargo, comparando el DoE 1 con el DoE 2, se observa que la cantidad de agua absorbida (cantidad de residuo cercano a 100 °C) es inferior que en el DoE 1 (Ver sección de Anexo 2 y Anexo 3). Esto se explica ya que **parte de los grupos hidrofílicos de la proteína están reaccionando con el GA, dando menos oportunidad a la absorción de agua y de plastificante.** Por ello, en general menor cantidad de agua y glicerina presente en las muestras deriva en módulos más altos en comparación con los obtenidos en el DoE 1. También es importante discutir sobre los errores en las medidas de las propiedades mecánicas que pueden deberse a los fenómenos antagónicos y de competencia entre la molécula plastificante y la entrecruzante.

ANOVA obtenida para esta experimentación se presenta en la Tabla 7. Al igual que con el DoE 1, las ecuaciones fueron verificadas y algunas muestras fueron repetidas al azar para su comprobación.



 Tabla 7. Regresiones lineales obtenidas para el DoE 2. Factor A: Porcentaje de Gly (% en masa), Factor B: Temperatura de merclado (%C). Factor C: Porcentaje de GA (%en masa) y Factor D: Tiempo de merclado (min).

| mczeluuo (-e), | | | | | | | |
|--------------------------|--|------------------------|--|--|--|--|--|
| Módulo de Young (MPa) | y= 5633,83 - 114,637·A - 27,421·B - 2225,5·C - 122,287·D + 0,72180 A·B + 47,051·A·C+ 2,7471·A·D+ 5,179·B·C + 0,6807·B·D + 90,386·C·D + 0,25768·A·B·C- 0,022981·A·B·D - 2,11403·A·C·D + 0,48476·B·C·D | R ² = 95,00 | | | | | |
| Esfuerzo Fluencia (%) | y = 32,787 - 16,542·A - 1,687·C - 0,976·D - 1,136·B·C + 1,376·C·D | R ² = 93,36 | | | | | |
| Deformación Fluencia (%) | y = 39,46 + 35,17·A - 2,51·B + 3,42·C- 2,52·A·B + 3,85·A·C + 2,52·B·D + 2,71·A·B·D - 2,88·B·C·D - 2,73·A·B·C·D | R ² = 94,51 | | | | | |
| Esfuerzo Rotura (MPa) | y = 70,54 - 1,0671·A + 0,1754·B - 4,06·C - 0,4590·D - 0,1734·B·C + 0,539·C·D | R ² = 95,71 | | | | | |
| Deformación Rotura (%) | y= -39,62 + 2,289·A | R ² = 96,84 | | | | | |

Finalmente, los diagramas de Contorno (ver Figura 24) que ofrece el Software demuestran que, en todo el espacio estudiado, las propiedades mecánicas de los filmes dependen casi exclusivamente, de la cantidad de plastificante, y en el caso de usar entrecruzante, hay una pequeña interacción entre factores. A bajas concentraciones de %Gly, es donde se ve mayor dependencia con el %GA en el Módulo de Young y el efecto contrario se observa en el caso de la elongación a la rotura.



Figura 24. Diagramas de contorno para la interacción en el %Gly y el %GA en (a) el Módulo de Young y (b) Elongación a la rotura.

5.1.3 Influencia del cambio de pH en el precursor

Finalmente, se ha estudiado la capacidad de modificación de las estructuras del precursor de colágeno cambiando el pH del medio donde se fabricaron los precursores. Los experimentos realizados están descritos en la Tabla 8. Las muestras preparadas contienen 50%Gly, temperatura de 30 °C y 5 min de tiempo de agitado.

| Ex | operimen | tos | Propiedades mecánicas | | | | | |
|-----|----------|--------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--|
| Run | рН | GA (%) | Módulo de Young (MPa) | σ _{Fluencia} (MPa) | ε _{Fluencia} (%) | σ _{Rotura} (MPa) | E _{Rotura} (%) | |
| 1 | | 0,00 | 297,36 ± 65,66 | 17,96 ± 1,55 | 33,05 ± 1,64 | 17,93 ± 1,56 | 33,19 ± 1,65 | |
| 2 | 3 | 0,25 | 298,16 ± 22,50 | 25,49 ± 0,87 | 55,98 ± 0,76 | 25,49 ± 0,86 | 56,00 ± 0,74 | |
| 3 | | 1,00 | 204,33 ± 48,73 | 28,33 ± 1,35 | 63,12 ± 1,67 | 28,33 ± 1,35 | 63,12 ± 1,67 | |
| 4 | | 0,00 | 106,47 ± 27,90 | 17,88 ± 1,53 | 72,06 ± 4,03 | 17,84 ± 1,57 | 72,05 ± 3,98 | |
| 5 | 7 | 0,25 | 140,56 ± 31,57 | 19,77 ± 1,11 | 80,04 ± 8,91 | 19,60 ± 1,02 | 80,25 ± 8,87 | |
| 6 | | 1,00 | 58,79 ± 1,80 | 12,73 ± 1,45 | 92,42 ± 1,32 | 12,46 ± 1,56 | 93,18 ± 1,12 | |
| 7 | | 0,00 | 314,08 ± 46,71 | 25,80 ± 1,56 | 52,00 ± 5,22 | 25,80 ± 1,56 | 51,99 ± 5,21 | |
| 8 | 9 | 0,25 | 324,51 ± 54,96 | 24,51 ± 1,87 | 49,15 ± 12,53 | 24,50 ± 1,89 | 56,13 ± 7,55 | |
| 9 | | 1,00 | 181,15 ± 32,68 | 21,09 ± 1,85 | 61,74 ± 6,75 | 21,08 ± 1,86 | 61,71 ± 6,71 | |

Tabla 8. Propiedades mecánicas de los experimentos de cambio de pH.



Los datos obtenidos fueron tabulados y graficados en la Figura 25 (a) y (b). De nuevo a 0,25%GA, parece existir un óptimo de rigidez según el pH utilizado. Además de este hecho, también se puede observar que las muestras preparadas lejos del punto isoeléctrico de la proteína (como se mencionaba en el estado del arte, es el punto en el cual la carga neta de la proteína es neutra y en este caso, ocurre cuando el pH 7), son más rígidas, independientemente del % de GA.



Figura 25. Curvas esfuerzo deformación para la experimentación del cambio de pH. (a) Módulo de Young y (b) Elongación a la rotura en función de %GA.

Sí se estudian los porcentajes de reticulación obtenidos (Ver Figura 26), se observa que prácticamente los % de reticulación son iguales en todos los casos (salvo en la muestra de 0%GA y pH 7, el blanco). Esto demuestra que no hay ningún tipo de sinergia entre el cambio de pH y el GA y que, además los mecanismos propios de la reticulación que induce el cambio de pH son importantes. No se precisa usar GA para alcanzar porcentajes parecidos de fracción insoluble.



Es significativo mencionar que estudios previos han demostrado que el pH afecta a la solubilidad, a la interacción y a la conformación molecular del colágeno. El efecto del pH sobre las películas de colágeno está relacionado principalmente con el punto isoeléctrico de la proteína [68]. Cuando el colágeno está lejos del punto isoeléctrico, la fuerza de repulsión dentro de la molécula aumenta, lo que hace que la cadena molecular se estire y los grupos internos queden expuestos en la superficie. Los enlaces disulfuro expuestos y los grupos sulfhídrico

reaccionan entre sí, lo que finalmente conduce a un aumento en el grado de reticulación en la película. Esto forma una estructura de red y mejora las propiedades mecánicas de los filmes obtenidos [43]. Estos resultados de reticulación obtenidos mediante el cambio de pH, son más eficientes que el injerto de GA en la estructura.



Además, se sabe que el GA que se pueda injertar responde a un patrón específico según el pH del medio. Así pues, como se muestra en la Figura 27, en **medio ácido el entrecruzamiento es prioritariamente a nivel intermolecular, mientras que en condiciones básicas se da a nivel intramolecular.** Por este motivo, siempre que se esté lejos del punto isoeléctrico, el tipo de entrecruzamiento que se forma es más selectivo ya que en pH 7 ambos mecanismos son posibles, lo que conlleva a una estructura menos ordenada y puede ser el motivo de la menor rigidez (comparar módulo de Young de muestras del 50%Gly de la Tabla 6 y la Tabla 8).



Figura 27. Esquema del entrecruzamiento del GA en cadenas de colágeno dependiendo del pH. En pH ácido se observa que se da a nivel intramolecular, en pH neutro se da tanto a nivel intramolecular como intermolecular y en pH básico a nivel intermolecular [43].

Para demostrar sí las muestras estudiadas respondieron a estas conformaciones, se estudiaron las vibraciones de los enlaces característicos por FTIR. Según la bibliografía, para saber sí se ha mantenido la estabilidad de la estructura de la triple hélice del colágeno después de los tratamientos, es importante estudiar el cociente de absorbancias (AIII/A1450). Esta relación debe ser 1 sí la estructura de triple hélice está intacta y disminuye su valor con la pérdida de la estructura [69].

En la Figura 28 (a), se puede observar que las muestras fuera de su punto isoeléctrico (pH 3 y 9, línea azul y verde, respectivamente) son las que tienen el radio de absorbancia más bajo, demostrando que la triple hélice ha sufrido cambios de conformación. Además, como estas muestras no tienen GA, se observan pocos cambios en la Amina A. En la Figura 28 (b), en presencia de GA, concretamente con 0,25 %, el pico que representa la absorbancia de la Amina A, para las muestras fuera del punto isoeléctrico son iguales entre sí y son menores comparando con la del pH 7.



Figura 28. Espectros de FTIR de las muestras entrecruzadas con cambios de pH (a) muestras con 0%GA con diferentes pH (b) muestras con 0,25 %GA y diferentes pH *Las muestras estudiadas se obtuvieron a la misma temperatura (30 ºC) y tiempos de mezclado (20 min).



Finalmente, los resultados demostraron que basta con alejar a la proteína de su punto isoeléctrico para mejorar la rigidez de los filmes de colágeno, basado en el cambio de conformación que presentan. Adicionalmente, no hubo sinergia de los cambios de pH con el %GA para mejorar el entrecruzamiento y con ello las propiedades de los filmes.

5.2 Estudio de la estructura celular

Una vez conocidas las variables que regulan el comportamiento mecánico de los filmes, se eligieron las muestras representativas para hacer el estudio del espumado (Ver Tabla 9). Se priorizaron las muestras con mayor movilidad (50%Gly) debido a su comportamiento mecánico en tracción, capaz de soportar mejor los esfuerzos en la expansión.

| Run | | Experimentos* | Gly (%) | GA (%) | рН | | | |
|--------------|----|---------------|---------|--------|----|--|--|--|
| Efecto de | 1 | 20% Gly | 20 | 0,00 | 7 | | | |
| %Gly | 2 | 50% Gly | 50 | 0,00 | 7 | | | |
| Efecto do | 3 | 0% GA | 50 | 0,00 | 7 | | | |
| | 4 | 0,25% GA | 50 | 0,25 | 7 | | | |
| 76 GA | 5 | 1% GA | 50 | 1,00 | 7 | | | |
| Efecto del | 6 | рН 3 | 50 | 0,00 | 3 | | | |
| Electo del | 7 | рН 7 | 50 | 0,00 | 7 | | | |
| рп | 8 | рН 9 | 50 | 0,00 | 9 | | | |
| Efecto | 9 | 0,25%GA, pH 3 | 50 | 0,25 | 3 | | | |
| combinado | 10 | 0,25%GA, pH 7 | 50 | 0,25 | 7 | | | |
| pH+GA | 11 | 0,25%GA, pH 9 | 50 | 0,25 | 9 | | | |

Tabla 9. Muestras elegidas para el proceso de espumado.

*(Todas las muestras fueron obtenidas con 20 min y 30 °C de mezclado).

5.2.1 Influencia del proceso de espumado

5.2.1.1 Efecto del CO₂ en la estructura del colágeno y el efecto del medio de expansión

La presencia combinada de dióxido de carbono y agua a las presiones de saturación conduce a la formación de ácido carbónico (Ver Figura 29) y, consecuentemente, una disminución sustancial del pH del medio. Este cambio de pH produce, como ya se ha descrito, que la estructura del colágeno cambie. Adicionalmente, **Casali y colaboradores [70] sugirieron que en condiciones de sCO₂, pueden ocurrir escisiones de cadena de la fibra de la proteína, es decir, perdidas de peso molecular. El grupo de investigación donde se ha llevado a cabo este trabajo demostró, con ensayos de electroforesis, las condiciones en las que esto ocurre (trabajo en vías de publicación).**

 $CO_2 + H_2O \longrightarrow H_2CO_3 \longrightarrow HCO_3^- + H_3O^+$

Figura 29. Reacción del CO₂ con el agua. Como producto se obtiene ácido carbónico y consecuentemente el pH del medio se vuelve ácido.

Gracias a este conocimiento previo, se sabe que durante la fase de saturación en el gas hay pérdida de peso molecular y desnaturalización de los precursores usados. Este efecto probablemente ocurrirá en diferente medida, puesto que cada uno de los filmes posee una movilidad y una conformación inicial diferente. Cuando se compararon los porcentajes de entrecruzamiento entre los filmes precursores y las espumas finales, se demostró que hay casi un 50 % de aumento de la solubilidad en agua en todas las muestras, es decir el proceso de espumado produce roturas de cadena de la fibra. Estos cambios merecen un estudio más detallado.



Para evidenciar estos cambios, los precursores saturados en el gas también fueron evaluados a través de imágenes de SEM. En la Figura 30, se presenta la evolución de la microestructura de un filme en cada etapa del proceso de espumado. En particular, en la Figura 30 (a) se muestra el precursor original y en la Figura 30 (b) el mismo precursor después de la saturación en gas. Se observaron delaminaciones y formación de pequeñas cavitaciones en este último, lo que apoya el efecto, antes mencionado, en la etapa de saturación de los filmes.

Por este motivo, las estructuras celulares estudiadas fueron espumadas en horno a 90 °C. El resto de las micrografías, para todas las muestras estudiadas, se encuentran en el Anexo 6 y presentan el mismo comportamiento en todos los casos.



Figura 30. Micrografías de SEM de la muestra obtenida con 50%Gly, 0,25 %GA, pH 3 en cada etapa del proceso de espumado (a) Precursor original, (b) Etapa de saturación en gas, (c) Expansión en agua, (d) Expansión en horno.

Finalmente, un ejemplo de los materiales celulares obtenidos macroestructuralmente se muestra en la Figura 31 (a), y la evidencia del colapso de la estructura de una muestra espumada en agua (Figura 31 (b)) con respecto a una espumada en horno agua (Figura 31(c)).



Figura 31. (a) Distintas espumas de colágeno espumadas en horno, (b) muestra 50%Gly, 0,25 %GA, pH 3 espumada en agua y (c) espumada en horno.

Por otra parte, durante los experimentos de solubilidad de CO₂ en las muestras de colágeno, los resultados obtenidos no siguieron la tendencia comúnmente observada en otros materiales, como los polímeros convencionales, **donde es posible determinar el porcentaje de CO₂ en una muestra saturada mediante la extrapolación de una línea recta basada en la pérdida de masa** (ver sección experimental). En contraste, los filmes de colágeno mostraron una masa constante o incluso un aumento de masa en comparación con las mediciones iniciales previas al ensayo de saturación.



Este comportamiento atípico puede explicarse por varios factores. Durante el proceso de saturación en el autoclave, la humedad presente en las muestras es extraída, mientras que el colágeno comienza a absorber CO₂. La cantidad de CO₂ absorbida por las muestras es inferior a la cantidad de humedad extraída. Como resultado, al despresurizar, el CO₂ escapa rápidamente de las muestras y estas comienzan a reabsorber humedad del ambiente. Este ciclo de pérdida y reabsorción de humedad podría ser la razón por la que la balanza indica una ganancia de masa después de la saturación con CO₂.

Además, este fenómeno también podría explicar por qué las muestras desarrollan una estructura celular tras la fase de espumado en el horno. La rápida desorción del CO₂ durante la despresurización y la posterior reabsorción de humedad pueden inducir cambios estructurales que faciliten la formación de celdas dentro de la matriz de colágeno. Todos estos fenómenos necesitan un estudio más profundo.

Por último, lo que se puede demostrar con ensayos de calorimetría es que, en comparación con los filmes precursores, el colágeno ha perdido totalmente su estructura en los materiales celulares: no es posible ver ninguna transición térmica, lo que habla de una estructura totalmente desnaturalizada. (Ver líneas azules oscuras totalmente planas, correspondientes a los materiales celulares, en la Figura 32). Esto demuestra el impacto que tiene el proceso de espumado en las cadenas de la proteína.



Figura 32. Comparativa de los DSC del material celular y del precursor.

5.2.2 Influencia del tipo de precursor

En último lugar, se ha realizado una evaluación de las características de las espumas obtenidas y su relación con las propiedades del filme precursor. En la Figura 33 se muestra una representación gráfica de cómo cada factor condicionante de las propiedades mecánicas del precursor, (%Gly, %GA, pH y la combinación pH+GA) pueden afectar a la microestructura celular obtenida. Adicionalmente, en la Figura 34 (a) se grafican los tamaños medios de los poros grandes y de los poros pequeños obtenidos, además de la densidad relativa. Finalmente, en el Anexo 7 se muestran los histogramas detallados de dónde fueron extraídos los datos graficados.



Al evaluar las micrografías, se ha obtenido que en el primer caso (Efecto del %Gly, Figura 33 (a)) tener un precursor con suficiente movilidad y capacidad de elongación, es decir, con mayor cantidad de plastificante (50%Gly), mejora la estructura celular en términos de disminuir en un 80 % la densidad relativa, frente a un 40 % cuando se usa 20%Gly (Ver Figura 34 (a)). En contra parte, esta movilidad aumenta los tamaños de poros. Se podría pensar que, a mayor cantidad de glicerina, mayor es la absorción de CO₂, pero este último punto no se pudo demostrar.



Figura 33. Imágenes SEM de las muestras espumadas junto con sus propiedades mecánicas, donde M es Módulo de Young y E es Elongación de rotura.

En cuanto a la cantidad de GA (ver Figura 33 (b)), la estructura celular es acorde a lo esperado. A mayor rigidez del precursor (obtenida en el óptimo de 0,25%GA), mayores dificultades para expandir. La mayor elongación de los filmes, ya sea por el bajo porcentaje de reticulación (0%GA) o por el mecanismo de reticulación inducido por la formación de puentes de aldehído de cadena larga (1%GA), son los responsables de mayor nucleación y disminución de las densidades (ver Figura 34 (a)), siendo destacable el material con 1%GA, cuyo equilibrio entre el tipo de reticulación y la capacidad de deformación, muestra mayor densidad de nucleación y una estructura más homogénea.



En cuanto al efecto del pH, en el contexto de la discusión mostrada en el apartado anterior, el precursor que se ha obtenido fuera de su punto de equilibrio (pH ácidos o básicos) tiene una estructura más ordenada y selectiva, y en consecuencia mayor densidad de nucleación es observada en las muestras con pH 3 y pH 9 (Ver Figura 33 (c)). Además, el mecanismo de entrecruzamiento de estas muestras aumenta su rigidez.

Finalmente, en la Figura 33 (d) se observa, de nuevo, que no hay sinergias entre usar cambios de pH y GA, para obtener una estructura celular más uniforme. De hecho, existe una menor disminución de la densidad (Ver Figura 34 (a)). Además, a igualdad de propiedades mecánicas de los precursores (ejemplo: muestra con pH:9 y pH:9+0,25%GA), la estructura celular es diferente debido principalmente a la diferencia entre los mecanismos de reticulación que poseen.

Es importante mencionar que la relación de la configuración del precursor y la absorción del CO_2 no pudo ser encontrada. Aun así, tiene un importante papel en estas estructuras que debe considerarse.

Por último, se han hallado las durezas de todos estos materiales celulares, como una medida macroscópica de sus comportamientos mecánicos. Los resultados comparativos entre el sólido (filmes precursores) y las estructuras celulares finales (espumas) se graficaron en la Figura 34 (b). Tanto estos resultados, como los de los tamaños de poros y la densidad (Figura 34 (a)), demuestran que el estudio que se ha llevado a cabo dentro de la ventana de condiciones experimentales elegidas, aunque involucran importantes cambios estructurales en la proteína (en cada etapa del proceso de espumado), en conjunto, muestran resultados finales micro y macroestructurales muy parecidos entre las muestras estudiadas (considerando los errores experimentales involucrados en los tamaños de partículas, las densidades y las durezas). **Esto es debido, posiblemente, a la complejidad de la estructura proteica, a su aleatoriedad y a que muchos efectos son antagónicos.** Aun así, es muy prometedor que con un 80 % de disminución de densidad relativa, los materiales celulares de colágeno obtenidos apenas pierden dureza con respecto a su precursor (ver Figura 34 (b)), algo que no es habitual en polímeros convencionales y que abre una oportunidad para seguir indagando en su conformación y aplicaciones.







6 Conclusiones

El objetivo general de esta investigación fue estudiar las condiciones (tipo de precursor y parámetros experimentales) que afectan a la estructura celular de materiales basados en colágeno, obtenidos mediante la técnica de espumado por disolución de gas. Para ello el estudio se llevó a cabo en dos etapas: la primera de ellas estaba relacionada con encontrar la relación entre los parámetros experimentales de obtención y las propiedades mecánicas finales de los filmes de colágenos, necesario para la fase de espumado.

En esta etapa se encontró que el proceso de plastificación es el factor más significativo sobre las propiedades mecánicas de los filmes: a mayor cantidad de glicerina menor rigidez y mayor capacidad de deformación. En el proceso de entrecruzamiento intervienen todos los factores, destacando de nuevo, la cantidad de plastificante por encima de todos. El óptimo de rigidez se obtiene con una concentración intermedia de 0,25% GA y mayor tiempo de mezclado. Sin embargo, mayor concentración de GA no implica mayor rigidez debido a los diferentes tipos de mecanismos de entrecruzamiento que se dan. En cuanto al cambio de pH en el medio de obtención del filme, es importante destacar que, la proteína lejos de su punto isoeléctrico activa mecanismos de auto entrecruzamiento y éstos son más selectivos que los inducidos por el entrecruzante químico. No se encontró ninguna sinergia en el uso de los dos tipos de entrecruzante simultáneamente (GA + pH).

En cuanto a la segunda etapa, se ha encontrado que los precursores de colágeno son sensibles a las distintas fases del proceso de espumado: en la fase de saturación se demostró que debido a la presencia de CO₂ y agua hay una disminución del pH que provoca la desnaturalización del colágeno y la pérdida de peso molecular. Como consecuencia, en la muestra saturada aumenta la solubilidad en agua. Por lo tanto, en la fase de espumado se evita espumar en agua, pues la estructura celular colapsa. Por ello, es recomendable realizar el espumado en un horno, estudiar otro gas de saturación u otras condiciones más suaves de presión y temperatura.

Finalmente, los resultados microestructurales de las espumas demostraron que la ventana experimental en la que se realizó el estudio, no ha permitido ver cambios sustanciales en las espumas finales (tamaño de celda, densidad relativa, etc.). Aun así, algunas diferencias se pueden observar cómo mayor densidad de nucleación y mayor homogeneidad en las muestras entrecruzadas con cambio de pH o mayor formación de poros con el uso de más plastificante (muestras menos rígidas).

Aun así, sorprende que en la mayoría de los casos se consigue reducir en un 80 % la densidad relativa sin apenas perder propiedades mecánicas en las espumas, en comparación con los precursores. No se debe olvidar la importante pérdida de peso molecular que han sufrido las muestras y que debe ser el punto de partida para el rediseño del proceso de espumado.

En conclusión, las estructuras celulares resultantes son muy interesantes para futuras aplicaciones en embalajes alimentarios e industriales debido a la baja densidad relativa obtenida sin pérdida de propiedades, lo que habla no solo de obtener materiales biobasados, sino de hacer diseños con menor cantidad de material.

Trabajos futuros

Debido a las limitaciones de tiempo, este trabajo ha dejado muchas puertas abiertas para seguir la investigación. Entre ellas, se puede mencionar: conocer mejor los mecanismos físicos y químicos de entrecruzamiento del colágeno, dilucidar con mayor claridad y evidencia el efecto del CO₂ en la estructura de esta proteína y entender cómo poca absorción del gas permite un proceso de espumado tan efectivo, etc. Además, queda por delante muchas pruebas de compatibilidad de estos filmes y espumas en el sector alimentario (propiedades barrera, durabilidad, antimicrobianos, etc.).



7 Glosario

DSC. Calorimetría de barrido diferencial. TGA. Análisis termogravimétrico. SEM. Microscopia electrónica de barrido. ANOVAS. (Análisis de varianza). SFF. Fabricación de forma libre sólida. **DoE-FCC.** Diseño de Experimentos-de tipo Factoriales Completos. **GA.** Glutaraldehído. Gly. Glicerina. sCO₂. CO₂ (dióxido de carbono) en estado supercrítico. PVA. Acetato de polivinilo. PLA. Ácido Poliláctico. PLGA. (Ácido poliláctico-co-glicólico). P_{DL}LA. Poli(ácido D,L-láctico). PHA. Polihidroxiácido. PHB. Polihidroxibutirato. **PM**. Peso molecular.



8 Bibliografía

- [1] Redacción Interempresas, «El mercado mundial de biopolímeros 2019: turbulento y en crecimiento», 27 de abril de 2020. Accedido: 13 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.interempresas.net/Plastico/Articulos/300522-mercado-mundial-polimeros-biologicos-2019-vision-mercado-turbulento-crecimiento.html
- [2] T. Narancic, F. Cerrone, N. Beagan, y K. E. O'Connor, «Recent Advances in Bioplastics: Application and Biodegradation», *Polymers (Basel)*, vol. 12, n.º 4, p. 920, abr. 2020, doi: 10.3390/polym12040920.
- [3] A. Di Bartolo, G. Infurna, y N. T. Dintcheva, «A Review of Bioplastics and Their Adoption in the Circular Economy», *Polymers (Basel)*, vol. 13, n.º 8, p. 1229, abr. 2021, doi: 10.3390/polym13081229.
- [4] A. T. Williams y N. Rangel-Buitrago, «The past, present, and future of plastic pollution», *Mar Pollut Bull*, vol. 176, mar. 2022, doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.113429.
- [5] L. Mejía García y A. Real, «Cronología del vertido de 'pellets' en las playas de Galicia: del accidente del 8 de diciembre a la expansión a otras comunidades», Newtral, 11 de enero de 2024. Accedido: 13 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: https://www.newtral.es/cronologia-pellets-galicia/20240111/
- [6] W. L. Filho *et al.*, «An assessment of attitudes towards plastics and bioplastics in Europe», *Science of the Total Environment*, vol. 755, feb. 2021, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142732.
- [7] L. K. Blight y A. E. Burger, «Occurrence of plastic particles in seabirds from the eastern North Pacific», *Mar Pollut Bull*, vol. 34, n.º 5, pp. 323-325, 1997, doi: https://doi.org/10.1016/S0025-326X(96)00095-1.
- [8] U. KC, A. EO, O. KE, y N. N, «Environmental and public health impacts of plastic wastes due to healthcare and food products packages: A Review», *Journal of Environmental Science and Public Health*, vol. 05, n.º 01, 2021, doi: 10.26502/jesph.96120114.
- [9] N. Parashar y S. Hait, «Plastics in the time of COVID-19 pandemic: Protector or polluter?», Science of The Total Environment, vol. 759, p. 144274, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144274.
- [10] J. Liu, A. D. Vethaak, L. An, Q. Liu, Y. Yang, y J. Ding, «An Environmental Dilemma for China During the COVID-19 Pandemic: The Explosion of Disposable Plastic Wastes», *Bull Environ Contam Toxicol*, vol. 106, n.º 2, pp. 237-240, 2021, doi: 10.1007/s00128-021-03121-x.
- [11] C. J. Rhodes, «Plastic Pollution and Potential Solutions», *Sci Prog*, vol. 101, n.º 3, pp. 207-260, sep. 2018, doi: 10.3184/003685018X15294876706211.
- [12] Ezgi Bezirhan Arikan y Havva Duygu Ozsoy, «A Review: Investigation of Bioplastics», Journal of Civil Engineering and Architecture, vol. 9, n.º 2, feb. 2015, doi: 10.17265/1934-7359/2015.02.007.
- G. T. Köse *et al.*, «Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices», *Biomaterials*, vol. 26, n.º 25, pp. 5187-5197, sep. 2005, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2005.01.037.



- [14] D. Zhang, X. Wu, J. Chen, y K. Lin, «The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration», *Bioact Mater*, vol. 3, n.º 1, pp. 129-138, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.08.004.
- [15] X. Zhao *et al.*, «Collagen based film with well epithelial and stromal regeneration as corneal repair materials: Improving mechanical property by crosslinking with citric acid», *Materials Science and Engineering: C*, vol. 55, pp. 201-208, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.05.030.
- [16] D. Hoc y D. Haznar-Garbacz, «Foams as unique drug delivery systems», European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, vol. 167, pp. 73-82, oct. 2021, doi: 10.1016/J.EJPB.2021.07.012.
- [17] J. Engel y H. P. Bächinger, «Structure, Stability and Folding of the Collagen Triple Helix», en Collagen: Primer in Structure, Processing and Assembly, J. Brinckmann, H. Notbohm, y P. K. Müller, Eds., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005, pp. 7-33. doi: 10.1007/b103818.
- B. Brodsky y J. A. M. Ramshaw, «The collagen triple-helix structure», *Matrix Biology*, vol. 15, n.º 8-9, pp. 545-554, mar. 1997, doi: 10.1016/S0945-053X(97)90030-5.
- [19] K. Adamiak y A. Sionkowska, «Current methods of collagen cross-linking: Review», *Int J Biol Macromol*, vol. 161, pp. 550-560, oct. 2020, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.06.075.
- [20] C. C. Silva *et al.*, «Effect of the pH on the piezoelectric properties of collagen films», *Materials Science and Engineering: B*, vol. 83, n.° 1-3, pp. 165-172, jun. 2001, doi: 10.1016/S0921-5107(01)00520-7.
- [21] H. Tai, V. K. Popov, y K. M. Shakesheff, «Putting the fizz into chemistry: applications of supercritical carbon dioxide in tissue engineering, drug delivery and synthesis of novel block copolymers». Portland Press Ltd., 2007. doi: http://dx.doi.org/10.1042/BST0350516.
- [22] H. Ventura, L. Sorrentino, E. Laguna-Gutierrez, M. Rodriguez-Perez, y M. Ardanuy, «Gas Dissolution Foaming as a Novel Approach for the Production of Lightweight Biocomposites of PHB/Natural Fibre Fabrics», *Polymers (Basel)*, vol. 10, n.º 3, p. 249, feb. 2018, doi: 10.3390/polym10030249.
- [23] F. Dehghani y N. Annabi, «Engineering porous scaffolds using gas-based techniques», Curr Opin Biotechnol, vol. 22, n.º 5, pp. 661-666, oct. 2011, doi: 10.1016/J.COPBIO.2011.04.005.
- [24] H. H. J. de Jongh, «Chapter III Globular proteins», 2003, pp. 31-86. doi: 10.1016/S0921-0423(03)80003-5.
- [25] M. Victoria y L. Guillén, «ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS Máster Ingeniería Biomédica», 2009. Accedido: 13 de junio de 2024. [En línea]. Disponible en: http://www. uv. es/tunon/pdf_doc/proteinas_09. pdf.
- [26] P. K. Bhagwat y P. B. Dandge, «Collagen and collagenolytic proteases: A review», *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 15, pp. 43-55, jul. 2018, doi: 10.1016/j.bcab.2018.05.005.
- [27] A. Sionkowska, S. Skrzyński, K. Śmiechowski, y A. Kołodziejczak, «The review of versatile application of collagen», *Polym Adv Technol*, vol. 28, n.º 1, pp. 4-9, ene. 2017, doi: 10.1002/pat.3842.



- [28] A. León-López, A. Morales-Peñaloza, V. M. Martínez-Juárez, A. Vargas-Torres, D. I. Zeugolis, y
 G. Aguirre-Álvarez, «Hydrolyzed Collagen—Sources and Applications», *Molecules*, vol. 24, n.°
 22, p. 4031, nov. 2019, doi: 10.3390/molecules24224031.
- [29] M. Zhang, Y. Chen, G. Li, y D. Zongliang, «Rheological properties of fish skin collagen solution: Effects of temperature and concentration», *Korea Australia Rheology Journal*, vol. 22, pp. 119-127, jun. 2010.
- [30] E. H. IMMERGUT y H. F. MARK, «Principles of Plasticization», en <bold>Plasticization</bold> and Plasticizer Processes, vol. 48, en Advances in Chemistry, vol. 48., AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 1965, pp. 1-26. doi: doi:10.1021/ba-1965-0048.ch001.
- [31] S. Maria Martelli, G. Moore, S. Silva Paes, C. Gandolfo, y J. B. Laurindo, «Influence of plasticizers on the water sorption isotherms and water vapor permeability of chicken feather keratin films», *LWT - Food Science and Technology*, vol. 39, n.° 3, pp. 292-301, abr. 2006, doi: 10.1016/j.lwt.2004.12.014.
- [32] J.-H. Lee, J. Lee, y K. Bin Song, «Development of a chicken feet protein film containing essential oils», *Food Hydrocoll*, vol. 46, pp. 208-215, abr. 2015, doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.12.020.
- [33] J.-L. Audic y B. Chaufer, «Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate», *Eur Polym J*, vol. 41, n.º 8, pp. 1934-1942, ago. 2005, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2005.02.023.
- [34] C. Mangavel, J. Barbot, J. Guéguen, y Y. Popineau, «Molecular Determinants of the Influence of Hydrophilic Plasticizers on the Mechanical Properties of Cast Wheat Gluten Films», J Agric Food Chem, vol. 51, n.º 5, pp. 1447-1452, feb. 2003, doi: 10.1021/jf0257704.
- [35] O. Orliac, A. Rouilly, F. Silvestre, y L. Rigal, «Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins», *Ind Crops Prod*, vol. 18, n.º 2, pp. 91-100, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S0926-6690(03)00015-3.
- [36] S. J. Calva-Estrada, M. Jiménez-Fernández, y E. Lugo-Cervantes, «Protein-Based Films: Advances in the Development of Biomaterials Applicable to Food Packaging», Food Engineering Reviews, vol. 11, n.º 2, pp. 78-92, jun. 2019, doi: 10.1007/s12393-019-09189-w.
- [37] M. Wihodo y C. I. Moraru, «Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review», *J Food Eng*, vol. 114, n.º 3, pp. 292-302, feb. 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.08.021.
- [38] H. M. C. Azeredo y K. W. Waldron, «Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact – A review», *Trends Food Sci Technol*, vol. 52, pp. 109-122, 2016, doi: https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008.
- [39] K. Faraj *et al.*, «The Effect of Ethylene Oxide Sterilisation, Beta Irradiation and Gamma Irradiation on Collagen Fibril-Based Scaffolds», *Tissue Engineering and Regenerative Medicine TISSUE ENG REGEN MED*, vol. 8, pp. 460-470, oct. 2011.
- [40] C. Xu *et al.*, «Effects of γ-ray irradiation on the molecular structure of collagen in different product forms», *New Journal of Chemistry*, vol. 47, n.° 10, pp. 4964-4972, 2023, doi: 10.1039/D2NJ04259B.



- [41] K. S. Weadock, E. J. Miller, L. D. Bellincampi, J. P. Zawadsky, y M. G. Dunn, «Physical crosslinking of collagen fibers: Comparison of ultraviolet irradiation and dehydrothermal treatment», J Biomed Mater Res, vol. 29, n.º 11, pp. 1373-1379, nov. 1995, doi: 10.1002/jbm.820291108.
- [42] X. Xia, «Protein isoelectric point», *Bioinformatics and the Cell: Modern Computational Approaches in Genomics, Proteomics and Transcriptomics*, pp. 207-219, 2007, doi: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-71337-3_10.
- [43] T. Zhang, Z. Yu, Y. Ma, B.-S. Chiou, F. Liu, y F. Zhong, «Modulating physicochemical properties of collagen films by cross-linking with glutaraldehyde at varied pH values», *Food Hydrocoll*, vol. 124, p. 107270, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107270.
- [44] M. M. Alves, M. P. Gonçalves, y C. M. R. Rocha, «Effect of ferulic acid on the performance of soy protein isolate-based edible coatings applied to fresh-cut apples», *LWT*, vol. 80, pp. 409-415, jul. 2017, doi: 10.1016/J.LWT.2017.03.013.
- [45] E. Sachlos, N. Reis, C. Ainsley, B. Derby, y J. T. Czernuszka, «Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication», *Biomaterials*, vol. 24, n.° 8, pp. 1487-1497, 2003, doi: https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00528-8.
- [46] S. K. Ramadass, S. Perumal, A. Gopinath, A. Nisal, S. Subramanian, y B. Madhan, «Sol–Gel Assisted Fabrication of Collagen Hydrolysate Composite Scaffold: A Novel Therapeutic Alternative to the Traditional Collagen Scaffold», ACS Appl Mater Interfaces, vol. 6, n.º 17, pp. 15015-15025, sep. 2014, doi: 10.1021/am502948g.
- [47] Y. Koo y G. Kim, «An Approach for Fabricating Hierarchically Porous Cell-Laden Constructs Utilizing a Highly Porous Collagen-Bioink», Adv Funct Mater, feb. 2024, doi: 10.1002/adfm.202316222.
- [48] S. Barroso-Solares, D. Cuadra-Rodriguez, M. L. Rodriguez-Mendez, M. A. Rodriguez-Perez, y J. Pinto, «A new generation of hollow polymeric microfibers produced by gas dissolution foaming», *J Mater Chem B*, vol. 8, n.º 38, pp. 8820-8829, 2020, doi: 10.1039/D0TB01560A.
- [49] A. Barbetta, A. Carrino, M. Costantini, y M. Dentini, «Polysaccharide based scaffolds obtained by freezing the external phase of gas-in-liquid foams», *Soft Matter*, vol. 6, n.º 20, pp. 5213-5224, 2010, doi: 10.1039/C0SM00616E.
- [50] J. Martín de León, «Understanding the production process of nanocellular polymers based on pmma driven by a homogeneous nucleation», Universidad de Valladolid, 2019. doi: 10.35376/10324/39466.
- [51] H.-M. Lai, K.-R. Lee, C.-C. Tsai, H.-H. Shih, y Y.-C. Chang, «Method for crosslinking porous biodegradable polymers», 30 de diciembre de 2003
- [52] A. Barbetta, G. Rizzitelli, R. Bedini, R. Pecci, y M. Dentini, «Porous gelatin hydrogels by gas-inliquid foam templating», *Soft Matter*, vol. 6, n.º 8, pp. 1785-1792, 2010, doi: 10.1039/B920049E.
- [53] M. Costantini y A. Barbetta, «Gas foaming technologies for 3D scaffold engineering», en Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds: Materials, Technologies, and Applications, Elsevier, 2018, pp. 127-149. doi: 10.1016/B978-0-08-100979-6.00006-9.



- [54] D. Xu, T. Chen, y Y. Liu, «The physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan–gelatin edible films incorporated with the extract from hop plant», *Polymer Bulletin*, vol. 78, n.º 7, pp. 3607-3624, jul. 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03294-1.
- [55] R. Suhag, N. Kumar, A. T. Petkoska, y A. Upadhyay, «Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review», *Food Research International*, vol. 136, p. 109582, oct. 2020, doi: 10.1016/j.foodres.2020.109582.
- [56] M. Tanco, E. Viles Diez, y L. Pozueta, «Diferentes enfoques del diseño de experimentos (DOE)», Memoria Investigaciones en Ingeniería, vol. 0, n.º 7, pp. 29-37, oct. 2009, [En línea]. Disponible en: https://revistas.um.edu.uy/index.php/ingenieria/article/view/269
- [57] J. M. Lynch *et al.*, «Differential scanning calorimetry (DSC): An important tool for polymer identification and characterization of plastic marine debris», *Environmental Pollution*, vol. 346, p. 123607, 2024, doi: https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123607.
- [58] K. R. Rajisha, B. Deepa, L. A. Pothan, y S. Thomas, «9 Thermomechanical and spectroscopic characterization of natural fibre composites», en *Interface Engineering of Natural Fibre Composites for Maximum Performance*, N. E. Zafeiropoulos, Ed., Woodhead Publishing, 2011, pp. 241-274. doi: https://doi.org/10.1533/9780857092281.2.241.
- [59] J. Gómez-Estaca, P. Montero, F. Fernández-Martín, y M. C. Gómez-Guillén, «Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study», *J Food Eng*, vol. 90, n.º 4, pp. 480-486, feb. 2009, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2008.07.022.
- [60] K. C. Nuñez Carrero, L. E. Alonso Pastor, M. Hernández Santana, y J. María Pastor, «Design of self-healing styrene-butadiene rubber compounds with ground tire rubber-based reinforcing additives by means of DoE methodology», *Mater Des*, vol. 221, sep. 2022, doi: 10.1016/j.matdes.2022.110909.
- [61] C. A. Miles, N. C. Avery, V. V. Rodin, y A. J. Bailey, «The Increase in Denaturation Temperature Following Cross-linking of Collagen is Caused by Dehydration of the Fibres», *J Mol Biol*, vol. 346, n.º 2, pp. 551-556, feb. 2005, doi: 10.1016/j.jmb.2004.12.001.
- [62] J. Kopp, M. Bonnet, y J. P. Renou, «Effect of Collagen Crosslinking on Collagen-Water Interactions (A DSC Investigation)», *Matrix*, vol. 9, n.º 6, pp. 443-450, ene. 1990, doi: 10.1016/S0934-8832(11)80013-2.
- [63] N. Aleksy, G. Kermouche, J. M. Bergheau, J. L. Loubet, y S. Pavan, «Mechanical Investigation of the Healing Phenomenon of the PMMA», *International Journal of Material Forming*, vol. 3, n.° S1, pp. 575-578, abr. 2010, doi: 10.1007/s12289-010-0835-8.
- [64] J. Elango, Y. Bu, B. Bin, J. Geevaretnam, J. S. Robinson, y W. Wu, «Effect of chemical and biological cross-linkers on mechanical and functional properties of shark catfish skin collagen films», *Food Biosci*, vol. 17, pp. 42-51, mar. 2017, doi: 10.1016/j.fbio.2016.12.002.
- [65] E. Chiellini, P. Cinelli, E. G. Fernandes, E. R. S. Kenawy, y A. Lazzeri, «Gelatin-based blends and composites. Morphological and thermal mechanical characterization», *Biomacromolecules*, vol. 2, n.º 3, pp. 806-811, 2001, doi: 10.1021/bm015519h.
- [66] A. Sionkowska, «Molecular interactions in collagen and chitosan blends», *Biomaterials*, vol. 25, n.º 5, pp. 795-801, feb. 2004, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00595-7.



- [67] D. T. Cheung y M. E. Nimni, «Mechanism of Crosslinking of Proteins by Glutaraldehyde I: Reaction with Model Compounds», *Connect Tissue Res*, vol. 10, n.º 2, pp. 187-199, ene. 1982, doi: 10.3109/03008208209034418.
- [68] A. H. BRANDENBURG, C. L. WELLER, y R. F. TESTIN, «Edible Films and Coatings from Soy Protein», J Food Sci, vol. 58, n.º 5, pp. 1086-1089, sep. 1993, doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb06120.x.
- [69] M. E. Andrews, J. Murali, C. Muralidharan, W. Madhulata, y R. Jayakumar, «Interaction of collagen with corilagin», *Colloid Polym Sci*, vol. 281, n.º 8, pp. 766-770, ago. 2003, doi: 10.1007/s00396-002-0843-4.
- [70] D. M. Casali, M. J. Yost, y M. A. Matthews, «Eliminating glutaraldehyde from crosslinked collagen films using supercritical CO2», *J Biomed Mater Res A*, vol. 106, n.º 1, pp. 86-94, ene. 2018, doi: 10.1002/jbm.a.36209.



9 Anexo



Anexo 1. Esquema seguido para la evaluación de las propiedades mecánicas.

A) Módulo de Young
 B) Fluencia
 C) Inicio del endurecimiento por deformación
 D)Esfuerzo máximo para el endurecimiento por deformación

| Run | Datos de DSC | | Datos de TGA | | | |
|-----|--------------|-------------------------|--|---|---|--|
| | Tg (⁰C) | ∆H (J·g ⁻¹) | 1º paso T(0ºC-200ºC) Evaporado (%) H ₂ O | 2º paso T(200ºC-300ºC) Evaporado (%) Gly | 3º paso T(300ºC-600ºC) Evaporado (%) | |
| 4 | 93,41 | 374,58 | 8,22 | 21,48 | 51,60 | |
| 1 | 94,81 | 504,20 | 8,46 | 25,77 | 46,14 | |
| 2 | 44,92 | 220,87 | 7,63 | 50,97 | 17,23 | |
| 6 | 47,17 | 105,94 | 9,00 | 51,22 | 28,91 | |
| 3 | 79,34 | 178,48 | 8,15 | 27,25 | 43,73 | |
| 5 | 46,68 | 173,67 | 10,63 | 52,13 | 36,19 | |
| 8 | 72,13 | 309,91 | 12,86 | 20,73 | 51,14 | |
| 7 | 46,62 | 125,40 | 11,84 | 53,50 | 35,00 | |

Anexo 2. Tabla de los datos cuantitativos de los ensayos de DSC y TGA del DoE 1.



| | Datos de DSC | | Datos de TGA | | | |
|-----|---------------------|-------------------------|---------------------------------------|---|---|--|
| Run | T _g (ºC) | ΔH (J·g ⁻¹) | 1º paso T(0ºC-200ºC) Evaporado (%) | 2º paso T(200ºC-300ºC) Evaporado (%) | 3º paso T(300ºC-600ºC) Evaporado (%) | |
| 13 | 92,93 | 25,55 | 8,25 | 17,56 | 59,09 | |
| 6 | 94,48 | 17,77 | 6,95 | 20,96 | 54,79 | |
| 12 | 92,24 | 20,02 | 6,33 | 22,96 | 52,50 | |
| 4 | 105,34 | 27,48 | 6,14 | 19,16 | 55,86 | |
| 1 | 92,97 | 12,98 | 7,21 | 42,27 | 50,86 | |
| 2 | 74,86 | 19,72 | 5,90 | 24,09 | 45,87 | |
| 16 | 95,40 | 29,57 | 9,25 | 11,38 | 59,65 | |
| 10 | 79,68 | 17,21 | 6,19 | 44,59 | 42,48 | |
| 7 | 70,62 | 22,80 | 9,91 | 48,27 | 44,06 | |
| 14 | 108,82 | 26,47 | 9,38 | 18,92 | 52,11 | |
| 9 | 73,93 | 22,80 | 5,36 | 39,42 | 40,69 | |
| 3 | 78,51 | 17,79 | 8,57 | 48,56 | 39,11 | |
| 8 | 103,65 | 28,62 | 6,38 | 12,88 | 58,67 | |
| 15 | 79,76 | 21,65 | 5,78 | 39,27 | 44,56 | |
| 5 | 71,98 | 20,73 | 6,69 | 45,48 | 44,98 | |
| 11 | 72,39 | 24,08 | 5,75 | 41,86 | 41,038 | |

Anexo 3. Tabla de los datos cuantitativos de los ensayos de DSC y TGA del DoE 2.

Anexo 4. Tabla de los datos cuantitativos de los ensayos de DSC y TGA de los experimentos del cambio de pH.

| | Datos de DSC | | Datos de TGA | | | |
|-----|--------------|-------------------------|---------------------------------------|---|---|--|
| Run | Tg (ºC) | ∆H (J·g ⁻¹) | 1º paso T(0ºC-200ºC) Evaporado (%) | 2º paso T(200ºC-300ºC) Evaporado (%) | 3º paso T(300ºC-600ºC) Evaporado (%) | |
| 4 | 47,17 | 26,61 | 0,00 | 61,22 | 28,91 | |
| 5 | 43,93 | 22,80 | 10,36 | 29,42 | 40,69 | |
| 6 | 58,51 | 7,79 | 13,57 | 28,56 | 39,11 | |
| 1 | 47,59 | 8,81 | 18,06 | 22,90 | 32,94 | |
| 2 | 46,80 | 37,99 | 12,03 | 30,92 | 38,41 | |
| 3 | 44,61 | 21,74 | 6,66 | 31,48 | 44,07 | |
| 8 | 49,55 | 21,92 | 6,36 | 28,22 | 45,31 | |
| 9 | 51,65 | 17,41 | 7,47 | 26,53 | 46,33 | |
| 7 | 69,20 | 27,21 | 8,40 | 33,96 | 38,96 | |

| Anexo 5. Tabla de los datos cuantitativos de las densidad | es y tamaños de celda de las muestras espumadas. |
|--|--|
|--|--|

| | ρ _{espuma} (g·cm ⁻³) (±0,001) | ρ _{sólido} (g·cm ⁻³) (±0,001) | ρ _{relativa} (±0,001) | φ _{Grande} (μm) | φ _{Pequeño} (μm) |
|---------------|--|--|--------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 20% Gly | 0,581 | 1,329 | 0,437 | 52,338±19,013 | 1,082±0,739 |
| 50% Gly | 0,292 | 1,313 | 0,222 | 81,950±29,981 | 8,483±3,247 |
| 0% GA | 0,292 | 1,313 | 0,222 | 81,950±29,981 | 8,483±3,247 |
| 0,25% GA | 0,420 | 1,301 | 0,323 | 61,451±43,294 | 34,595±20,111 |
| 1% GA | 0,304 | 1,306 | 0,233 | 65,968±19,781 | 1,524±0,863 |
| рН 3 | 0,240 | 1,309 | 0,183 | 91,497±36,061 | 8,902±4,973 |
| рН 7 | 0,292 | 1,313 | 0,222 | 81,950±29,981 | 8,483±3,247 |
| рН 9 | 0,256 | 1,316 | 0,195 | 85,626±27,036 | 3,763±2,182 |
| 0,25%GA, pH 3 | 0,357 | 1,312 | 0,272 | 82,524±22,979 | 3,607±1,590 |
| 0,25%GA, pH 7 | 0,420 | 1,301 | 0,323 | 61,451±43,294 | 34,595±20,111 |
| 0,25%GA, pH 9 | 0,338 | 1,305 | 0,259 | 84,057±23,097 | 6,361±3,563 |





Anexo 6. Imágenes SEM de la evolución de los filmes en las distintas etapas del proceso de espumado.

| Experimentes | | Imágenes SEM a escala de 500 µm | | | | |
|------------------------|-----------------------|---------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|--|
| | Experimentos | Precursor | Saturado | Espumado agua | Espumado horno | |
| Influencia % Glicerina | 20 % <u>Gly</u> | ρ = 1,327 g/cm ³ | $\rho = 1,304 \text{ g/cm}^3$ The 10 GW HOUSE 50 | $\rho = 1,032 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0,581 \text{ g/cm}^3$ | |
| | 50 % <mark>Gly</mark> | ρ = 1,313 g/cm ³ | $\rho = 0,837 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 1,004 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0.292 \text{ g/cm}^3$ | |
| Influencia % GA | 0 % GA | $\rho = 1,313 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0.837 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 1,004 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0,292 \text{ g/cm}^3$ | |
| | 0,25 % GA | ρ = 1,306 g/cm ³ | ρ = 0,713 g/cm ³ | $\rho = 1,218 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0,304 \text{ g/cm}^3$ | |
| | 1 % GA | $\rho = 1,301 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 1,045 \text{ g/cm}^3$ | ρ=1,116 g/cm ³ | $\rho = 0.420 \text{ g/cm}^3$ | |



Universidad de Valladolid

| Experimentos | | Imágenes SEM a escala de 500 μm | | | | |
|----------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| | Experimentos | Precursor | Saturado | Espumado agua | Espumado horno | |
| Influencia pH | рН 3 | ρ = 1,309 g/cm ³ | ρ = 1,091 g/cm ³ | | $\rho = 0,240 \text{ g/cm}^3$ | |
| | рН 7 | ρ = 1,313 g/cm ³ | $\rho = 0.837 \text{g/cm}^3$ | ρ=1,004 g/cm ³ | $\rho = 0.292 \text{ g/cm}^3$ | |
| | рН 9 | $\rho = 1,316 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0.874 \text{ g/cm}^3$ | ρ=1,173 g/cm ³ | $\rho = 0.256 \text{ g/cm}^3$ | |
| Influencia % GA + pH | 0,25 % GA, pH 3 | ρ = 1,312 g/cm ³ | $\rho=0.846~g/cm^{3}$ | $\rho = 1,020 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0.357 \text{ g/cm}^3$ | |
| | 0,25 % GA, pH 7 | ρ = 1,306 g/cm ³ | $\rho = 0.713 \text{ g/cm}^3$ | ρ=1,218 g/cm ³ | $\rho = 0.304 \text{ g/cm}^3$ | |
| | 0,25 % GA, pH 9 | $\rho = 1,305 \text{ g/cm}^3$ | $\rho = 0.711 \text{ g/cm}^3$ | ρ=1,049 g/cm ³ | $\rho = 0.338 \text{ g/cm}^3$ | |



Anexo 7. Histogramas de la frecuencia relativa de las celdas grandes y pequeñas en función de su

ESTRUCTURAS CELULARES BIOBASADAS A PARTIR DE PROTEÍNAS FIBRILARES DE COLÁGENO

