

Síntesis y Caracterización de Aerogeles de Colágeno para Aplicaciones en Injertos Óseos

Andrés José Flórez Carrillo

Trabajo de Grado Para Optar al Título de Ingeniero Mecánico

Director

Germán Orlando Romero Suarez

PhD (C) Ingeniería Mecánica

Codirector

Diego Fernando Villegas Bermúdez

PhD Ingeniería Mecánica

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Físico mecánicas

Escuela de Ingeniería Mecánica

Ingeniería Mecánica

Bucaramanga

2026

**Dedicatoria**

*A Dios, a mi familia, a mis amigos y a mí mismo.*

*Dedicado a mi yo del pasado, que siempre ha soñado en grande y nunca dejó de luchar  
por sus sueños.*

*Dedicado a mis amigos y mis 'pupilos', que siempre me brindaron la calidez de su apoyo.*

*Dedicado a mi familia, que a su manera me enseñaron a enfrentar todos los retos que  
conlleva la vida.*

*Dedicado a Dios, que si no fuera por Él, los sueños no se podrían hacer realidad.*

***Andrés José Flórez Carrillo***

### Agradecimientos

*Agradezco primeramente a Dios, porque sin Él nada de esto habría sido posible.*

*Agradezco a mi familia: a mis padres, Rosalba y Julio, por su apoyo y amor incondicional; a mi hermana Daniela, por siempre ser esa luz que me guía cuando no veo rumbo; y a mi nona Yolanda.*

*Le agradezco a mi director, el PhD. Germán Orlando Romero Suárez, y a mi codirector, el PhD. Diego Fernando Villegas Bermúdez, por darme la oportunidad y la confianza para llevar a cabo este desafío. Su orientación y conocimientos fueron invaluableles en el desarrollo de cada paso del proyecto.*

*Agradezco a Jairo Mantilla, Daniel Barrera, Cristian Cadena, al profesor Ricardo Jaimes, a la profesora Yaneth Quintero y a Jose Quiñonez, quienes alimentaron mi curiosidad por la investigación y los proyectos, además de ayudarme de la mejor forma posible.*

*Quisiera agradecer a los amigos y compañeros que he ido conociendo a lo largo de la carrera y la vida: Joel, Bryan, David, Tatiana, Jahir, Daniel, Ángel, Yelitza, Alfredo, Majo, Ana, Mateo y Frank, quienes creyeron en mí incluso más de lo que yo mismo lo hacía.*

*Por último, agradezco a la Escuela de Biología por la confianza, a todos los profesores de la Escuela de Ingeniería Mecánica, al CEIAM, al laboratorio de microscopía, a María René, a los señores conserjes y a los administrativos de la escuela, por tantas enseñanzas académicas como para la vida misma.*

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	16
1. Objetivos .....	19
1.1 Objetivo General .....	19
1.2 Objetivos Específicos.....	19
2. Marco Teórico y Estado del Arte.....	20
2.1. Marco Teórico.....	20
2.1.1 Aerogelés: definición y propiedades generales.....	20
2.1.2 Colágeno tipo I: estructura y relevancia biológica .....	21
2.1.3 Aerogelés de colágeno como biomateriales para injertos óseos .....	22
2.1.4 Métodos de síntesis de aerogelés: formación del gel y técnicas de secado .....	23
2.1.5 Técnicas de caracterización de materiales porosos.....	24
2.2 Estado del Arte.....	25
2.2.1 Desarrollo de aerogelés de colágeno para aplicaciones biomédicas.....	25
2.2.2 Refuerzo estructural y funcionalización avanzada .....	26
2.2.3 Fuentes alternativas de colágeno y contexto latinoamericano .....	27
2.2.4 Modelos digitales y homogeneización computacional en biomateriales porosos .....	27
2.2.5 Vacío de conocimiento que justifica el presente estudio .....	28
3. Metodología .....	29
3.1 Enfoque y diseño experimental.....	29
3.2 Materiales y reactivos .....	32

3.3 Extracción y purificación del colágeno tipo I.....	33
3.3.1 Preparación y pretratamiento del tendón .....	33
3.3.2 Desgrasado con acetona.....	34
3.3.3 Digestión enzimática con pepsina.....	34
3.3.4 Purificación por precipitación selectiva.....	35
3.4 Síntesis del aerogel de colágeno mediante el método sol-gel.....	36
3.4.1 Gelificación del colágeno .....	36
3.4.2 Congelación y liofilización .....	38
3.5 Protocolos de caracterización .....	39
3.5.1 Caracterización morfológica mediante SEM y análisis EDS .....	39
3.5.2 Porosimetría digital mediante análisis de imágenes con Fiji.....	41
3.5.3 Ensayos mecánicos de compresión .....	42
3.6 Simulación computacional mediante modelo digital y homogeneización por FFT .....	42
3.6.1 Construcción del modelo digital .....	42
3.6.2 Homogeneización micromecánica por FFT.....	43
3.6.3 Modelos físicos evaluados .....	44
3.6.4 Validación de los resultados computacionales .....	45
4. Resultados y Análisis.....	45
4.1 Síntesis del aerogel: observaciones macroscópicas y comportamiento del material.....	45
4.1.1 Rendimiento del proceso de extracción .....	45
4.1.2 Comportamiento durante la gelificación y el secado.....	46
4.2 Caracterización morfológica y estructural .....	47
4.2.1 Arquitectura porosa observada por SEM.....	47

4.2.2 Interconexión de poros y rugosidad superficial .....	48
4.2.3 Análisis morfométrico cuantitativo de poros mediante Fiji.....	49
4.2.4 Composición elemental por EDS.....	52
4.3 Propiedades simuladas mediante modelo digital y homogeneización FFT .....	54
4.3.1 Construcción y representatividad del modelo digital.....	54
4.3.2 Resultados de la simulación multifísica.....	55
4.3.3 Validación del enfoque computacional y significado de los resultados .....	57
4.4 Análisis integrado: correlación entre morfología, composición y propiedades funcionales ..	58
5. Discusión.....	59
5.1 El colapso estructural como hallazgo central: causas, implicaciones y reencuadre metodológico.....	59
5.2 Interpretación de la arquitectura porosa: entre la limitación del método y el potencial funcional .....	61
5.3 Significado del análisis EDS: confirmación de identidad y alerta de pureza .....	63
5.4 Validez y alcance del enfoque de modelo digital .....	65
5.5 Viabilidad del proceso en contextos de recursos limitados: contribución al desarrollo local de biomateriales .....	67
5.6 Posicionamiento del material obtenido frente a los requerimientos clínicos de un injerto óseo .....	69
5.7 Síntesis crítica: lo que el trabajo aporta y lo que deja abierto .....	70
6. Conclusiones .....	71
6.1 Sobre el cumplimiento del objetivo general .....	71
6.2 Conclusiones derivadas de los objetivos específicos.....	72

6.3 Conclusiones desde la perspectiva de la ingeniería mecánica ..... 74

6.4 Limitaciones fundamentales y su jerarquía..... 76

7. Recomendaciones ..... 77

Referencias Bibliográficas ..... 79

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Definiciones de términos técnicos utilizados en el proyecto (1/3). .....	11
Tabla 2. Definiciones de términos técnicos utilizados en el proyecto (2/3). .....	12
Tabla 3. Definiciones de términos técnicos utilizados en el proyecto (3/3). .....	13
Tabla 4. Las variables controladas durante el proceso .....	30
Tabla 5. Propiedades evaluadas como respuesta al proceso. ....	31
Tabla 6. Variables que no pudieron ser controladas. ....	31
Tabla 7. Parámetros morfométricos registrados en el análisis con Fiji. ....	50
Tabla 8. Composición elemental obtenida por EDS en cuatro puntos de la muestra (% en peso). .....	53
Tabla 9. Comparación de propiedades simuladas con valores reportados en la literatura. ....	55
Tabla 10. Parámetros morfométricos obtenidos. ....	56
Tabla 11. Características presentadas en material obtenido. ....	63

**Lista de Figuras**

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Diagrama de flujo del proyecto. ....	29
Figura 2. Sección B y C del proyecto. ....	30
Figura 3. (A) Pata de res, (B) Tendones extraídos de pata, (C) Tendones en recipiente para su lavado, (D) Tendones cortados en pequeños trozos.....	33
Figura 4. (A) Tendón sumergido en acetona, (B) Tendón depositado en frasco de vidrio, (C) Tendones marcados para almacenamiento en frío, (D) Tendones luego del proceso de liofilización. ....	34
Figura 5. Proceso de extracción: (A) Masa gelatinosa luego de homogenizar, (B) Filtrado por gasas y decantación, (C) Relación 1:10 (peso de enzima/filtrado), (D) Configuración de panel de centrífuga. ....	35
Figura 6. Purificación: (A) Salting out, (B) Filtrado del precipitado con ácido acético, (C) Filtrado por jeringa PVDF. ....	36
Figura 7. Muestras en proceso de lavado: (A) Muestra en primer lavado, (B) Muestra en segundo lavado.....	37
Figura 8. Ajuste de pH de las muestras unificadas luego del lavado.....	37
Figura 9. Modelo SW moldes para ensayos: (A) Microscopía electrónica, (B) compresión. ....	38
Figura 10. Gel en moldes con pH 7,0-7,4. ....	38
Figura 11. Gel en moldes durante proceso de congelación. ....	39
Figura 12. Equipo de metalización Quorum Q150A ES.....	40
Figura 13. Microscopio electrónico Quanta FEG 650.....	40

Figura 14. Micrografía SEM (12000×) utilizada para el análisis morfométrico, con escalas de medición.....	41
Figura 15. Interfaz del software Fiji (ImageJ). .....	42
Figura 16. Clúster de alto rendimiento HPC Guane. ....	44
Figura 17. Aerogel base colágeno.....	46
Figura 18. Micrografías SEM del material pulverulento a diferentes aumentos: (A) 400×, (B) 1600×, (C) 6000×, (D) 12000×.....	47
Figura 19. Ajuste de umbral (threshold) en software Fiji. ....	49
Figura 20. Características de poros en software Fiji.....	50
Figura 21. Resultados de análisis de partículas en software Fiji. ....	51
Figura 22. Puntos de análisis EDS sobre la muestra: (A) zona brillante (alta concentración de sales), (B) zona homogénea (matriz de colágeno), (C) zona homogénea (replicado), (D) zona homogénea (replicado).....	52
Figura 23. Concentración de composición química de zona D. ....	52
Figura 24. Micrografía SEM mostrando regiones brillantes correspondientes a residuos de sales (NaCl) .....	53
Figura 25. (A) Concepto de modelo digital, (B) Modelo digital luego de mallado.....	54
Figura 26. Resultados de la simulación multifísica del modelo digital: (A) conductividad térmica efectiva, (B) módulo de elasticidad, (C) permeabilidad. ....	55

## Glosario

Tabla 1.

Definiciones de términos técnicos utilizados en el proyecto (1/3).

Término	Definición
Aerogel	Material sólido extremadamente ligero y poroso, obtenido al extraer el líquido de un gel sin que su estructura se derrumbe. Se le conoce como "humo congelado" por su apariencia traslúcida y baja densidad.
Alcogel	Gel cuyo líquido interno ha sido reemplazado por etanol. Es una etapa intermedia durante la creación de aerogeles.
Andamio (scaffold)	Estructura tridimensional temporal que sirve como soporte para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, guiando la formación de nuevo tejido.
Angiogénesis	Proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes. Fundamental para que un injerto reciba nutrientes y oxígeno.
BET (método)	Técnica de laboratorio que mide el área superficial de un material poroso mediante la adhesión de moléculas de gas (generalmente nitrógeno) sobre su superficie.
Biocompatibilidad	Capacidad de un material artificial para funcionar dentro del cuerpo sin provocar rechazo, toxicidad o daño en los tejidos circundantes.
Biodegradabilidad	Propiedad de un material para ser descompuesto por microorganismos o enzimas del cuerpo, eliminando la necesidad de una cirugía para retirarlo.
Centrifugación	Técnica que utiliza el giro rápido de una muestra para separar sus componentes por densidad; los elementos más pesados se van al fondo del tubo.
Colágeno tipo I	Proteína estructural más abundante en el cuerpo humano, responsable de la resistencia y organización de tejidos como tendones, piel y huesos.
Criogelación	Proceso en el que un gel se forma durante la congelación de una solución. La formación de cristales de hielo concentra el material sólido y define la estructura porosa final.
Desecador	Recipiente hermético que contiene un agente secante (como gel de sílice) para mantener un ambiente libre de humedad y proteger muestras sensibles.
EDS (Espectroscopía de Energía Dispersiva)	Técnica que identifica los elementos químicos presentes en una muestra analizando los rayos X que emite al ser golpeada por electrones dentro de un microscopio electrónico.

Tabla 2.

Definiciones de términos técnicos utilizados en el proyecto (2/3).

Término	Definición
Entrecruzamiento	Proceso químico que une cadenas de un polímero (como el colágeno) mediante enlaces, aumentando su estabilidad y resistencia mecánica.
Etanol absoluto	Alcohol de alta pureza (más del 99.5%), sin contenido de agua, utilizado en frío para precipitar y deshidratar proteínas como el colágeno.
Fibrilogénesis	Proceso mediante el cual las moléculas de colágeno se ensamblan espontáneamente para formar fibrillas y fibras más gruesas.
Fiji (software)	Distribución del programa ImageJ, de uso libre, especializado en el procesamiento y análisis científico de imágenes, como las obtenidas por microscopía.
Filtro PVDF	Membrana filtrante fabricada con un plástico resistente a solventes (fluoruro de polivinilideno), con poros de 0.22 micrómetros, usada para esterilizar soluciones.
Hidrogel	Red tridimensional de polímeros capaz de retener grandes cantidades de agua o fluidos corporales en su estructura, similar a una gelatina.
Higroscópico	Cualidad de un material que absorbe y retiene la humedad del ambiente. Los aerogel de colágeno requieren protección contra la humedad para no perder su estructura.
ImageJ	Programa de código abierto para el análisis de imágenes científicas. Es una herramienta estándar para medir porosidad a partir de micrografías.
Injerto óseo	Material (natural o sintético) que se implanta en un defecto del hueso para promover su regeneración y reparación.
Liofilización	Método de secado que congela el material y luego, mediante vacío, hace que el hielo se convierta directamente en vapor (sublimación), preservando la estructura porosa.
Macroporo	Poros de gran tamaño (más de 50 nanómetros) que facilitan la entrada de células y la formación de vasos sanguíneos en un andamio para regeneración ósea.
Mapping (EDS)	Técnica que genera un mapa a color de la distribución de elementos químicos sobre la superficie de una muestra analizada por microscopía electrónica.
Mesoporo	Poros de tamaño intermedio (entre 2 y 50 nanómetros), ideales para aplicaciones de liberación controlada de medicamentos.
Método sol-gel	Proceso químico para fabricar materiales en el que una solución líquida ("sol") se transforma gradualmente en una red sólida ("gel") que atrapa el solvente en su interior.

Tabla 3.

Definiciones de términos técnicos utilizados en el proyecto (3/3).

Término	Definición
Microporo	Poros muy pequeños (menores a 2 nanómetros), que se miden con técnicas especiales como la adsorción de gases.
Osteoblasto	Célula especializada en la formación de hueso nuevo. Es la célula clave en los procesos de regeneración ósea.
Osteoconducción	Capacidad de un andamio para servir como "camino" o guía sobre el cual crecen nuevas células óseas.
Osteoinducción	Capacidad de un material para activar células inmaduras y convertirlas en células formadoras de hueso (osteoblastos).
Pepsina	Enzima digestiva que rompe proteínas. En el laboratorio se usa para limpiar el colágeno de otros componentes del tejido conectivo.
pH	Medida de acidez o basicidad de una solución. El colágeno se disuelve en ambientes ácidos (pH bajo), pero forma fibras sólidas a un pH neutro.
Porosidad	Fración del volumen total de un material que está ocupada por espacios vacíos (poros). Se expresa como porcentaje.
Precipitación (salting out)	Técnica de purificación que añade sales (como la sal de mesa) a una solución para "competir" por el agua, forzando a las proteínas a solidificarse y separarse del líquido.
RCF (Fuerza centrífuga relativa)	Medida de la fuerza real que se aplica a una muestra dentro de una centrífuga, expresada en múltiplos de la gravedad terrestre ("xg").
RPM (Revoluciones por minuto)	Unidad que mide la velocidad de giro de un rotor en una centrífuga. Por sí sola no indica la fuerza real aplicada sin conocer el tamaño del rotor.
Salting out	Ver Precipitación.
SEM (Microscopía Electrónica de Barrido)	Técnica que utiliza un haz de electrones, en lugar de luz, para generar imágenes ampliadas y detalladas de la superficie de una muestra.
Sílica gel	Material granular o en perlas con alta capacidad de adsorber humedad, utilizado comúnmente en desecadores para proteger muestras.
Sputter coating	Recubrimiento de la muestra con una capa ultrafina de metal (como oro) para hacerla conductora y evitar que acumule carga eléctrica durante la observación en el microscopio electrónico.
Stub	Pequeño soporte metálico (generalmente de aluminio) sobre el cual se monta la muestra para ser introducida en un microscopio electrónico.
Sublimación	Cambio físico en el que una sustancia pasa directamente del estado sólido al gaseoso, sin pasar por el líquido. Es el principio fundamental de la liofilización.
Ultracongelador	Equipo de laboratorio capaz de alcanzar temperaturas de -80°C o incluso más bajas, usado para congelar rápidamente muestras biológicas y biomateriales.

## Resumen

**Título:** Síntesis y caracterización de Aerogel de colágeno para aplicaciones en injertos óseos \*

**Autor:** Andrés José Flórez Carrillo \*\*

**Palabras Clave:** Innovación, Salud, Diseño, Aerogel, Injerto óseo, Biomecánica.

### Descripción:

El tratamiento de defectos óseos graves mediante sustitutos biológicos supone un gran reto para la ingeniería biomecánica. Los aerogel de colágeno tipo I son candidatos prometedores como andamios para la regeneración ósea debido a su porosidad, biocompatibilidad y capacidad para imitar la matriz extracelular ósea. Sin embargo, su producción mediante secado supercrítico—el método de referencia—requiere equipos de alta presión cuyo coste limita su uso en entornos con recursos limitados, como Colombia. La liofilización es una alternativa técnicamente accesible, pero a menudo da lugar a materiales con menor integridad estructural.

En este estudio, se sintetizaron aerogel de colágeno tipo I a partir de tendón bovino utilizando el método sol-gel con liofilización, empleando equipos disponibles en la Universidad Industrial de Santander. El protocolo de extracción incluyó desengrasado, digestión enzimática con pepsina, precipitación selectiva con NaCl y etanol, y filtración. La solución de colágeno purificada se gelificó a 37 °C en moldes impresos en 3D, se congeló a -80 °C y se liofilizó durante 24-48 horas. El material se colapsó durante el secado, lo que impidió realizar ensayos de compresión convencionales. En respuesta a ello, se implementó un marco de validación dual: caracterización morfológica experimental junto con simulación multifísica mediante modelo digital.

Las micrografías de SEM revelaron una estructura porosa heterogénea (macroporos, mesoporos y microporos) con poros interconectados y una rugosidad superficial adecuada. El análisis EDS confirmó la composición elemental del colágeno tipo I (C: 36,30 %, N: 5,03 %, O: 30,53 %). El análisis morfométrico con Fiji de 261 partículas arrojó un diámetro de Feret medio de  $6,74 \pm 14,23 \mu\text{m}$  y una porosidad del 52,19%. Se construyó un modelo digital de  $204 \times 188 \times 204$  vóxeles y se analizó mediante homogeneización FFT en el clúster HPC GUANE, prediciendo una conductividad térmica de 0,084 W/(m·K), un módulo elástico de 22,94 MPa y una permeabilidad de  $3,18 \times 10^{-12} \text{ m}^2$ , en consonancia con los rangos de la bibliografía. Este estudio demuestra que la homogeneización computacional FFT aplicada a modelos digitales es una herramienta válida para predecir las propiedades multifísicas de los aerogel cuando el colapso estructural impide la realización de ensayos experimentales.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ingenierías Fisicomecánicas. Escuela de Ingeniería Mecánica. Ingeniería Mecánica.

Director: Germán Orlando Romero Suarez. PhD (C) Ingeniería Mecánica. Codirector: Diego Fernando Villegas Bermúdez. PhD Ingeniería Mecánica.

### Abstract

**Title:** Synthesis and characterization of collagen aerogels for bone graft applications \*

**Author:** Andrés José Flórez Carrillo \*\*

**Key Words:** Innovation, Health, Design, Aerogel, Bone graft, Biomechanics.

#### Description:

The treatment of critical bone defects using biological substitutes represents a major challenge in biomechanical engineering. Type I collagen aerogels are promising candidates for bone regeneration scaffolds due to their porosity, biocompatibility, and ability to mimic bone extracellular matrix. However, their production via supercritical drying, the reference method, requires high-pressure equipment whose cost limits its use in resource-constrained settings like Colombia. Freeze-drying is a technically accessible alternative but often results in materials with lower structural integrity.

In this study, type I collagen aerogels were synthesized from bovine tendon using the sol-gel method with freeze-drying, employing equipment available at the Universidad Industrial de Santander. The extraction protocol included degreasing, enzymatic digestion with pepsin, selective precipitation with NaCl and ethanol, and filtration. The purified collagen solution was gelled at 37°C in 3D-printed molds, frozen at -80°C, and freeze-dried for 24-48 hours. The material collapsed during drying, preventing conventional compression testing. In response, a dual validation framework was implemented: experimental morphological characterization coupled with multiphysics simulation via digital model.

SEM micrographs revealed a heterogeneous porous structure (macro, meso, and micropores) with interconnected pores and favorable surface roughness. EDS analysis confirmed the elemental composition of type I collagen (C: 36.30%, N: 5.03%, O: 30.53%). Morphometric analysis with Fiji on 261 particles yielded an average Feret diameter of  $6.74 \pm 14.23 \mu\text{m}$  and porosity of 52.19%. A digital model of  $204 \times 188 \times 204$  voxels was constructed and analyzed via FFT homogenization on the HPC GUANE cluster, predicting thermal conductivity of 0.084 W/(m·K), elastic modulus of 22.94 MPa, and permeability of  $3.18 \times 10^{-12} \text{ m}^2$ , consistent with literature ranges. This study demonstrates that FFT computational homogenization applied to digital models is a valid tool for predicting multiphysics properties of aerogels when structural collapse prevents experimental testing.

---

\* Degree Work

\*\* Faculty of Physical-Mechanical Engineering. School of Mechanical Engineering. Mechanical Engineering. Director: Germán Orlando Romero Suarez. PhD (C) Mechanical Engineering. Codirector: Diego Fernando Villegas Bermúdez. PhD Mechanical Engineering.

## Introducción

El tratamiento de defectos óseos críticos constituye un problema clínico de alta prevalencia e impacto socioeconómico significativo. Aunque el autoinjerto representa el estándar de referencia por su osteoinductividad y biocompatibilidades inherentes, sus limitaciones, entre ellas la morbilidad asociada al sitio donante, el volumen de tejido disponible y el riesgo de infección, han impulsado el desarrollo sistemático de sustitutos óseos de origen sintético y biológico (Giannoudis et al., 2005; Bhatt & Rozental, 2012). En este contexto, los andamios tridimensionales basados en biopolímeros han recibido creciente atención, particularmente aquellos derivados de colágeno tipo I, la proteína estructural más abundante de la matriz extracelular de los tejidos conectivos. Los aerogel de colágeno se destacan por su arquitectura nanoporosa interconectada, su capacidad para promover la adhesión y proliferación de osteoblastos, y por ofrecer señales bioquímicas que favorecen la osteoconducción y la angiogénesis (García-González et al., 2011; Anaya-Barajas et al., 2019; Martins et al., 2015).

No obstante, la viabilidad clínica y el potencial de escalado de estos biomateriales están condicionados por los desafíos técnicos y económicos inherentes a su proceso de síntesis. La preservación de la red nanoporosa durante el secado constituye la etapa más crítica: el método de referencia, el secado supercrítico con CO<sub>2</sub>, elimina las tensiones capilares que provocan el colapso de los poros, pero requiere equipos de alta presión cuyo costo y complejidad operativa restringen su acceso en entornos con recursos limitados (Duarte, 2017; Sachithanadam & Joshi, 2016). La liofilización (freeze-drying) se presenta como una alternativa más accesible; sin embargo, la formación de cristales de hielo durante la congelación puede distorsionar la microestructura del gel, resultando en estructuras de mayor variabilidad morfológica, baja

resistencia mecánica y, en casos donde la concentración de colágeno es insuficiente, en el colapso físico del material durante o tras el secado (Davidenko et al., 2012; Brougham et al., 2017; Gobeaux et al., 2008).

Esta fragilidad estructural representa un obstáculo metodológico mayor: cuando el aerogel colapsa y se presenta en forma pulverulenta, los ensayos mecánicos destructivos convencionales —como la compresión uniaxial bajo norma ASTM D1621— resultan inviables, impidiendo la caracterización biomecánica directa del material. Esta limitación es particularmente crítica en el contexto de validación de materiales para injertos óseos, donde la evaluación del módulo elástico, la permeabilidad al flujo de fluidos biológicos y la conductividad térmica constituyen parámetros funcionales indispensables. Hasta la fecha, la literatura reporta escasos estudios que aborden de forma sistemática esta dicotomía entre la accesibilidad del método de secado y la posibilidad de caracterización mecánica rigurosa del material resultante, especialmente en contextos latinoamericanos con restricciones instrumentales.

Para abordar este vacío, el presente estudio propone un marco de validación dual que integra caracterización morfológica experimental con simulación computacional multifísica. Se sintetizaron aerogel de colágeno tipo I mediante el método sol-gel con secado por liofilización, utilizando tendón bovino como materia prima local, con el objetivo de evaluar su idoneidad estructural y funcional para aplicaciones en regeneración ósea. La caracterización morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis EDS y porosimetría digital con el software Fiji. Dado el colapso físico del material, las propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad se predijeron mediante la construcción de un modelo digital tridimensional —basado en la jerarquía porosa real obtenida de las micrografías SEM— y su posterior análisis por homogeneización micromecánica mediante solucionadores de la Transformada Rápida de

Fourier (FFT). Este enfoque permite demostrar que la caracterización funcional de aerogel es viable incluso bajo restricciones técnicas severas, y establece una base metodológica replicable para el desarrollo de biomateriales accesibles en contextos de recursos limitados.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo General

Sintetizar y caracterizar Aerogel de colágeno para su uso en injertos óseos, evaluando sus propiedades mecánicas y estructurales.

### 1.2 Objetivos Específicos

1. Diseñar un protocolo de síntesis para la producción de Aerogel de colágeno, considerando variables como la concentración de colágeno, el agente de gelificación y el método de secado, con el objetivo de obtener materiales con porosidad controlada y propiedades mecánicas adecuadas para aplicaciones en injertos óseos.
2. Sintetizar el aerogel mediante el método sol-gel por secado liofilizado.
3. Validar la síntesis de aerogel de colágeno mediante un marco de caracterización dual que integra el análisis morfológico y químico experimental microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopía de energía dispersiva (EDS) y porosimetría digital con el software Fiji con la simulación computacional multifísica de las propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad, a partir de la construcción de un modelo digital tridimensional analizado por homogeneización micromecánica mediante solucionadores de la Transformada Rápida de Fourier (FFT), con el fin de confirmar la formación de una estructura porosa y evaluar el desempeño funcional del material aun en condiciones de colapso estructural.

## 2. Marco Teórico y Estado del Arte

### 2.1. Marco Teórico

#### 2.1.1 Aerogel: definición y propiedades generales

Los aerogel son materiales sólidos ultraligeros y altamente porosos obtenidos mediante la sustitución del componente líquido de un gel por un gas, preservando la red tridimensional sólida sin que esta colapse de forma significativa. Su apariencia traslúcida y su baja densidad les han valido denominaciones como "humo congelado" o "humo sólido" en la literatura de divulgación científica. Lo que distingue a los aerogel de otros materiales porosos, como los xerogel, es precisamente el método de secado empleado: mientras que el secado convencional genera tensiones capilares que contraen y colapsan la red porosa, el secado controlado permite conservar la arquitectura interna casi intacta (Aegerter et al., 2011; Duarte, 2017).

Sus propiedades físicas son excepcionales y ampliamente documentadas. En términos de densidad, pueden alcanzar valores tan bajos como  $0,001 \text{ g/cm}^3$ , con hasta un 99,8% de su volumen ocupado por aire, lo que los convierte en los sólidos más ligeros conocidos (Sachithanadam & Joshi, 2016). Su estructura nanoporosa interconectada puede representar más del 90% del volumen total, con áreas superficiales específicas que en algunos casos superan los  $1000 \text{ m}^2/\text{g}$ , lo que los hace candidatos excepcionales para aplicaciones de catálisis, filtración, absorción y liberación controlada de sustancias (Veronovski et al., 2014; García-González et al., 2011). Su estructura porosa a nanoescala también inhibe significativamente la conducción de calor y la convección, confiriéndoles propiedades aislantes térmicas superiores a las de materiales convencionales (Aegerter et al., 2011). Adicionalmente, presentan constantes

dieléctricas bajas, lo que los hace útiles en aplicaciones electrónicas, y una alta capacidad de absorción de líquidos, aceites y sonidos derivada de su gran área superficial.

### ***2.1.2 Colágeno tipo I: estructura y relevancia biológica***

El colágeno es la proteína estructural más abundante en el cuerpo humano y en los mamíferos en general, constituyendo aproximadamente el 30% de la masa proteica total. Entre sus múltiples isoformas, el colágeno tipo I es el predominante en tejidos de alta demanda mecánica como tendones, piel, hueso cortical y córnea. Su estructura se organiza jerárquicamente: tres cadenas polipeptídicas con secuencias repetitivas de glicina-X-Y se enrollan para formar una triple hélice, denominada tropocolágeno, que a su vez se autoensambla en fibrillas y posteriormente en fibras de mayor diámetro mediante un proceso denominado fibrilogénesis (Gómez Lizárraga et al., 2011).

Este proceso de fibrilogénesis es sensible a variables fisicoquímicas del entorno, particularmente al pH y la temperatura. A pH neutro y temperatura fisiológica (37°C), el colágeno tipo I forma espontáneamente una red tridimensional de microfibrillas estabilizada por puentes de hidrógeno y entrecruzamientos covalentes. En condiciones ácidas, por el contrario, las moléculas permanecen solubilizadas, lo que permite su extracción, purificación y manipulación en solución antes de inducir la gelificación de forma controlada (Gobeaux et al., 2008; Inoue et al., 2006; Harris et al., 2017). Esta transición sol-gel dependiente del pH constituye el principio fundamental sobre el que se basa la síntesis de aerogel de colágeno mediante el método sol-gel, descrito en detalle en la sección de metodología.

Desde el punto de vista biológico, el colágeno tipo I es reconocido por el sistema inmunológico humano como material propio, lo que minimiza las respuestas de rechazo. Adicionalmente, presenta sitios de unión específicos, como las secuencias RGD (arginina-

glicina-ácido aspártico), que promueven activamente la adhesión, migración y proliferación de células como los osteoblastos, facilitando la integración del implante con el tejido huésped (Sanzana-Luengo et al., 2022; Anaya-Barajas et al., 2019).

### ***2.1.3 Aerogeles de colágeno como biomateriales para injertos óseos***

Los aerogeles de colágeno representan la intersección entre las propiedades físicas de los aerogeles y la bioactividad intrínseca del colágeno. Su arquitectura porosa jerárquica, que comprende macroporos (>50 nm), mesoporos (2–50 nm) y microporos (<2 nm) distribuidos de forma interconectada, es particularmente relevante para aplicaciones en ingeniería de tejidos óseos por las siguientes razones funcionales.

Los macroporos facilitan la infiltración celular de osteoblastos y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), proceso indispensable para que el implante reciba nutrientes y oxígeno. Los mesoporos y microporos, por su parte, promueven la adhesión celular y el intercambio de metabolitos a escala nanométrica, e incrementan el área superficial disponible para la carga y liberación controlada de agentes terapéuticos como antibióticos, factores de crecimiento óseo (BMPs) o antiinflamatorios (Rivera et al., 2003; Goimil et al., 2017; Veres et al., 2015). La interconexión entre los poros es igualmente crítica: un andamio con compartimentos cerrados impediría la migración celular a través de la estructura, comprometiendo la regeneración tisular (Martins et al., 2015).

La rugosidad superficial inherente de estos materiales imita la topografía natural de la matriz extracelular, lo que favorece la fijación y proliferación de osteoblastos (Sanzana-Luengo et al., 2022). Su biodegradabilidad programable, mediada por colagenasas endógenas, permite sincronizar la degradación del andamio con la velocidad de formación del nuevo tejido óseo. Finalmente, la gran área superficial y la capacidad de funcionalización química del aerogel de

colágeno lo convierten en un sistema versátil de liberación localizada de agentes terapéuticos, mejorando la biodisponibilidad local sin los efectos secundarios sistémicos asociados a la administración convencional (Tkalec et al., 2015; Veres et al., 2015).

#### ***2.1.4 Métodos de síntesis de aerogel: formación del gel y técnicas de secado***

La síntesis de un aerogel es un proceso secuencial en dos etapas fundamentales: la formación de la red sólida tridimensional mediante el método sol-gel, y la eliminación del solvente mediante un método de secado que preserve dicha red.

En la etapa sol-gel, una solución molecular del precursor, en este caso colágeno soluble en ácido acético, transita de un estado coloidal disperso (sol) a una red semisólida que atrapa el solvente en su interior (gel), mediante cambios de pH o temperatura que inducen la fibrilogénesis. Los parámetros críticos de esta etapa son la concentración del precursor, el pH, la temperatura y el tiempo de gelificación, los cuales determinan conjuntamente la densidad y la morfología inicial de la red (Sachithanadam & Joshi, 2016).

La segunda etapa, el secado, es donde se define la calidad final del aerogel. Existen dos métodos principales. El secado supercrítico lleva el solvente del gel a condiciones por encima de su punto crítico de temperatura y presión, eliminando la interfase líquido-vapor y con ella las tensiones capilares destructivas. El fluido supercrítico se libera como gas, dejando una estructura sólida casi idéntica a la del gel húmedo. Este método produce aerogel de máxima porosidad y área superficial, pero requiere equipos especializados de alto costo (autoclaves de alta presión), lo que representa una barrera significativa para su escalado (Duarte, 2017). La liofilización (freeze-drying) congela el gel, convirtiendo el solvente en hielo, que posteriormente se elimina por sublimación directa (sólido a vapor) bajo vacío, evitando la fase líquida. Aunque las tensiones capilares se minimizan al no existir interfase líquido-vapor, la formación de cristales de

hielo durante la congelación puede distorsionar la microestructura, generando poros de mayor tamaño y menor homogeneidad que los obtenidos por secado supercrítico. Su principal ventaja es la accesibilidad: los liofilizadores son equipos comunes en laboratorios biomédicos y su costo operativo es significativamente menor (Davidenko et al., 2012; Brougham et al., 2017).

### ***2.1.5 Técnicas de caracterización de materiales porosos***

La validación de un aerogel de colágeno como candidato para injerto óseo requiere un conjunto de técnicas analíticas complementarias que cubran las escalas morfológica, química y mecánica.

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite visualizar directamente la arquitectura tridimensional superficial e interna del material, evaluando la homogeneidad, tamaño, forma e interconexión de los poros. Para materiales no conductores como el colágeno, es necesario aplicar un recubrimiento metálico delgado (oro o paladio) mediante sputter coating para evitar la acumulación de carga electrostática durante la observación (ASTM E2809-20). La espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), acoplada al SEM, permite determinar la composición elemental del material punto a punto, identificando la presencia de carbono, nitrógeno y oxígeno como elementos característicos del colágeno, así como posibles contaminantes del proceso de purificación.

La porosimetría digital mediante análisis de imágenes con software como Fiji (distribución de ImageJ) permite cuantificar parámetros morfométricos de los poros directamente a partir de las micrografías SEM, incluyendo el diámetro de Feret, la relación de aspecto, la redondez y la solidez. Este método es especialmente útil cuando las técnicas de porosimetría físico-química convencionales, como la adsorción de nitrógeno (método BET) o la intrusión de

mercurio, no son accesibles o son destructivas para el material (Anaya-Barajas et al., 2019; García-González et al., 2011).

Finalmente, los ensayos mecánicos de compresión uniaxial, normados bajo ASTM D1621, permiten determinar el módulo elástico, la resistencia máxima y la energía absorbida hasta la falla del material. Cuando el material no puede ser ensayado experimentalmente debido a su fragilidad o colapso estructural, la simulación computacional por homogeneización micromecánica mediante métodos basados en la Transformada Rápida de Fourier (FFT) constituye una alternativa rigurosa para predecir las propiedades macroscópicas efectivas del material a partir de su microestructura real.

## **2.2 Estado del Arte**

### ***2.2.1 Desarrollo de aerogeles de colágeno para aplicaciones biomédicas***

La investigación sobre aerogeles de colágeno ha experimentado un crecimiento sostenido durante la última década, impulsada por la convergencia entre el avance en técnicas de síntesis de aerogeles y la demanda clínica de andamios biodegradables para regeneración tisular. Los trabajos seminales en este campo establecieron que la porosidad jerárquica y la interconexión de poros son condiciones necesarias, aunque no suficientes, para el desempeño funcional del andamio: la concentración inicial del colágeno, el método de secado y las condiciones de gelificación determinan conjuntamente la morfología final del material y, con ella, sus propiedades biológicas y mecánicas (García-González et al., 2011; Davidenko et al., 2012).

En cuanto al método de secado, la literatura reporta de forma consistente que el secado supercrítico produce aerogeles con mayor homogeneidad y porosidad que la liofilización. Sin embargo, estudios como el de Brougham et al. (2017) y el de Davidenko et al. (2012) han

demostrado que la liofilización puede producir andamios funcionalmente viables para aplicaciones biomédicas cuando los parámetros de congelación son optimizados adecuadamente, particularmente la velocidad de enfriamiento y la temperatura final de congelación. La congelación rápida a temperaturas más bajas ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) produce cristales de hielo más pequeños y numerosos, resultando en una estructura de poros más homogénea que la obtenida a  $-20^{\circ}\text{C}$  (JoVE, 2023).

Respecto a la concentración de colágeno, Gobeaux et al. (2008) establecieron que concentraciones inferiores a 1,5 mg/mL son insuficientes para formar una red tridimensional estable que resista el proceso de secado, resultando en el colapso del material. Este umbral crítico es consistente con los resultados reportados por Gómez Lizárraga et al. (2011) en aerogeles de colágeno bovino tipo I obtenidos a partir de tendón, quienes establecieron un protocolo de extracción y purificación por digestión enzimática con pepsina que sirve como referencia metodológica para el presente trabajo.

### ***2.2.2 Refuerzo estructural y funcionalización avanzada***

Una línea de investigación prominente en el estado del arte busca superar las limitaciones mecánicas del colágeno puro, cuya baja resistencia a la compresión y degradación rápida limitan su aplicación en zonas de alta carga mecánica como los huesos largos. La incorporación de polímeros sintéticos biodegradables como el poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) o de cerámicas bioactivas como la hidroxiapatita mejora significativamente las propiedades mecánicas del andamio sin comprometer su biocompatibilidad (Goimil et al., 2017; Anaya-Barajas et al., 2019). Esta estrategia de materiales compuestos representa la dirección predominante del estado del arte hacia aplicaciones en carga mecánica.

Paralelamente, la funcionalización química de la superficie del aerogel para la carga y liberación dual o secuencial de agentes terapéuticos ha sido explorada por García-González et al. (2011), quienes demostraron que un aerogel de colágeno puede diseñarse para liberar primero un antibiótico en las fases iniciales post-implante y posteriormente un factor osteogénico para promover la regeneración a largo plazo.

### ***2.2.3 Fuentes alternativas de colágeno y contexto latinoamericano***

Existe un interés creciente en la obtención de colágeno a partir de fuentes alternativas y subproductos de la industria alimentaria, como escamas, pieles y espinas de pescado (tilapia, cachama) y tendones bovinos, con el objetivo de reducir costos, aprovechar la economía circular y disminuir la dependencia de proveedores internacionales (Quintero & Zapata, 2017; Santos Serrano, 2022; Serrano Gaona, 2011). En el contexto colombiano, investigaciones previas realizadas en la Universidad Industrial de Santander han explorado la extracción de colágeno tipo I a partir de subproductos de la industria pesquera local, estableciendo protocolos adaptados a las condiciones de laboratorio disponibles en la región (Santos Serrano, 2022). Estos antecedentes directos son relevantes para el presente trabajo, que adapta el protocolo de Gómez Lizárraga et al. (2011) a materia prima bovina de origen local.

### ***2.2.4 Modelos digitales y homogeneización computacional en biomateriales porosos***

La caracterización computacional de materiales porosos mediante Modelos digitales ha emergido como una herramienta poderosa para superar las limitaciones experimentales asociadas a la fragilidad de los aerogel y los andamios de colágeno. Los métodos de homogeneización micromecánica basados en la Transformada Rápida de Fourier (FFT), introducidos originalmente por Moulinec & Suquet (1994) y extendidos posteriormente para problemas multifísicos acoplados, permiten predecir propiedades macroscópicas efectivas (módulo elástico,

conductividad térmica, permeabilidad) a partir de la microestructura real del material representada como una matriz binaria de vóxeles.

Estudios recientes como el de Wang et al. (2024) y Jang & Lee (2023) han aplicado metodologías computacionales similares a aerogeles y geles de colágeno, reportando valores de conductividad térmica en el rango de 0,04–0,09 W/(m·K), módulos de elasticidad entre 10,0 y 36,1 MPa, y permeabilidades entre  $10^{-14}$  y  $10^{-12}$  m<sup>2</sup> para andamios de colágeno en condiciones de celda abierta relajada. Estos rangos constituyen la referencia de validación para los resultados computacionales del presente trabajo. La aproximación de modelo digital es especialmente pertinente cuando el material físico no puede ser sometido a ensayos mecánicos convencionales, situación que, como se documenta en el presente estudio, es frecuente en aerogeles liofilizados de baja concentración.

### ***2.2.5 Vacío de conocimiento que justifica el presente estudio***

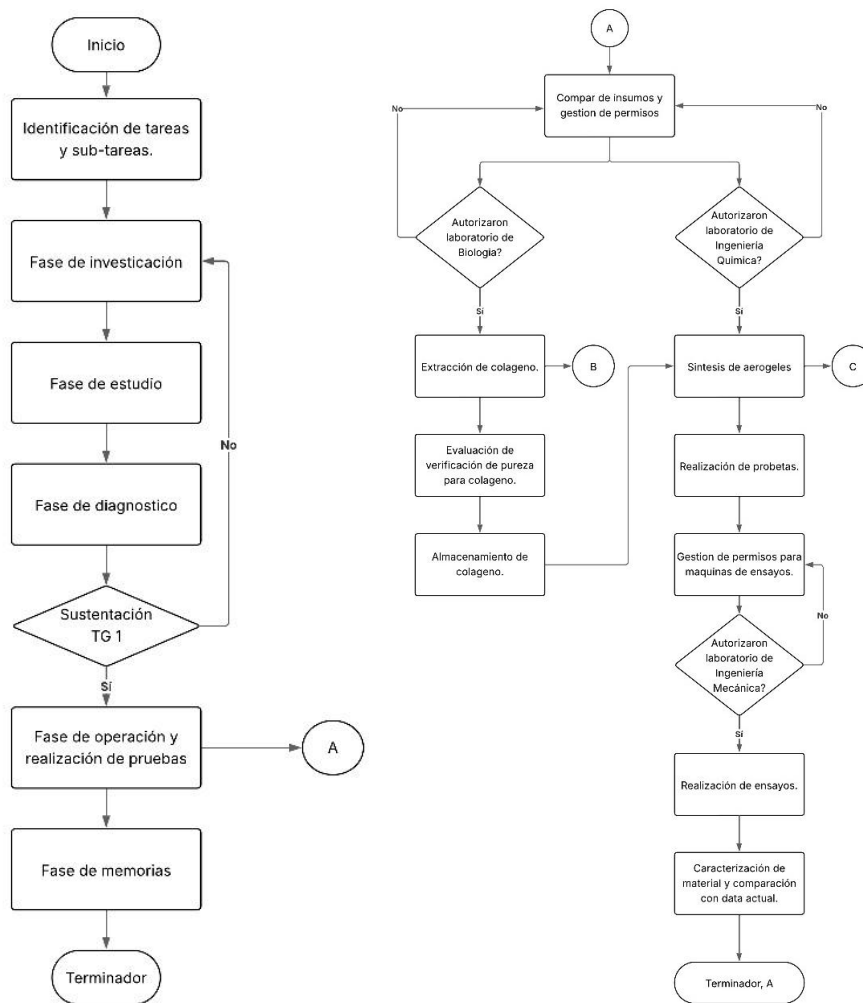
La revisión de la literatura permite identificar tres vacíos específicos que el presente trabajo busca abordar. Primero, la mayoría de los estudios sobre aerogeles de colágeno liofilizados se realizan en laboratorios con acceso a equipos de caracterización sofisticados, dejando sin explorar la viabilidad del proceso en entornos con restricciones instrumentales como el colombiano. Segundo, la integración sistemática de la caracterización morfológica experimental con la simulación computacional multifísica mediante FFT no ha sido reportada en la literatura para aerogeles de colágeno obtenidos por liofilización a partir de tendón bovino. Tercero, el uso de un modelo digital construido a partir de micrografías SEM reales, en lugar de geometrías idealizadas, como herramienta de validación biomecánica en presencia de colapso estructural del material físico, constituye una aproximación metodológica novedosa en el contexto de los biomateriales para injertos óseos.

### 3. Metodología

#### 3.1 Enfoque y diseño experimental

Figura 1.

Diagrama de flujo del proyecto.

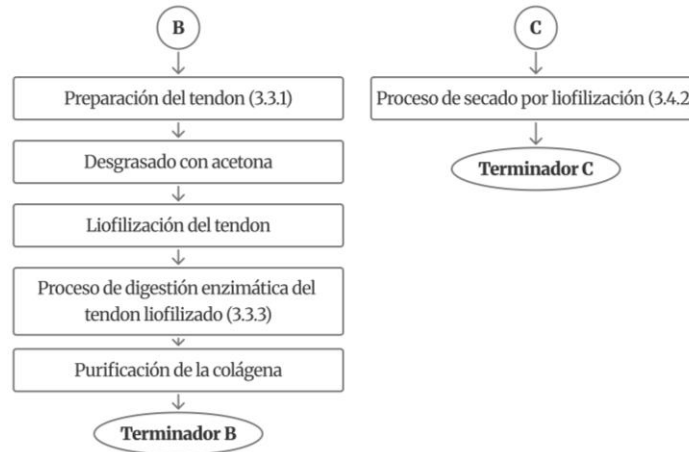


El presente estudio adoptó un enfoque experimental de tipo exploratorio-descriptivo, orientado a sintetizar y caracterizar aerogel de colágeno tipo I a partir de tendón bovino como materia prima local, mediante el método sol-gel con secado por liofilización. El diseño experimental se estructuró en cuatro fases secuenciales e interdependientes: extracción y purificación del colágeno, síntesis del aerogel, caracterización morfológica y estructural, y

simulación computacional de propiedades mecánicas, térmicas y de permeabilidad. La Figura 1 y la figura 2 presenta el diagrama de flujo completo del proceso experimental.

Figura 2.

Sección B y C del proyecto.



Las variables independientes controladas durante el proceso se detallan en la Tabla 4, mientras que las variables dependientes evaluadas como respuesta al proceso se presentan en la Tabla 5. Las variables que no pudieron ser controladas rigurosamente debido a las condiciones del laboratorio y la disponibilidad de equipos se documentan en la Tabla 6, junto con su impacto potencial sobre los resultados.

Tabla 4.

Las variables controladas durante el proceso

Variable	Valor/Especificación
Concentración inicial de colágeno	Determinada por el rendimiento de la extracción (≈1-2% p/v)
Relación colágeno:etanol en intercambio de solvente	1:3 (v/v)
Tiempo de gelificación	2-4 horas a 37 °C
Tiempo de congelación	12-24 horas a -80 °C
Tiempo de liofilización	24-48 horas (colector < -50 °C)
Velocidad de ensayo de compresión	1 mm/min
Temperatura de los ensayos	Ambiente (≈22-25 °C)

Tabla 5.

Propiedades evaluadas como respuesta al proceso.

Variable	Método de evaluación	Unidad
Morfología y estructura porosa	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Cualitativa
Tamaño de poro	Análisis de micrografías SEM	$\mu\text{m}$
Porosidad total	Método gravimétrico ( $1 - \rho_{\text{aerogel}}/\rho_{\text{colágeno}}$ ) $\times 100$	%
Densidad aparente	Relación masa/volumen geométrico	$\text{g}/\text{cm}^3$
Módulo elástico a compresión	Pendiente de la curva esfuerzo-deformación	kPa
Resistencia máxima a compresión	Esfuerzo máximo registrado	kPa
Energía absorbida hasta la falla	Área bajo la curva esfuerzo-deformación	$\text{kJ}/\text{m}^3$

Tabla 6.

Variables que no pudieron ser controladas.

Variable	Limitación	Impacto potencial
Fuerza centrífuga durante la purificación	Máxima de 4,500 rpm ( $\approx 4,100$ xg), inferior a los 11,500 xg reportados en la literatura (Gómez Lizárraga et al., 2011)	Posible reducción en el rendimiento y pureza del colágeno
Humedad relativa ambiental	Controlada parcialmente mediante desecador con sílica gel	Posible absorción de humedad por los aerogel antes de la caracterización
Pureza exacta del colágeno extraído	No se realizó cuantificación mediante SDS-PAGE o espectrofotometría	Desconocimiento del grado exacto de pureza
Temperatura ambiente durante ensayos	Controlada solo por aire acondicionado del laboratorio ( $\approx 22-25$ °C)	Posible variación en propiedades mecánicas

Los ensayos de compresión se planificaron por triplicado ( $n = 3$  probetas por condición); sin embargo, el colapso estructural del aerogel durante el secado impidió su realización. Los resultados de caracterización morfológica se presentan de forma cualitativa mediante micrografías SEM representativas de al menos dos regiones diferentes de cada muestra. Los datos cuantitativos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar.

### 3.2 Materiales y reactivos

Todos los materiales biológicos y reactivos químicos empleados en el estudio se listan a continuación con su especificación técnica relevante para la reproducibilidad del protocolo.

Materia prima biológica: Tendón extraído manualmente de patas de res frescas, adquiridas en mercado local.

Reactivos químicos: Acetona para desgrasado (grado analítico); agua desionizada; ácido acético glacial 0,5 M para solubilización del colágeno; HCl 1 M para ajuste de pH durante la extracción; NaOH 1 M para ajuste de pH durante la gelificación; NaCl en cristales para precipitación selectiva (salting out); etanol absoluto (>99,5%) para precipitación complementaria; pepsina de mucosa gástrica porcina (Pepsin from Porcine Gastric Mucosa P7012-1G, Merck) como agente de digestión enzimática.

Materiales de laboratorio: Filtros de jeringa PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  y 25 mm (referencia 9909-2502) para esterilización de la solución; jeringas estériles; gasas para filtración por decantación; recipientes y tubos de centrifuga; espátulas y pipetas; Parafilm para sellado de moldes.

Equipos: Homogeneizador (licuadora Imusa) para disgregación del tejido; centrífuga Consul 22 con rotor RT 282 y adaptador RE 449; liofilizador Labconco de 6 litros tipo cascada; refrigerador a 4°C para almacenamiento temporal; ultracongelador para congelación a -80°C; desecador con sílica gel para almacenamiento de aerogeles.

Equipos de caracterización: Microscopio electrónico de barrido Quanta FEG 650; equipo de metalización Quorum Q150A ES; software Fiji (distribución de ImageJ, versión de código abierto) para análisis digital de imágenes.

Moldes para síntesis: Dos configuraciones diseñadas e impresas en 3D en material PLA: (A) molde plano de 30 mm  $\times$  30 mm  $\times$  2,5 mm para muestras destinadas a SEM, y (B) molde

multicavidad para tres probetas cilíndricas de 12 mm de diámetro  $\times$  12 mm de altura destinadas a ensayos de compresión. Los moldes constan de tres partes ensambladas mediante pernos, con Parafilm como sello en las uniones para evitar fugas durante la gelificación.

### 3.3 Extracción y purificación del colágeno tipo I

El protocolo de extracción se diseñó con base en la metodología de Gómez Lizárraga et al. (2011) para colágeno soluble en ácido a partir de tejidos conectivos de origen bovino, con adaptaciones reportadas por Quintero y Zapata (2017) y Jongjareonrak et al. (2005). El proceso comprendió cinco etapas: preparación del tendón, desgrasado, digestión enzimática, purificación por precipitación selectiva y filtración.

#### 3.3.1 Preparación y pretratamiento del tendón

Figura 3.

(A) Pata de res, (B) Tendones extraídos de pata, (C) Tendones en recipiente para su lavado, (D) Tendones cortados en pequeños trozos



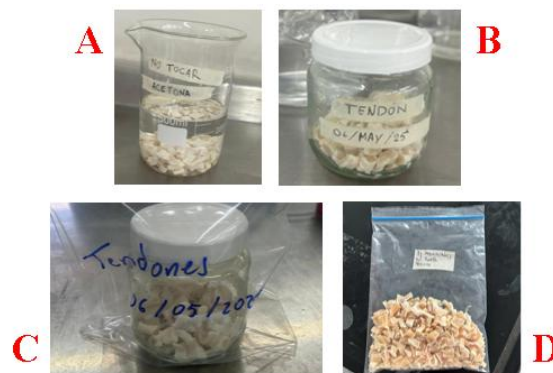
Se adquirieron patas de res frescas, de las cuales se extrajeron manualmente los tendones. Estos fueron lavados exhaustivamente con agua desionizada a 4°C para eliminar impurezas superficiales y residuos sanguíneos, y posteriormente cortados en fragmentos de aproximadamente 0,5 cm  $\times$  0,5 cm para incrementar el área superficial de contacto y facilitar los procesos subsiguientes de extracción (figura 3), siguiendo las recomendaciones de pretratamiento descritas para tejidos conectivos (Gómez Lizárraga et al., 2011).

### 3.3.2 Desgrasado con acetona

Con el objetivo de eliminar lípidos y tejido adiposo que pudieran interferir con la pureza del colágeno extraído, los fragmentos de tendón se sumergieron en acetona en una proporción 1:10 (p/v) y se mantuvieron bajo refrigeración a 4°C durante 12 horas, adaptando el método de desgrasado empleado en la extracción de colágeno a partir de piel de pescado (Jongjareonrak et al., 2005). Transcurrido este tiempo, la acetona fue removida y los fragmentos se lavaron nuevamente con agua desionizada para eliminar residuos del solvente. Los tendones lavados y desgrasados se almacenaron temporalmente a 4°C antes de ser sometidos a liofilización, proceso que permitió eliminar el agua residual y conservar la integridad proteica del tejido hasta su uso en la extracción de colágeno (figura 4).

Figura 4.

(A) Tendón sumergido en acetona, (B) Tendón depositado en frasco de vidrio, (C) Tendones marcados para almacenamiento en frío, (D) Tendones luego del proceso de liofilización.



### 3.3.3 Digestión enzimática con pepsina

Se preparó una solución de ácido acético 0,5 M y se ajustó el pH a 2,5 mediante adición de HCl 1 M. Se tomaron 10 g de tendón liofilizado y se mezclaron con 500 mL de la solución de ácido acético (relación 1:50 en volúmenes), siguiendo el protocolo establecido por Gómez Lizárraga et al. (2011). La mezcla se homogeneizó a 100 RPM utilizando un homogeneizador

hasta obtener una masa gelatinosa uniforme. En la etapa de filtración, se tomaron 50 g de la masa gelatinosa, se adicionó ácido acético hasta homogeneizar completamente y se filtró mediante gasas y decantación para separar el tejido no disuelto. El tejido retenido en la gasa se sometió nuevamente a solubilización con ácido acético, repitiendo el proceso para maximizar el rendimiento de extracción.

Figura 5.

Proceso de extracción: (A) Masa gelatinosa luego de homogenizar, (B) Filtrado por gasas y decantación, (C) Relación 1:10 (peso de enzima/filtrado), (D) Configuración de panel de centrifuga.



Para la digestión con pepsina, se adicionó la enzima en una relación 1:10 (peso de enzima / peso de tejido). La mezcla se agitó durante 24 horas a 4°C para permitir la digestión enzimática completa (Gómez Lizárraga et al., 2011), (Figura 5).

### 3.3.4 Purificación por precipitación selectiva

La purificación del colágeno en solución se realizó en dos etapas secuenciales.

Primera precipitación (salting out): La solución viscosa resultante se diluyó con un volumen igual de ácido acético y se centrifugó durante tres ciclos de 20 minutos a 4.500 rpm ( $\approx 4.100 \text{ xg}$ ) con el equipo disponible, recuperándose el sobrenadante en cada ciclo. Sobre el sobrenadante se adicionaron cristales de NaCl con agitación constante y la mezcla se dejó reposar durante 24 horas a 4°C para inducir la precipitación del colágeno por efecto salino. La

mezcla se centrifugó a 11.500 xg durante 2 horas, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 mL de ácido acético 0,5 M.

Dado que la cantidad recuperada fue reducida, se realizó una precipitación complementaria con etanol: se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) a los restos de la solución filtrada y la mezcla se dejó reposar entre 2 y 24 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se centrifugó a la máxima velocidad disponible, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en el mínimo volumen de ácido acético 0,5 M (aproximadamente 0,5–1 mL).

*Figura 6.*

*Purificación: (A) Salting out, (B) Filtrado del precipitado con ácido acético, (C) Filtrado por jeringa PVDF.*



Filtración esterilizante: La solución resuspendida se filtró utilizando jeringas estériles y filtros PVDF de  $0,22\ \mu\text{m}$  y 25 mm para clarificar la solución y eliminar partículas no deseadas, obteniendo una solución de colágeno purificado lista para la síntesis del aerogel (figura 4).

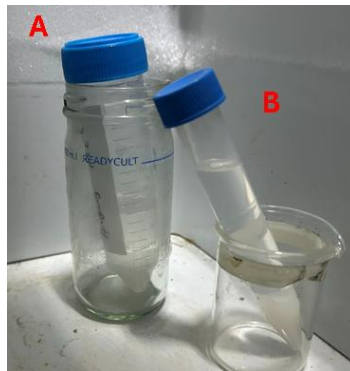
### 3.4 Síntesis del aerogel de colágeno mediante el método sol-gel

#### 3.4.1 Gelificación del colágeno

La síntesis del aerogel partió de la solución de colágeno purificado en ácido acético 0,5 M ( $\text{pH} \approx 2,5$ ). Para inducir la fibrilogénesis y la formación del hidrogel, fue necesario neutralizar el pH y elevar la temperatura a condiciones fisiológicas. Este proceso se realizó en dos pasos.

Figura 7.

Muestras en proceso de lavado: (A) Muestra en primer lavado, (B) Muestra en segundo lavado.



Primero se efectuó un intercambio de solvente (Figura 7): la solución se lavó con etanol en una relación 1:3 (12 mL) y posteriormente en una relación 1:1 (5 mL), dejando 1 mL de etanol residual en el recipiente tras el primer lavado (figura 5). A continuación, se ajustó el pH de la solución a 7,0–7,4 mediante la adición controlada de NaOH 1 M, gota a gota con agitación suave, midiendo el pH tras cada adición (figura 8) para garantizar una neutralización homogénea y evitar gradientes locales de pH que pudieran afectar la fibrilogénesis (Harris et al., 2017; Bronner-Shtrauchler et al., 2024).

Figura 8.

Ajuste de pH de las muestras unificadas luego del lavado.



La solución neutralizada se vertió en los moldes impresos en 3D (figura 9), los cuales se sellaron y se incubaron a 37°C durante 2–4 horas (figura 10). A pH neutro y temperatura fisiológica, el colágeno tipo I forma espontáneamente una red tridimensional de microfibrillas

estabilizada por interacciones no covalentes, mientras que a pH ácido la formación de fibras solo ocurre a concentraciones muy elevadas (Gobeaux et al., 2008; Inoue et al., 2006).

Figura 9.

Modelo SW moldes para ensayos: (A) Microscopía electrónica, (B) compresión.

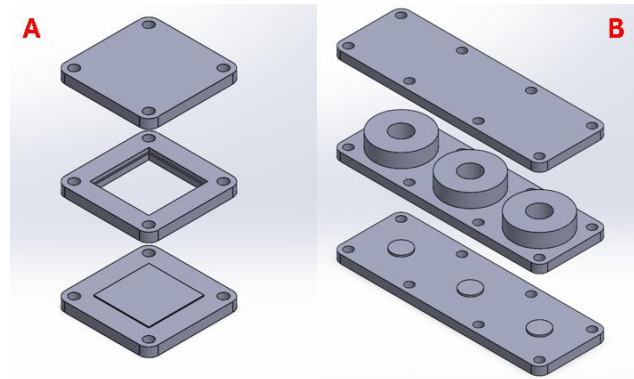
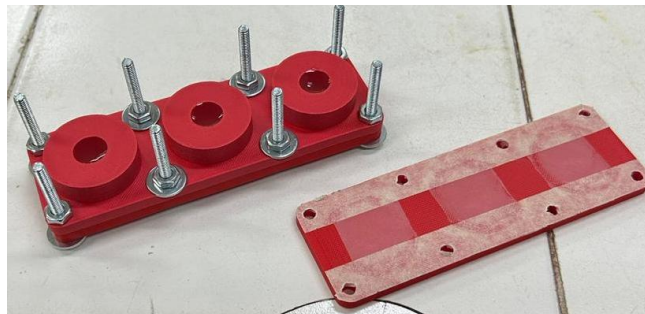


Figura 10.

Gel en moldes con pH 7,0-7,4.



### 3.4.2 Congelación y liofilización

Una vez formado el hidrogel o transcurrido el tiempo de incubación (figura 11), se retiró la tapa superior de los moldes y las muestras se transfirieron a un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante 12–24 horas. La velocidad y temperatura de congelación son parámetros críticos que determinan la arquitectura porosa final del aerogel: la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  produce cristales de hielo más pequeños y numerosos que a  $-20^{\circ}\text{C}$ , resultando en una estructura de poros más homogénea, ya que los cristales de hielo actúan como plantilla para los poros que quedan tras la sublimación (García-González et al., 2011; JoVE, 2023).

Figura 11.

Gel en moldes durante proceso de congelación.



Los geles congelados se sometieron a secado por liofilización en un equipo Labconco de 6 litros, aplicando vacío a una temperatura de colector inferior a  $-50^{\circ}\text{C}$  durante 24–48 horas, o hasta que las muestras alcanzaron un estado completamente seco, evidenciado por una apariencia blanca y esponjosa. Durante este tiempo, el solvente congelado se eliminó por sublimación directa, preservando la estructura porosa generada durante la congelación. Finalizado el ciclo, se purgó el vacío lentamente para evitar fracturas en el material por cambios bruscos de presión. Los aerogel obtenidos se almacenaron en un desecador con sílica gel bajo vacío para evitar la absorción de humedad ambiental, dado su carácter higroscópico.

### 3.5 Protocolos de caracterización

#### 3.5.1 Caracterización morfológica mediante SEM y análisis EDS

Debido al colapso estructural del aerogel durante el secado, el material se presentó en forma de polvo, por lo que los ensayos de caracterización se adaptaron a esta condición. El material pulverulento se depositó sobre cinta adhesiva de carbono montada en stubs de aluminio. Las muestras se metalizaron en un equipo Quorum Q150A ES (figura 12) mediante sputter coating con una capa conductora de oro de aproximadamente 10–15 nm de espesor, siguiendo los lineamientos de la norma ASTM E2809-20 para la preparación de muestras poliméricas no conductoras.

*Figura 12.**Equipo de metalización Quorum Q150A ES.*

Las micrografías se adquirieron en un microscopio Quanta FEG 650 (figura 13) bajo las siguientes condiciones operativas: voltaje de aceleración de 20,00 kV, distancia de trabajo entre 9,8 y 10,3 mm, y campo de visión horizontal variable según el aumento. Se emplearon dos modos de detección: electrones retrodispersados (BSED) para contraste por composición química, y electrones secundarios (ETD) para topografía superficial. Los aumentos utilizados fueron 100×, 200×, 400×, 800×, 1.500×, 1.600×, 3.000×, 6.000× y 12.000×, con escalas en el rango de 5  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$  según el nivel de ampliación, siguiendo los procedimientos estándar reportados en la literatura para andamios de colágeno (García-González et al., 2011; Anaya-Barajas et al., 2019).

*Figura 13.**Microscopio electrónico Quanta FEG 650.*

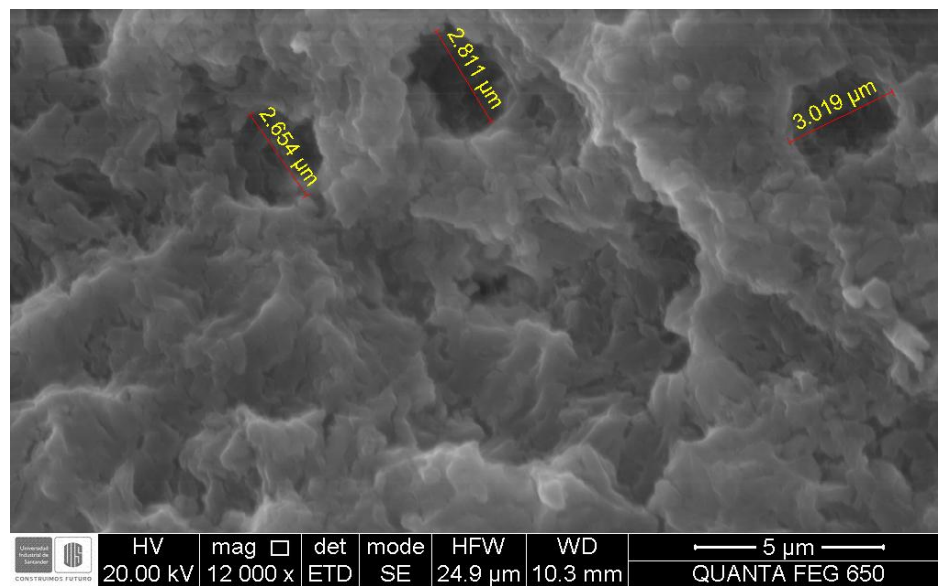
Adicionalmente, se realizó análisis químico puntual por EDS (Energy Dispersive Spectroscopy) en cuatro zonas representativas del material, identificando la presencia de carbono (C), nitrógeno (N) y oxígeno (O) como elementos característicos del colágeno, así como sodio (Na) y cloro (Cl) como indicadores de residuos del proceso de purificación.

### 3.5.2 Porosimetría digital mediante análisis de imágenes con Fiji

A partir de las micrografías SEM obtenidas a 12.000× de aumento (figura 14), se determinó el tamaño de las partículas y poros del material mediante análisis digital de imágenes utilizando el software Fiji. El procedimiento de procesamiento incluyó las siguientes etapas secuenciales: conversión de la imagen a escala de grises de 8 bits; ajuste de umbral (threshold) para segmentar las partículas o poros de interés del fondo; y medición de la longitud (diámetro de Feret) y demás parámetros morfométricos de las partículas identificadas. El análisis se configuró con un rango de tamaño de 0 a infinito, registrando cada partícula para la micrografía representativa. Los parámetros morfométricos registrados se detallan en la Tabla 7.

Figura 14.

Micrografía SEM (12000×) utilizada para el análisis morfométrico, con escalas de medición.

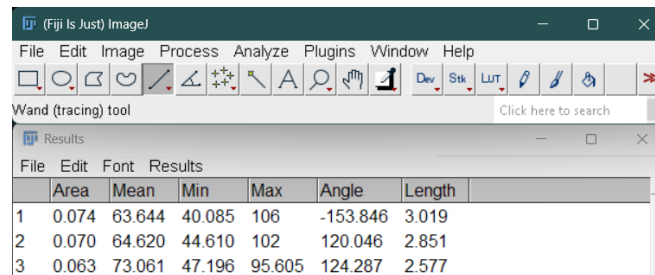


Nota: fotografía tomada por laboratorio de microscopía.

La validación del análisis digital se realizó comparando las mediciones de tamaño de poro obtenidas mediante el software del SEM con las obtenidas mediante Fiji (figura 15) para tres poros representativos, encontrando una diferencia máxima de 0,077  $\mu\text{m}$ , lo que confirma la precisión del método (Schindelin et al., 2012).

Figura 15.

Interfaz del software Fiji (ImageJ).



The screenshot shows the Fiji (ImageJ) software interface. The 'Results' window is open, displaying a table with the following data:

	Area	Mean	Min	Max	Angle	Length
1	0.074	63.644	40.085	106	-153.846	3.019
2	0.070	64.620	44.610	102	120.046	2.851
3	0.063	73.061	47.196	95.605	124.287	2.577

### 3.5.3 Ensayos mecánicos de compresión

Se planificó la realización de ensayos de compresión uniaxial sobre probetas cilíndricas de 12 mm de diámetro  $\times$  12 mm de altura, a una velocidad de desplazamiento de 1 mm/min y temperatura ambiente ( $\approx 22\text{--}25^\circ\text{C}$ ), conforme a los lineamientos de la norma ASTM D1621 para materiales celulares rígidos. Sin embargo, el colapso estructural del aerogel durante el proceso de liofilización, que resultó en un material pulverulento, impidió la fabricación de probetas con integridad geométrica suficiente para este ensayo. Esta limitación se discute en detalle en la sección 5.1 y constituyó la motivación principal para el desarrollo del enfoque de simulación computacional descrito en la sección 4.6.

## 3.6 Simulación computacional mediante modelo digital y homogeneización por FFT

### 3.6.1 Construcción del modelo digital

Ante la imposibilidad de realizar ensayos mecánicos experimentales, se implementó una metodología computacional basada en la generación de un modelo digital del material. El

análisis morfológico de las micrografías SEM se procesó en Fiji para extraer parámetros arquitectónicos clave, particularmente el tamaño de poro promedio ( $\approx 2,8 \mu\text{m}$ ) y la distribución de poros. A partir de estos datos, se generó un dominio computacional tridimensional discreto de  $204 \times 188 \times 204$  vóxeles utilizando la biblioteca de modelado PicoGK. El dominio se estructuró como una matriz binaria donde cada vóxel contiene una etiqueta de fase: 1 para sólido (colágeno) y 0 para vacío (poro), con una porosidad global del 52,19%, consistente con los datos experimentales de porosimetría digital.

El dominio se clasifica como modelo digital porque no constituye una idealización geométrica simplificada, sino una réplica computacional basada en la morfología real del material obtenida directamente de las micrografías SEM. Esto garantiza que las propiedades predichas reflejen el comportamiento del material real y no de un modelo idealizado.

### ***3.6.2 Homogeneización micromecánica por FFT***

Para calcular las propiedades macroscópicas efectivas, se implementó un marco de homogeneización computacional basado en la Transformada Rápida de Fourier (FFT) utilizando el método de subespacio de Krylov (BiCGSTAB) en Python. Este método presenta ventajas críticas frente a métodos convencionales como FEM o BEM: es libre de mallado (mesh-free), utilizando la grilla de vóxeles directamente como dominio de cálculo; tiene escalabilidad de memoria, resolviendo ecuaciones en el dominio espectral mediante convoluciones con operadores de Green; y asume condiciones de contorno periódicas (PBC), ideales para estudiar el Volumen Elemental Representativo (RVE) de materiales heterogéneos. El modelo se ejecutó en el clúster de alto rendimiento GUANE de la Universidad Industrial de Santander (figura 16), alcanzando convergencia en menos de 150 iteraciones para aproximadamente 8 millones de grados de libertad.

Figura 16.

Clúster de alto rendimiento HPC Guane.

```

Propiedad (Eje Y) | Valor Efectivo | Unidad | Iteraciones
-----|-----|-----|-----
Conductividad Térmica | 0.412e-02 | W/(m·K) | 9
Módulo de Elasticidad | 2.204e+01 | MPa | 83
Permeabilidad | 3.101e-06 | m² (Darcy) | 88
-----|-----|-----|-----
Generando curvas de resultados de alta resolución...
(Gráfica exportada exitosamente! -> resultados_homogeneizacion_01.png)
Simulación Finalizada.

(femixx-env) [guaner@guane ~]$ > solver_fft.py
(femixx-env) [guaner@guane ~]$ name solver_fft.py
(femixx-env) [guaner@guane ~]$ sbatch submit_fft.sh
Submitted batch job 1004
(femixx-env) [guaner@guane ~]$ tail -f sim_fft_1004.out
Iniciando simulación FFT en el nodo: thor
CPU asignadas: 32
Iniciando dominio y variables de Fourier...
Leyendo geometría desde aerogel_matrix.bin...
[1/3] Resolviendo conductividad térmica (BICGSTAB-FFT)...
[2/3] Resolviendo mecánica elástica (BICGSTAB-FFT)...
[3/3] Resolviendo permeabilidad (Brinkman BICGSTAB-FFT)...
-> Nota: Permeabilidad alcanzó límite iteraciones sin convergencia perfecta (Info: 150)
[3996.92 s] Simulaciones FFT Aceleradas (BICGSTAB) Finalizadas.

Propiedad (Eje Y) | Valor Efectivo | Unidad | Iteraciones
-----|-----|-----|-----
Conductividad Térmica | 0.412e-02 | W/(m·K) | 9
Módulo de Elasticidad | 2.204e+01 | MPa | 83
Permeabilidad | 3.179e-06 | m² (Darcy) | 150
-----|-----|-----|-----
Generando curvas de resultados de alta resolución...
(Gráfica exportada exitosamente! -> resultados_homogeneizacion_01.png)
Simulación Finalizada.
  
```

### 3.6.3 Modelos físicos evaluados

El código computacional evaluó tres físicas acopladas sobre la misma matriz binaria.

**Difusión térmica (conductividad efectiva):** Se simuló la conducción de calor en estado estacionario resolviendo la ecuación de conservación de energía  $\nabla \cdot \mathbf{q} = 0$  con la ley de Fourier local  $\mathbf{q}(\mathbf{x}) = -\mathbf{k}(\mathbf{x})\nabla T(\mathbf{x})$ . Se ingresaron conductividades de 0,20 W/(m·K) para el sólido (colágeno) y 0,026 W/(m·K) para el aire (poros), imponiendo un gradiente macroscópico de temperatura.

**Elasticidad lineal (módulo estructural):** Se realizó una homogeneización micromecánica para determinar la rigidez aparente bajo compresión uniaxial mediante la ley de Hooke  $\sigma(\mathbf{x}) = \mathbf{C}(\mathbf{x})\varepsilon(\mathbf{x})$  y el tensor de Green elastostático de cuarto orden. Se ingresó un módulo de Young del colágeno de 1.800 MPa y un coeficiente de Poisson de 0,3. La fase vacía se regularizó con un módulo de 1,0 MPa para evitar el mal condicionamiento matemático.

**Permeabilidad (modelo de Brinkman-Stokes):** Se aproximó el comportamiento aerodinámico mediante el modelo de Brinkman, donde el fluido atraviesa el dominio mientras el

sólido se penaliza con una resistencia friccional colosal. La ecuación de equilibrio de momento es  $\mu \nabla^2 \mathbf{v} - \nabla P - \alpha(\mathbf{x})\mathbf{v} = 0$ , con condición de incompresibilidad  $\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$ . Se ingresaron una viscosidad del fluido de  $10^{-3}$  MPa·s, penalización de Brinkman  $\alpha = 10^5$  en el sólido y  $\alpha = 0$  en los poros, y un gradiente de presión impulsador.

### ***3.6.4 Validación de los resultados computacionales***

Los resultados obtenidos del modelo digital se compararon con valores experimentales reportados en la literatura para andamios de colágeno y arquitecturas porosas afines, siguiendo el esquema de validación detallado en la Tabla 9. La concordancia entre los valores simulados y los rangos reportados en la literatura se utilizó como criterio de validación del modelo y de la representatividad del modelo digital construido.

## **4. Resultados y Análisis**

### **4.1 Síntesis del aerogel: observaciones macroscópicas y comportamiento del material**

#### ***4.1.1 Rendimiento del proceso de extracción***

El proceso de extracción y purificación del colágeno tipo I a partir de tendón bovino produjo aproximadamente 4 mL de solución purificada, con una concentración estimada de colágeno en el rango de 1–2% p/v, determinada indirectamente a partir del rendimiento gravimétrico del proceso. Este volumen condicionó de forma directa el diseño experimental subsiguiente, particularmente el tamaño de los moldes y el número de probetas fabricables.

La fuerza centrífuga aplicada durante la purificación ( $\approx 4.100$  xg) fue significativamente inferior a los 11.500 xg reportados en el protocolo de referencia de Gómez Lizárraga et al. (2011), lo que constituye una limitación instrumental con impacto potencial sobre el rendimiento

y la pureza del colágeno obtenido. Esta restricción se deriva de las capacidades máximas de la centrífuga disponible y es discutida en detalle en el capítulo 5.

#### **4.1.2 Comportamiento durante la gelificación y el secado**

Tras el ajuste de pH a 7,0–7,4 y la incubación a 37°C durante 2–4 horas, se observó la formación de un hidrogel translúcido en los moldes, consistente con la fibrilogénesis espontánea del colágeno tipo I a condiciones de pH neutro y temperatura fisiológica, tal como ha sido reportado en la literatura (Gobeaux et al., 2008; Inoue et al., 2006). Sin embargo, tras el proceso completo de congelación a –80°C y liofilización durante 24–48 horas, el material no conservó su forma geométrica cilíndrica o laminar original, presentándose como un material pulverulento de apariencia blanca y esponjosa (Figura 17).

*Figura 17.*

*Aerogel base colágeno.*



Este comportamiento indica que las condiciones de síntesis empleadas, particularmente la concentración de colágeno ( $\approx 1\text{--}2\%$  p/v) y el tiempo de gelificación (2–4 horas), no fueron suficientes para consolidar una red tridimensional con la resistencia mecánica necesaria para resistir las tensiones generadas durante la sublimación del solvente. Resultados similares han sido reportados en la literatura cuando la concentración de colágeno es inferior a 1,5 mg/mL (Gobeaux et al., 2008), lo que sugiere que el umbral crítico de concentración no fue superado de forma consistente en el presente estudio. El colapso estructural del material físico determinó que

los ensayos mecánicos de compresión uniaxial planificados resultarían inviables, motivando la adopción del enfoque computacional descrito en la sección 3.6 y cuyos resultados se presentan en la sección 4.3.

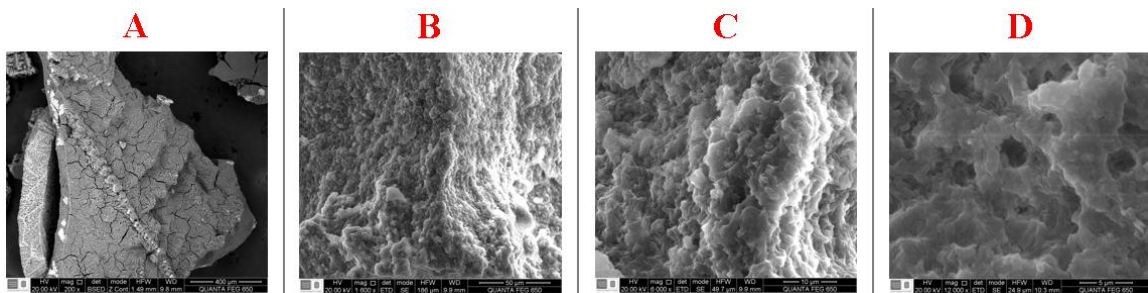
## 4.2 Caracterización morfológica y estructural

### 4.2.1 Arquitectura porosa observada por SEM

Las micrografías SEM del material pulverulento, obtenidas a aumentos de 400×, 1.600×, 6.000× y 12.000× (Figura 18), revelaron una estructura porosa heterogénea caracterizada por la coexistencia de macroporos (>50 μm), mesoporos (2–50 μm) y microporos (<2 μm) distribuidos a lo largo del material. Esta jerarquía porosa multiescala es un resultado de significativa relevancia biomédica: los macroporos facilitan la vascularización y la infiltración celular de osteoblastos, mientras que los mesoporos y microporos promueven la adhesión celular, el intercambio de nutrientes y la carga de agentes terapéuticos (Anaya-Barajas et al., 2019; García-González et al., 2011).

Figura 18.

Micrografías SEM del material pulverulento a diferentes aumentos: (A) 400×, (B) 1600×, (C) 6000×, (D) 12000×.



Nota: Fotografías tomadas por laboratorio de microscopía y editadas por el autor.

La singularidad estructural del material radica en que presenta poros en una escala cercana a la nanométrica, con tamaños que rondan la media micra ( $\approx 0,5\text{--}5\ \mu\text{m}$ ), rango que resulta especialmente relevante para aplicaciones en regeneración ósea al ser compatible con el

tamaño de las células osteogénicas y con los requerimientos de permeabilidad al flujo de fluidos biológicos.

No obstante, la distribución de poros no fue homogénea ni perfectamente definida. Se observaron regiones con poros de diferentes tamaños y morfologías sin un patrón uniforme, lo que se atribuye directamente al método de secado empleado. La liofilización, a diferencia del secado supercrítico con CO<sub>2</sub>, tiende a generar estructuras porosas con mayor variabilidad morfológica debido a la formación heterogénea de cristales de hielo durante la congelación (Duarte, 2017; Sachithanadam & Joshi, 2016). Este resultado es consistente con lo reportado por Davidenko et al. (2012) y Brougham et al. (2017) para aerogel de colágeno obtenidos por liofilización sin control exhaustivo de la velocidad de enfriamiento.

#### ***4.2.2 Interconexión de poros y rugosidad superficial***

A aumentos de 3.000× (≈30 μm de campo de visión), se observó que los poros del material presentan interconexión: se identificaron conductos y canales de transferencia que conectan diferentes regiones porosas, así como zonas con aparentes grietas o fracturas que amplían las vías de comunicación entre poros. Esta interconexión es una condición necesaria, aunque no suficiente, para el desempeño funcional del andamio: un material con compartimentos cerrados impediría la migración celular y el flujo de nutrientes a través de la estructura, comprometiendo la regeneración tisular (Martins et al., 2015). La presencia de poros comunicantes en el material obtenido constituye, por tanto, un hallazgo positivo que parcialmente compensa la falta de homogeneidad morfológica.

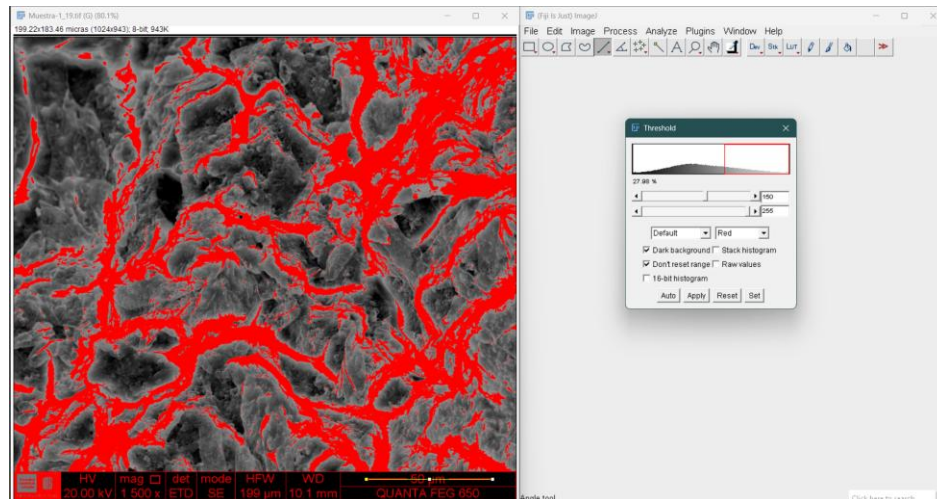
La superficie del material se mostró rugosa y con textura porosa en todas las escalas observadas. Esta rugosidad es funcionalmente beneficiosa para la adhesión y proliferación celular, ya que imita la topografía natural de la matriz extracelular y promueve la fijación de

osteoblastos mediante interacciones mecánicas y bioquímicas (Sanzana-Luengo et al., 2022). Adicionalmente, a aumentos elevados ( $\geq 6.000\times$ ), se observó daño localizado del material por efecto del haz de electrones, manifestado como zonas de quemadura o degradación superficial, fenómeno característico de materiales biológicos sensibles a la exposición prolongada al haz en condiciones de alto vacío (ASTM E2809-20). Para minimizar este efecto, se redujo el tiempo de exposición por campo y se priorizaron adquisiciones rápidas en zonas frescas de la muestra.

#### 4.2.3 Análisis morfométrico cuantitativo de poros mediante Fiji

Figura 19.

Ajuste de umbral (threshold) en software Fiji.



El análisis digital de imágenes sobre la micrografía SEM obtenida a  $12.000\times$  de aumento (Figura 18, D), procesada mediante el software Fiji con segmentación por umbral adaptativo (figura19), identificó y cuantificó 261 partículas (Figura 21) correspondientes a poros y espacios vacíos del material (Figura 20). Los parámetros morfométricos obtenidos se resumen en la Tabla 10 en la sección 4.3.3.

Figura 20.

Características de poros en software Fiji.

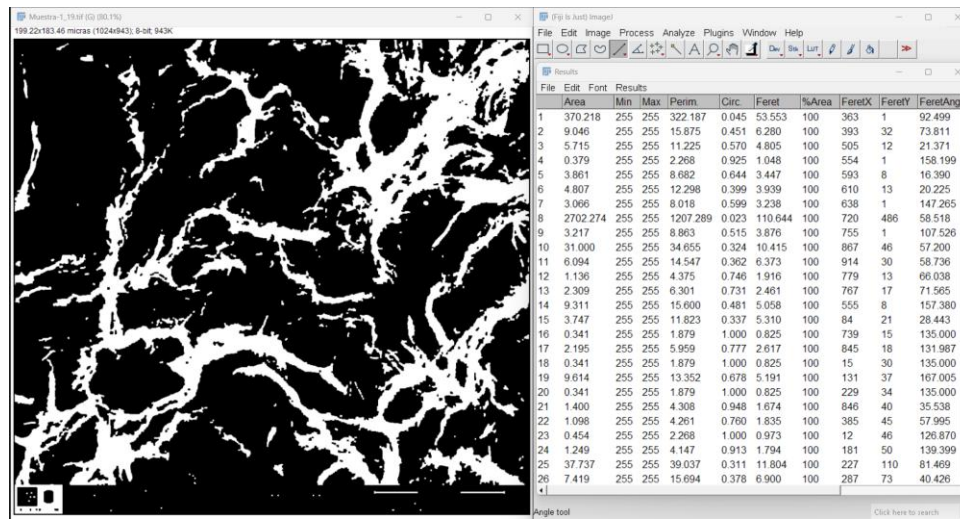


Tabla 7.

Parámetros morfométricos registrados en el análisis con Fiji.

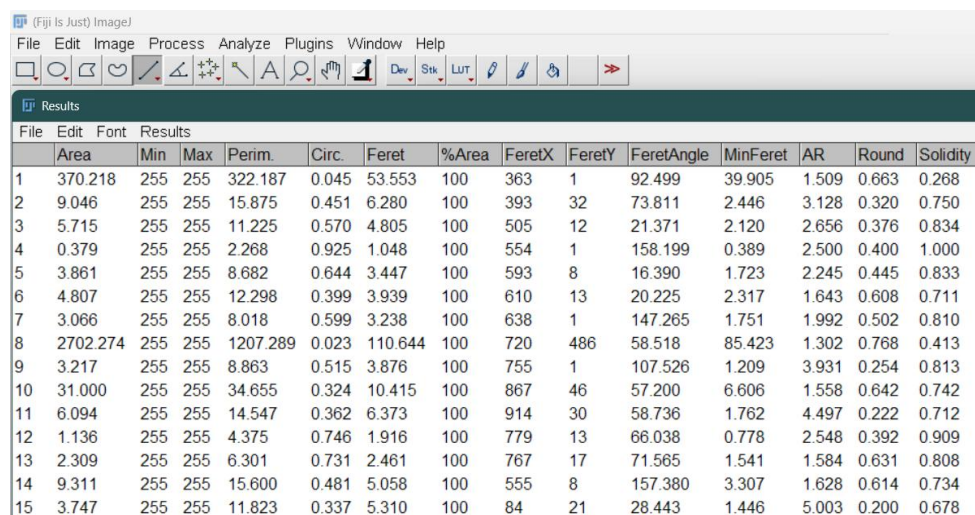
Parámetro	Unidad	Descripción
Área	μm <sup>2</sup>	Superficie ocupada por la partícula o poro
%Area	%	Porcentaje del área total de la imagen que ocupa la partícula
FeretX	μm	Coordenada X del diámetro de Feret
FeretY	μm	Coordenada Y del diámetro de Feret
FeretAngle	grados	Ángulo de orientación del diámetro de Feret
MinFeret	μm	Diámetro de Feret mínimo (ancho de la partícula)
AR (Aspect Ratio)	adimensional	Relación entre el eje mayor y el eje menor (Feret/MinFeret)
Round (Redondez)	adimensional	$4 \times \text{Área} / (\pi \times \text{Feret}^2)$ . Valores cercanos a 1 indican formas circulares
Solidity (Solidez)	adimensional	Área / Área del casco convexo. Indica la regularidad del contorno

El diámetro de Feret promedio (longitud máxima) de los poros fue de  $6,74 \pm 14,23 \mu\text{m}$ , con valores que oscilaron entre  $0,82 \mu\text{m}$  y  $163,58 \mu\text{m}$ , evidenciando la amplia distribución de tamaños propia de la jerarquía porosa multiescala observada cualitativamente en las micrografías. El diámetro mínimo promedio (MinFeret) fue de  $4,28 \pm 9,87 \mu\text{m}$ . La relación de

aspecto ( $AR = \text{Feret}/\text{MinFeret}$ ) presentó valores entre 1,00 y 28,19, con una media de  $2,34 \pm 2,48$ : los valores cercanos a 1 corresponden a poros de forma aproximadamente circular (partículas 16, 18, 20, 28, 37, entre otras, con  $AR=1,0$  y  $\text{Round}=1,0$ ), mientras que los valores elevados ( $AR>5$ ) corresponden a poros elongados o fracturas alargadas, consistentes con los canales de transferencia identificados cualitativamente.

Figura 21.

Resultados de análisis de partículas en software Fiji.



File	Area	Min	Max	Perim.	Circ.	Feret	%Area	FeretX	FeretY	FeretAngle	MinFeret	AR	Round	Solidity
1	370.218	255	255	322.187	0.045	53.553	100	363	1	92.499	39.905	1.509	0.663	0.268
2	9.046	255	255	15.875	0.451	6.280	100	393	32	73.811	2.446	3.128	0.320	0.750
3	5.715	255	255	11.225	0.570	4.805	100	505	12	21.371	2.120	2.656	0.376	0.834
4	0.379	255	255	2.268	0.925	1.048	100	554	1	158.199	0.389	2.500	0.400	1.000
5	3.861	255	255	8.682	0.644	3.447	100	593	8	16.390	1.723	2.245	0.445	0.833
6	4.807	255	255	12.298	0.399	3.939	100	610	13	20.225	2.317	1.643	0.608	0.711
7	3.066	255	255	8.018	0.599	3.238	100	638	1	147.265	1.751	1.992	0.502	0.810
8	2702.274	255	255	1207.289	0.023	110.644	100	720	486	58.518	85.423	1.302	0.768	0.413
9	3.217	255	255	8.863	0.515	3.876	100	755	1	107.526	1.209	3.931	0.254	0.813
10	31.000	255	255	34.655	0.324	10.415	100	867	46	57.200	6.606	1.558	0.642	0.742
11	6.094	255	255	14.547	0.362	6.373	100	914	30	58.736	1.762	4.497	0.222	0.712
12	1.136	255	255	4.375	0.746	1.916	100	779	13	66.038	0.778	2.548	0.392	0.909
13	2.309	255	255	6.301	0.731	2.461	100	767	17	71.565	1.541	1.584	0.631	0.808
14	9.311	255	255	15.600	0.481	5.058	100	555	8	157.380	3.307	1.628	0.614	0.734
15	3.747	255	255	11.823	0.337	5.310	100	84	21	28.443	1.446	5.003	0.200	0.678

La redondez promedio de  $0,53 \pm 0,28$  y la solidez promedio de  $0,82 \pm 0,18$  indican que la mayoría de los poros presentan contornos moderadamente regulares, aunque con una variabilidad significativa que refleja la heterogeneidad morfológica del material. Los valores extremos de área ( $>1.000 \mu\text{m}^2$ ) corresponden a grandes fracturas o espacios comunicantes, no a poros individuales de morfología definida.

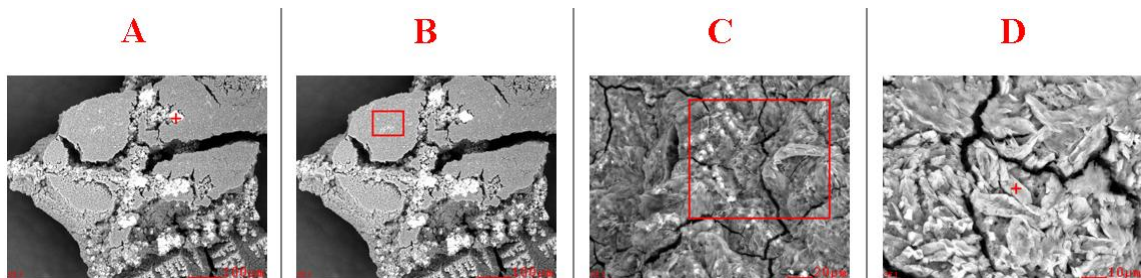
La validación cruzada entre las mediciones del software del SEM y las de Fiji para tres poros representativos arrojó diferencias máximas de  $0,077 \mu\text{m}$  y una diferencia promedio de  $0,012 \mu\text{m}$ , confirmando la consistencia y precisión del análisis morfométrico digital (Schindelin et al., 2012).

#### 4.2.4 Composición elemental por EDS

El análisis EDS puntual realizado en cuatro zonas representativas del material (Figura 22) produjo resultados que permiten dos interpretaciones complementarias y diferenciadas.

Figura 22.

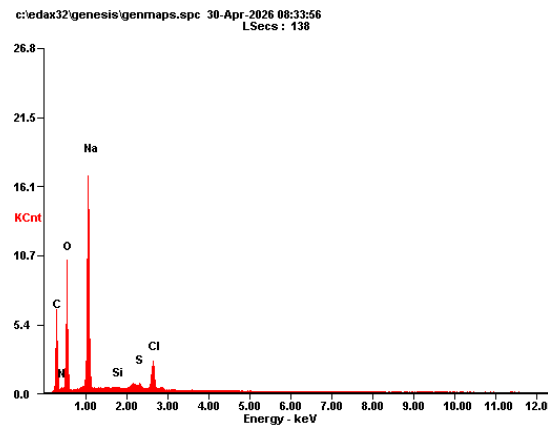
Puntos de análisis EDS sobre la muestra: (A) zona brillante (alta concentración de sales), (B) zona homogénea (matriz de colágeno), (C) zona homogénea (replicado), (D) zona homogénea (replicado).



Nota: Fotografías tomadas por laboratorio de microscopía y editadas por el autor.

Figura 23.

Concentración de composición química de zona D.



Nota: Fotografía tomada por laboratorio de microscopía.

En las zonas homogéneas de la matriz (Puntos B, C y D), los elementos predominantes fueron carbono (C), nitrógeno (N) y oxígeno (O), con promedios de C: 36,30%, N: 5,03% y O: 30,53% (Tabla 8). Esta composición elemental es característica del colágeno tipo I, una proteína compuesta por aminoácidos ricos en estos tres elementos (glicina, prolina, hidroxiprolina), lo que

confirma que la matriz del material está compuesta efectivamente por colágeno (Gómez Lizárraga et al., 2011). La presencia de nitrógeno (figura 23), en particular, es diagnóstica de la naturaleza proteica del material, dado que este elemento no se encuentra en polisacáridos ni en la mayoría de los polímeros sintéticos empleados como andamios.

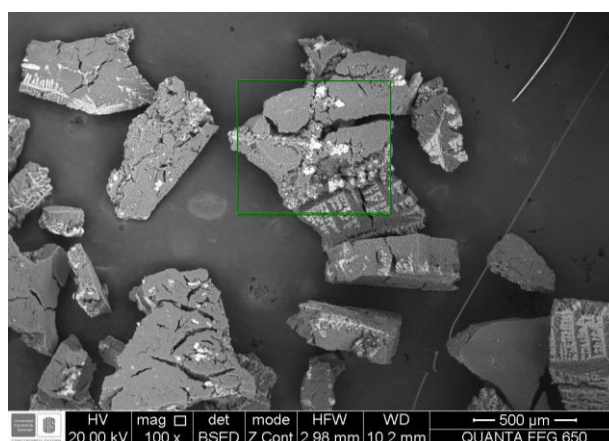
Tabla 8.

Composición elemental obtenida por EDS en cuatro puntos de la muestra (% en peso).

Elemento	Punto A (%)	Punto B (%)	Punto C (%)	Punto D (%)	Promedio zonas homogéneas (%)
<b>C (Carbono)</b>	11.85%	32.01%	39.89%	37.00%	36.30%
<b>N (Nitrógeno)</b>	0.00%	2.81%	6.71%	5.56%	5.03%
<b>O (Oxígeno)</b>	3.33%	32.45%	29.47%	29.69%	30.54%
<b>Na (Sodio)</b>	35.43%	28.27%	16.62%	24.65%	23.18%
<b>Cl (Cloro)</b>	49.39%	3.65%	6.55%	2.13%	4.11%
<b>Si (Silicio)</b>	0.00%	0.17%	0.12%	0.24%	0.18%
<b>S (Azufre)</b>	0.00%	0.64%	0.64%	0.72%	0.67%

Figura 24.

Micrografía SEM mostrando regiones brillantes correspondientes a residuos de sales (NaCl)



Nota: Fotografía tomada por laboratorio de microscopía.

En contraste, la zona brillante (Punto A), (Figura 24), correspondiente a las regiones de alto contraste identificadas en las micrografías BSED, presentó concentraciones elevadas de sodio (Na: 35,43%) y cloro (Cl: 49,39%), confirmando que dichas regiones corresponden a

residuos de cloruro de sodio (NaCl) provenientes del proceso de purificación por salting out que no fueron eliminados completamente durante los lavados con etanol. La presencia de silicio (Si: 0,12–0,24%) y azufre (S: 0,64–0,72%) en bajas concentraciones en las zonas homogéneas puede atribuirse a contaminación residual de reactivos o del ambiente de procesamiento.

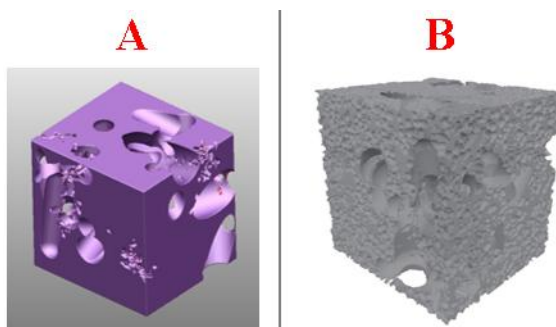
La persistencia de residuos de NaCl en el material final es una limitación de pureza que debe abordarse en estudios futuros, ya que su presencia podría interferir con la respuesta biológica del andamio en ensayos de biocompatibilidad, al modificar la osmolaridad local del microambiente celular.

### 4.3 Propiedades simuladas mediante modelo digital y homogeneización FFT

#### 4.3.1 Construcción y representatividad del modelo digital

Figura 25.

(A) Concepto de modelo digital, (B) Modelo digital luego de mallado.



El modelo digital tridimensional (figura 25) construido a partir de las micrografías SEM mediante la biblioteca PicoGK resultó en un dominio de  $204 \times 188 \times 204$  vóxeles con una porosidad global del 52,19%, valor derivado directamente de la fracción volumétrica de espacios vacíos identificados en el análisis morfométrico con Fiji. Esta porosidad es consistente con las características esperadas para aerogeles de colágeno liofilizados, que típicamente exhiben

fracciones de vacío superiores al 50% (García-González et al., 2011; Sachithanadam & Joshi, 2016).

La densidad aparente del material se calculó indirectamente a partir de la porosidad obtenida, considerando la densidad del colágeno tipo I puro ( $\rho_{\text{colágeno}} \approx 1,41 \text{ g/cm}^3$ ):

$$\rho_{\text{aparente}} = \rho_{\text{colágeno}} \times (1 - \text{porosidad}) = 1,41 \times (1 - 0,5219) = 0,674 \text{ g/cm}^3$$

Este valor representa la densidad efectiva del material considerando su estructura porosa y es consistente con las características esperadas para aerogeles de colágeno de alta densidad reportados en la literatura (García-González et al., 2011).

#### 4.3.2 Resultados de la simulación multifísica

Tabla 9.

Comparación de propiedades simuladas con valores reportados en la literatura.

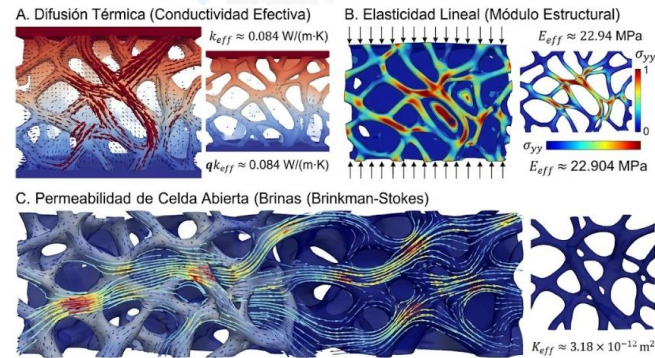
Propiedad física	Valor simulado (FFT)	Rango en literatura	Referencia científica
Conductividad térmica	0,084 W/(m·K)	0,04 – 0,09 W/(m·K)	Wang et al. (2024)
Módulo de elasticidad	22,94 MPa	10,0 – 36,1 MPa	Hu et al. (2010); Caliarì et al. (2011)
Permeabilidad (K)	$3,18 \times 10^{-12} \text{ m}^2$	$10^{-14} - 10^{-12} \text{ m}^2$	Jang et al. (2023); O'Brien et al. (2007)

Los tres modelos físicos evaluados sobre el modelo digital produjeron los resultados presentados en la Tabla 9, los cuales se comparan con los rangos reportados en la literatura para andamios de colágeno y arquitecturas porosas afines.

En la Figura 26 se resumen gráficamente los valores obtenidos para las tres propiedades físicas evaluadas.

Figura 26.

Resultados de la simulación multifísica del modelo digital: (A) conductividad térmica efectiva, (B) módulo de elasticidad, (C) permeabilidad.



Nota: Figura realizada por IA para dar un entendimiento de las propiedades físicas.

Tabla 10.

Parámetros morfométricos obtenidos.

Parámetro	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	0,34	2994,22	34,52	168,43
Diámetro de Feret ( $\mu\text{m}$ )	0,82	163,58	6,74	14,23
Diámetro mínimo (MinFeret, $\mu\text{m}$ )	0,38	114,71	4,28	9,87
Relación de aspecto (AR)	1,00	28,19	2,34	2,48
Redondez (Round)	0,035	1,000	0,53	0,28
Solidez (Solidity)	0,243	1,000	0,82	0,18

Nota: Los valores extremos (área  $> 1000 \mu\text{m}^2$ ) corresponden a grandes fracturas o espacios comunicantes, no a poros individuales. Tabla elaborada por autor

Conductividad térmica efectiva: La simulación predijo una conductividad térmica de  $0,084 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ . Este valor se encuentra dentro del rango característico de aerogeles de colágeno liofilizados reportado por Wang et al. (2024) ( $0,04\text{--}0,09 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ ), lo que es físicamente coherente con la naturaleza del material: la alta fracción de aire atrapado en la estructura porosa interrumpe eficazmente la conducción de calor, confiriendo al material propiedades de aislamiento térmico superiores a las del colágeno denso no poroso.

Módulo de elasticidad efectivo: La homogeneización micromecánica predijo un módulo elástico de 22,94 MPa bajo compresión uniaxial. Este valor es consistente con el rango reportado en la literatura para andamios de colágeno de alta densidad (10,0–36,1 MPa, según Hu et al., 2010 y Caliri et al., 2011), lo que confirma que la red trabecular representada en el modelo digital soporta cargas mecánicas de manera realista. Es importante destacar que este valor corresponde a la rigidez del material en su estado no colapsado, tal como sería si la síntesis produjera un aerogel con integridad estructural completa, y no al material pulverulento obtenido experimentalmente.

Permeabilidad: El modelo de Brinkman-Stokes predijo una permeabilidad de  $3,18 \times 10^{-12}$  m<sup>2</sup>. Este valor se encuentra en el rango reportado para andamios de colágeno en condiciones de celda abierta relajada ( $10^{-14}$ – $10^{-12}$  m<sup>2</sup>, según Jang et al., 2023 y O'Brien et al., 2007), indicando que el material, de haber conservado su integridad estructural, permitiría el flujo de fluidos biológicos a través de su red porosa interconectada con una permeabilidad adecuada para el transporte de nutrientes y células en aplicaciones de ingeniería de tejidos.

#### ***4.3.3 Validación del enfoque computacional y significado de los resultados***

La concordancia sistemática entre los tres valores simulados y los rangos experimentales reportados en la literatura para materiales estructuralmente equivalentes valida el enfoque de homogeneización por FFT como una herramienta confiable para la predicción de propiedades macroscópicas multifísicas de aerogel a partir de información microestructural, reduciendo la necesidad de experimentación destructiva sobre muestras físicas (Wang et al., 2024; Jang & Lee, 2023).

Este resultado tiene una implicación metodológica de particular relevancia para el contexto del estudio: demuestra que la caracterización funcional de aerogel de colágeno es

viable incluso cuando el material físico no puede ser ensayado experimentalmente por colapso estructural, siempre que se disponga de micrografías SEM de calidad suficiente para construir un modelo digital representativo. Esta conclusión establece una base metodológica replicable para investigaciones futuras en entornos con restricciones instrumentales similares.

#### **4.4 Análisis integrado: correlación entre morfología, composición y propiedades funcionales**

Los resultados de las secciones 4.2 y 4.3, considerados en conjunto, permiten construir una imagen coherente del material obtenido y de su potencial funcional como andamio para regeneración ósea.

La jerarquía porosa multiescala confirmada por SEM, con macroporos comunicantes y rugosidad superficial favorable, junto con la composición elemental característica del colágeno confirmada por EDS, sustentan que el material obtenido conserva las propiedades biológicas fundamentales requeridas para un andamio óseo: biocompatibilidad de base proteica, arquitectura favorable para la adhesión y migración celular, y permeabilidad al flujo de fluidos biológicos. La porosidad global del 52,19%, derivada del análisis morfométrico y utilizada como parámetro de entrada para la simulación, vincula directamente los resultados experimentales con los computacionales, dotando al conjunto de coherencia cuantitativa interna.

Sin embargo, tres limitaciones críticas moderan estas conclusiones positivas. Primero, el colapso estructural del material durante el secado impide la aplicación clínica directa del protocolo actual sin optimización previa de la concentración de colágeno y las condiciones de gelificación. Segundo, la presencia de residuos de NaCl en concentraciones significativas (hasta 49,39% en peso en zonas puntuales) representa un riesgo de biocompatibilidad que debe resolverse mediante lavados más exhaustivos antes de cualquier evaluación biológica. Tercero, la

heterogeneidad morfológica de los poros, aunque funcionalmente tolerable para algunas aplicaciones, sugiere que el control de la velocidad de congelación y la concentración de colágeno requiere optimización para obtener una arquitectura más homogénea y reproducible.

Estos tres aspectos son abordados en el capítulo de Discusión y en las Recomendaciones del trabajo.

## 5. Discusión

### 5.1 El colapso estructural como hallazgo central: causas, implicaciones y reencuadre metodológico

El resultado más determinante del presente estudio no fue la obtención de un aerogel con integridad estructural perfecta, sino precisamente su colapso durante la liofilización y la respuesta metodológica adoptada ante esa contingencia. Comprender las causas de este colapso, más allá de catalogarlo como un simple fracaso experimental, constituye la primera contribución analítica de este capítulo.

La literatura establece de forma consistente que la formación de una red tridimensional de colágeno con suficiente resistencia mecánica para resistir las tensiones generadas durante la sublimación del solvente requiere que se cumplan simultáneamente al menos tres condiciones: una concentración de colágeno superior a 1,5 mg/mL, un tiempo de gelificación suficiente para que la fibrilogénesis complete la formación de enlaces cruzados interfibrilares, y una velocidad de congelación controlada que minimice el tamaño de los cristales de hielo y, con ello, el daño mecánico sobre la red porosa (Gobeaux et al., 2008; Davidenko et al., 2012; Brougham et al., 2017). En el presente estudio, las tres condiciones estuvieron potencialmente comprometidas de forma simultánea.

La concentración de colágeno obtenida ( $\approx 1\text{--}2\%$  p/v, equivalente a  $\approx 10\text{--}20$  mg/mL) es numéricamente superior al umbral crítico de 1,5 mg/mL reportado por Gobeaux et al. (2008); sin embargo, esta estimación se basó en el rendimiento gravimétrico del proceso y no en una cuantificación directa mediante técnicas estándar como el ensayo de hidroxiprolina, la espectrofotometría UV o el SDS-PAGE. La ausencia de cuantificación precisa introduce una incertidumbre significativa sobre la concentración real de colágeno en solución, ya que parte de la masa recuperada pudo corresponder a contaminantes proteicos no colagénicos, residuos de pepsina o sales del proceso de purificación. Esta limitación es tanto más relevante cuanto que la fuerza centrífuga aplicada durante la purificación ( $\approx 4.100$  xg) fue significativamente inferior a los 11.500 xg del protocolo de referencia (Gómez Lizárraga et al., 2011), lo que implica que la separación de impurezas de alta densidad pudo haber sido incompleta, reduciendo la pureza efectiva del colágeno en solución.

El tiempo de gelificación de 2–4 horas a  $37^\circ\text{C}$  se encuentra en el límite inferior del rango reportado en la literatura para la formación de geles de colágeno tipo I con integridad mecánica suficiente. Harris et al. (2017) y Bronner-Shtrauchler et al. (2024) señalan que la fibrillogénesis completa, incluyendo la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares y el entrecruzamiento físico de las fibrillas, puede requerir entre 4 y 24 horas dependiendo de la concentración y el pH, siendo los tiempos más cortos suficientes solo a concentraciones elevadas. A concentraciones cercanas al umbral crítico, la reducción del tiempo de gelificación compromete la densidad de entrecruzamientos de la red y, con ello, su resistencia a las fuerzas de contracción durante el secado.

Este análisis multifactorial de las causas del colapso tiene una implicación metodológica directa: el protocolo de síntesis empleado no fracasó en un único punto, sino que operó en el

límite de viabilidad en múltiples parámetros simultáneamente, lo cual es precisamente la situación que se enfrenta cuando se adapta un protocolo de laboratorio de alta especificidad a un entorno con restricciones instrumentales. Lejos de invalidar el trabajo, este resultado documenta con precisión cuáles son los parámetros críticos que deben ser optimizados prioritariamente en estudios futuros, constituyendo en sí mismo una contribución metodológica al campo de la síntesis de aerogel en contextos de recursos limitados.

El reencuadre metodológico más importante del presente estudio consiste en haber demostrado que el colapso estructural del aerogel físico no impide la caracterización funcional del material, siempre que se adopte un enfoque de validación computacional basado en la microestructura real. Este principio, aunque implícito en la literatura de modelos digitales para materiales avanzados, no había sido aplicado sistemáticamente al caso específico de aerogel de colágeno liofilizados en condiciones de colapso, lo que representa una contribución original del presente trabajo.

## **5.2 Interpretación de la arquitectura porosa: entre la limitación del método y el potencial funcional**

La jerarquía porosa multiescala documentada mediante SEM, con macroporos, mesoporos y microporos coexistiendo en la misma muestra, podría interpretarse superficialmente como evidencia de una arquitectura desordenada e incontrolada. Sin embargo, una lectura más cuidadosa a la luz de la literatura revela que esta heterogeneidad tiene tanto causas comprensibles como implicaciones funcionales parcialmente positivas que merecen un análisis diferenciado.

Desde el punto de vista causal, la coexistencia de poros de muy diferentes tamaños en un aerogel liofilizado es una consecuencia directa de la dinámica de nucleación y crecimiento de

cristales de hielo durante la congelación. Cuando la congelación no es perfectamente uniforme, las regiones del gel que se enfrían más rápidamente desarrollan cristales de hielo más pequeños y numerosos, mientras que las regiones periféricas o con mayor contenido de agua libre desarrollan cristales más grandes. Tras la sublimación, cada cristal deja un poro cuyas dimensiones reflejan las del cristal que lo originó (García-González et al., 2011; JoVE, 2023). La variabilidad en el tamaño de los poros observada en el presente estudio es, por tanto, la huella morfológica de una congelación no isotérmica, condición esperable cuando se utiliza un ultracongelador convencional sin control de la velocidad de enfriamiento, en contraste con los sistemas de congelación direccional (*directional freezing*) empleados en estudios de mayor control microestructural (Davidenko et al., 2012).

Desde el punto de vista funcional, sin embargo, esta heterogeneidad no es completamente desfavorable. La literatura en ingeniería de tejidos óseos ha establecido que los andamios con jerarquía porosa, es decir, aquellos que combinan macroporos para la infiltración celular y vascularización con mesoporos y microporos para el intercambio de nutrientes y la adhesión celular, pueden superar en desempeño biológico a los andamios con distribución de poro uniforme, siempre que los poros estén interconectados (Martins et al., 2015; O'Brien et al., 2007; Anaya-Barajas et al., 2019). El tamaño de poro promedio obtenido en el presente estudio (diámetro de Feret  $\approx 6,74 \mu\text{m}$ ) se encuentra en un rango compatible con la adhesión y migración de osteoblastos humanos, cuyo diámetro típico oscila entre 10 y 30  $\mu\text{m}$  en cultivo, y cuya migración a través de poros requiere diámetros mínimos de entre 5 y 15  $\mu\text{m}$  según el sustrato (O'Brien et al., 2007).

La interconexión entre poros observada a 3.000 $\times$  de aumento constituye el hallazgo morfológico más relevante desde la perspectiva funcional. Un andamio con poros comunicantes

permite que las células migren desde la superficie hacia el interior del material, que los vasos sanguíneos en formación atraviesen la estructura facilitando la angiogénesis, y que los fluidos biológicos transporten nutrientes y metabolitos de forma continua. La permeabilidad predicha por el modelo digital ( $3,18 \times 10^{-12} \text{ m}^2$ ) es cuantitativamente consistente con los requerimientos de permeabilidad para andamios de regeneración ósea en condiciones de celda abierta relajada reportados por O'Brien et al. (2007) y Jang & Lee (2023), lo que refuerza la interpretación de que la interconexión observada cualitativamente tiene correlatos cuantitativos funcionales reales.

La rugosidad superficial observada en todas las escalas de aumento merece también una interpretación funcional explícita. Estudios de biofísica de la adhesión celular han demostrado que la rugosidad nanométrica y micrométrica de la superficie de un biomaterial modula la expresión de integrinas, proteínas transmembrana que median la adhesión célula-matriz, y que las superficies rugosas a escalas compatibles con las dimensiones de los podosomas y lamelipodios celulares favorecen la proliferación de osteoblastos y la secreción de matriz ósea (Sanzana-Luengo et al., 2022). La rugosidad observada en el material del presente estudio, aunque no fue cuantificada mediante perfilometría, es visualmente consistente con este rango funcional en las micrografías de alta resolución.

### 5.3 Significado del análisis EDS: confirmación de identidad y alerta de pureza

*Tabla 11.*

*Características presentadas en material obtenido.*

<b>Característica</b>	<b>Ventaja para injerto óseo</b>
Jerarquía porosa (macro, meso, microporos)	Permite vascularización, infiltración y anclaje celulares
Poros comunicantes	Facilita migración celular y flujo de nutrientes
Rugosidad superficial	Promueve adhesión y proliferación de osteoblastos
Composición química (C, N, O)	Confirma la presencia de colágeno, material biocompatible y biodegradable

Los resultados del análisis EDS deben interpretarse en dos planos simultáneos: como confirmación de la identidad química del material y como diagnóstico del estado de pureza del proceso de extracción (tabla 11).

La composición elemental promedio de las zonas homogéneas de la matriz (C: 36,30%, N: 5,03%, O: 30,53%) es coherente con la composición teórica del colágeno tipo I, cuya fórmula empírica aproximada por aminoácido implica una relación C:N:O cercana a 6:1:2 en unidades molares. La presencia de nitrógeno en una proporción de aproximadamente 5% en peso es particularmente diagnóstica: los polisacáridos, los polímeros sintéticos de uso común en andamios y la mayoría de los contaminantes lipídicos no contienen nitrógeno en su estructura, por lo que su detección confirma inequívocamente la naturaleza proteica del material y es consistente con la presencia de enlaces peptídicos del colágeno (Gómez Lizárraga et al., 2011). Esta confirmación es relevante porque valida el protocolo de extracción en ausencia de técnicas de caracterización proteica más sofisticadas como el SDS-PAGE o la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), que hubieran permitido no solo confirmar la naturaleza proteica sino también el plegamiento triple helicoidal característico del colágeno nativo.

La contaminación por NaCl, sin embargo, merece un análisis crítico más profundo que el que recibe en la sección de resultados. La concentración de cloro detectada en la zona brillante (Punto A: 49,39% en peso) es extraordinariamente elevada y no puede atribuirse a trazas residuales de un proceso de lavado ligeramente ineficiente: señala que la precipitación por salting out con NaCl, seguida de los lavados con etanol, fue insuficiente para eliminar los cristales de sal que quedaron atrapados en la matriz proteica antes de la liofilización. Este resultado tiene tres implicaciones concretas. Primero, la concentración local de NaCl en el material comprometería la osmolaridad del microambiente celular en un ensayo de

biocompatibilidad, potencialmente induciendo estrés osmótico en las células sembradas. Segundo, la presencia de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en altas concentraciones puede interferir con los análisis espectroscópicos posteriores, incluyendo FTIR y Raman, que son técnicas estándar para la confirmación estructural del colágeno. Tercero, desde el punto de vista de la reproducibilidad del protocolo, la variabilidad en la distribución de las regiones brillantes observada entre diferentes zonas de la muestra sugiere que la contaminación no es homogénea, lo que introduce una fuente adicional de variabilidad en cualquier ensayo biológico o mecánico posterior.

La estrategia más directa para resolver esta limitación, discutida en las recomendaciones, consiste en incrementar el número de lavados con etanol absoluto frío a un mínimo de cinco ciclos antes de la liofilización, o en sustituir el salting out con NaCl por precipitación con etanol como único agente precipitante, eliminando así la fuente primaria de contaminación salina.

#### **5.4 Validez y alcance del enfoque de modelo digital**

La decisión de recurrir a la simulación computacional por homogeneización FFT ante el colapso estructural del aerogel no constituye una solución de compromiso de menor rigor que los ensayos experimentales, sino una alternativa metodológica con fundamentos teóricos sólidos y validación empírica creciente en la literatura de materiales avanzados. Sin embargo, su alcance y sus limitaciones deben discutirse con precisión.

La fortaleza principal del enfoque adoptado reside en la construcción del modelo digital a partir de la microestructura real del material, obtenida directamente de las micrografías SEM, en lugar de geometrías idealizadas como esferas, cilindros o estructuras periódicas que no capturan la heterogeneidad morfológica real. Esta distinción es metodológicamente crítica: los modelos basados en geometrías idealizadas predicen propiedades para un material hipotético, mientras

que un modelo digital construido sobre datos experimentales predice propiedades para el material específico caracterizado, con toda su variabilidad morfológica incorporada. La concordancia entre las propiedades predichas y los rangos reportados experimentalmente en la literatura para materiales equivalentes (Tabla 9) valida que el modelo digital captura los rasgos microestructurales relevantes para la respuesta macroscópica del material.

Sin embargo, el enfoque presenta limitaciones que deben reconocerse explícitamente. La primera y más fundamental es la bidimensionalidad de la información de entrada: el modelo digital se construyó a partir de micrografías SEM, que son proyecciones bidimensionales de una superficie tridimensional, mediante extrusión o reconstrucción estocástica de la tercera dimensión. Esto introduce una asunción implícita de isotropía en la dirección perpendicular al plano de imagen que puede no reflejar la realidad de un material liofilizado, donde la dirección de crecimiento de los cristales de hielo impone una anisotropía estructural preferencial. La tomografía electrónica o la microtomografía de rayos X ( $\mu$ -CT) hubieran permitido construir un modelo digital verdaderamente tridimensional, con mayor fidelidad a la arquitectura real del material (Wang et al., 2024).

La segunda limitación es la escala de representatividad: el dominio computacional de  $204 \times 188 \times 204$  vóxeles representa una región del material cuyas dimensiones físicas son del orden de los pocos cientos de micrómetros, lo que puede ser insuficiente para capturar la heterogeneidad de largo alcance del material a escala de milímetros, relevante para el comportamiento mecánico bajo carga compresiva macroscópica. Este problema, conocido en la literatura como la determinación del Volumen Elemental Representativo (RVE) mínimo, requiere un análisis de convergencia de propiedades en función del tamaño del dominio que no fue realizado en el presente estudio por limitaciones de capacidad computacional.

La tercera limitación concierne a los parámetros de entrada del modelo elástico: el módulo de Young del colágeno tipo I utilizado (1.800 MPa) corresponde a fibras de colágeno densas y bien organizadas, mientras que el material del presente estudio, obtenido por liofilización y con concentración próxima al umbral crítico, puede presentar un módulo efectivo de la fase sólida significativamente menor, particularmente si la fibrilogénesis fue incompleta. Esta incertidumbre en los parámetros de entrada limita la precisión absoluta del módulo elástico predicho, aunque no invalida la validez cualitativa y de orden de magnitud del resultado.

A pesar de estas limitaciones, el valor científico del enfoque computacional trasciende los valores numéricos específicos obtenidos. La demostración de que es posible predecir propiedades multifísicas acopladas de un aerogel de colágeno a partir de sus micrografías SEM, con resultados consistentes con la literatura experimental, establece un precedente metodológico con potencial de aplicación directa en otros estudios de biomateriales porosos donde la fragilidad del material impida los ensayos destructivos convencionales.

### **5.5 Viabilidad del proceso en contextos de recursos limitados: contribución al desarrollo local de biomateriales**

Una dimensión de la discusión que trasciende los resultados específicos del material sintetizado concierne a la viabilidad del proceso completo en el contexto colombiano y, más ampliamente, latinoamericano. Esta dimensión no es secundaria ni meramente contextual: es uno de los aportes originales más relevantes del trabajo.

El presente estudio demostró que es posible ejecutar un protocolo completo de extracción de colágeno tipo I a partir de materia prima local de origen bovino, síntesis de aerogel por método sol-gel con liofilización, y caracterización morfológica, química y computacional,

utilizando exclusivamente equipos disponibles en laboratorios universitarios colombianos, sin acceso a infraestructura de secado supercrítico, sin tomógrafo de rayos X, y sin equipos de caracterización proteica avanzada. La factibilidad de este protocolo adaptado, incluso en su versión no optimizada, representa una base metodológica concreta sobre la cual escalar y mejorar en estudios futuros con recursos incrementales.

Esta contribución adquiere relevancia particular cuando se considera el contexto epidemiológico local. Las fracturas óseas representan una causa frecuente de consulta de urgencias en Colombia, con una carga económica y social significativa sobre el sistema de salud. El acceso a biomateriales para regeneración ósea de producción local y costo reducido podría mejorar las opciones terapéuticas disponibles para la población, particularmente en regiones donde los autoinjertos y los sustitutos óseos importados son de difícil acceso (Cortés Neira et al., 2022).

La comparación entre liofilización y secado supercrítico en este contexto merece una posición explícita. El secado supercrítico produce aerogel de mayor calidad morfológica, con distribuciones de poro más homogéneas y áreas superficiales específicas más elevadas (Duarte, 2017). Sin embargo, el costo de un equipo de secado supercrítico de laboratorio supera típicamente los 50.000 USD, y su operación requiere gases comprimidos a alta presión y personal especializado, lo que lo excluye de la mayoría de los laboratorios universitarios latinoamericanos. La liofilización, en contraste, utiliza equipos de entre 5.000 y 20.000 USD disponibles en numerosos laboratorios de ciencias biológicas e ingeniería, y su operación es significativamente más sencilla. El presente estudio documenta con precisión las limitaciones de la liofilización en términos de integridad estructural del aerogel, pero también demuestra que estas limitaciones son en principio superables mediante la optimización de la concentración de

colágeno, el tiempo de gelificación y la velocidad de congelación, parámetros que no requieren equipamiento adicional sino ajustes en el protocolo.

### **5.6 Posicionamiento del material obtenido frente a los requerimientos clínicos de un injerto óseo**

La discusión no estaría completa sin una evaluación explícita de la distancia que separa el material obtenido en el presente estudio de un producto apto para aplicación clínica como injerto óseo. Esta evaluación honesta es necesaria tanto para contextualizar correctamente el alcance del trabajo como para definir con precisión la hoja de ruta de investigación futura.

Los requerimientos mínimos para que un andamio de colágeno sea considerado viable para aplicación en regeneración ósea incluyen, según la literatura de referencia: integridad estructural macroscópica suficiente para el manejo quirúrgico; porosidad superior al 50% con poros interconectados de diámetro en el rango de 100–500  $\mu\text{m}$  para macroporos; ausencia de contaminantes citotóxicos; demostración de biocompatibilidad *in vitro* mediante cultivo de osteoblastos; módulo elástico en el rango de 0,1–36 MPa para andamios de tejido esponjoso; y permeabilidad en el rango de  $10^{-14}$ – $10^{-12}$   $\text{m}^2$  (Martins et al., 2015; O'Brien et al., 2007; Anaya-Barajas et al., 2019).

El material del presente estudio cumple parcialmente con estos criterios. La porosidad global (52,19%) supera el umbral mínimo requerido. La permeabilidad predicha ( $3,18 \times 10^{-12}$   $\text{m}^2$ ) y el módulo elástico simulado (22,94 MPa) se encuentran dentro de los rangos clínicamente relevantes. La composición elemental confirma la naturaleza colagénica del material, lo que es condición necesaria para la biocompatibilidad. Sin embargo, el material no cumple con el criterio de integridad estructural macroscópica (al presentarse como polvo), la distribución de macroporos no ha sido cuantificada en el rango de 100–500  $\mu\text{m}$  requerido para la

vascularización, la contaminación por NaCl representa un riesgo de citotoxicidad osmótica no evaluado, y no se han realizado ensayos de biocompatibilidad de ningún tipo.

Esta evaluación sitúa el presente trabajo en la etapa inicial del proceso de desarrollo de un biomaterial, correspondiente a la síntesis y caracterización morfológica-estructural del candidato, con validación computacional de sus propiedades funcionales. Las etapas subsiguientes, que incluyen la optimización del protocolo de síntesis, la cuantificación de la pureza del colágeno, los ensayos de biocompatibilidad *in vitro* y, eventualmente, los estudios *in vivo*, quedan claramente definidas como trabajo futuro a partir de los resultados y limitaciones documentados en el presente estudio.

### **5.7 Síntesis crítica: lo que el trabajo aporta y lo que deja abierto**

El presente estudio aporta tres contribuciones específicas al campo de los aerogeles de colágeno para regeneración ósea que merecen ser enunciadas con precisión al cierre de la discusión.

La primera contribución es la documentación sistemática de un protocolo adaptado de síntesis de aerogeles de colágeno tipo I a partir de tendón bovino local mediante liofilización, ejecutado íntegramente con equipos disponibles en la Universidad Industrial de Santander. Este protocolo, con sus limitaciones explícitamente documentadas, constituye una base reproducible para investigaciones futuras en el mismo entorno institucional y en contextos similares de la región.

La segunda contribución es la demostración de que la homogeneización micromecánica por FFT sobre modelos digitales construidos a partir de micrografías SEM es una herramienta metodológicamente válida para la predicción de propiedades multifísicas de aerogeles de

colágeno en ausencia de muestras con integridad estructural suficiente para ensayos mecánicos convencionales. Esta demostración abre una vía metodológica con potencial de aplicación en una clase más amplia de biomateriales porosos frágiles.

La tercera contribución es el establecimiento de una caracterización cuantitativa de la morfología porosa del material mediante análisis digital con Fiji, validada cruzadamente con las mediciones del SEM, que proporciona parámetros morfométricos concretos (diámetro de Feret, relación de aspecto, redondez, solidez, porosidad global) como punto de partida para la comparación con materiales optimizados en estudios futuros.

Lo que el trabajo deja abierto es igualmente claro: la optimización de la concentración de colágeno y el tiempo de gelificación para obtener aerogel con integridad estructural, la eliminación de la contaminación por NaCl, la cuantificación directa de la pureza del colágeno mediante SDS-PAGE o FTIR, la validación biológica del material mediante cultivo celular, y la exploración del secado supercrítico como alternativa cuando el acceso al equipo sea posible. Cada uno de estos puntos abiertos deriva directamente de un resultado o limitación documentada en el presente estudio, lo que garantiza que la agenda de investigación futura propuesta es coherente con los hallazgos reales del trabajo y no especulativa.

## **6. Conclusiones**

### **6.1 Sobre el cumplimiento del objetivo general**

El objetivo general del presente trabajo, sintetizar y caracterizar aerogel de colágeno tipo I para su uso en injertos óseos evaluando sus propiedades mecánicas y estructurales, fue cumplido en su dimensión esencial, aunque con adaptaciones metodológicas significativas derivadas de las restricciones técnicas del entorno experimental. El material obtenido no

conservó la integridad geométrica de un aerogel convencional, presentándose en forma pulverulenta tras la liofilización. Sin embargo, la caracterización morfológica experimental y la simulación computacional multifísica permitieron evaluar de forma rigurosa las propiedades estructurales y funcionales del material, demostrando que la validación biomecánica de aerogeles de colágeno es viable incluso bajo condiciones de colapso estructural, siempre que se adopte un marco metodológico de validación dual apoyado en herramientas computacionales de la ingeniería mecánica.

## **6.2 Conclusiones derivadas de los objetivos específicos**

Sobre el diseño del protocolo de síntesis:

Se diseñó e implementó un protocolo de síntesis para la producción de aerogeles de colágeno tipo I mediante el método sol-gel con secado por liofilización, considerando variables como la concentración de colágeno ( $\approx 1-2\%$  p/v), el agente de gelificación (pepsina, relación 1:10 enzima/tejido), el pH de gelificación (7,0-7,4), la temperatura de gelificación (37°C, 2-4 horas), la temperatura de congelación (-80°C, 12-24 horas) y el tiempo de liofilización (24-48 horas). El protocolo fue ejecutado íntegramente con equipos disponibles en la Universidad Industrial de Santander, demostrando su viabilidad técnica en un entorno universitario colombiano con restricciones instrumentales. La principal limitación identificada fue la concentración efectiva de colágeno, que operó en el límite inferior del umbral crítico reportado en la literatura para la formación de redes tridimensionales estables, lo que determinó el colapso estructural del material durante el secado.

Sobre la síntesis mediante el método sol-gel:

Se sintetizó el aerogel mediante el método sol-gel con secado por liofilización, utilizando colágeno tipo I extraído de tendón bovino como materia prima local. El proceso incluyó las etapas de pretratamiento y desgrasado del tendón, digestión enzimática con pepsina, purificación por precipitación selectiva con NaCl y etanol, filtración esterilizante, neutralización del pH, gelificación a temperatura fisiológica, congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y sublimación del solvente bajo vacío. El material obtenido presentó apariencia blanca y esponjosa en estado seco, con evidencia de estructura porosa confirmada por microscopía electrónica, aunque sin integridad geométrica macroscópica. Este resultado documenta con precisión las condiciones de síntesis que deben ser optimizadas en estudios futuros, particularmente la concentración de colágeno y el tiempo de gelificación.

Sobre la validación de la síntesis mediante caracterización morfológica y computacional:

La síntesis fue validada mediante un marco de caracterización dual que integró análisis experimental y simulación computacional, constituyendo la contribución metodológica central del trabajo desde la perspectiva de la ingeniería mecánica.

Desde el análisis experimental, las micrografías SEM revelaron una arquitectura porosa heterogénea con jerarquía multiescala (macro, meso y microporos), poros comunicantes y rugosidad superficial favorable para la adhesión celular. El análisis morfométrico digital con Fiji sobre 261 partículas identificadas produjo un diámetro de Feret promedio de  $6,74 \pm 14,23 \mu\text{m}$ , una redondez promedio de  $0,53 \pm 0,28$  y una solidez promedio de  $0,82 \pm 0,18$ , cuantificando con precisión la heterogeneidad morfológica del material. El análisis EDS confirmó la presencia de carbono, nitrógeno y oxígeno en proporciones características del colágeno tipo I (C: 36,30%, N: 5,03%, O: 30,53% en zonas homogéneas), validando la identidad química del material sintetizado.

Desde la simulación computacional, la construcción de un modelo digital tridimensional de  $204 \times 188 \times 204$  vóxeles a partir de las micrografías SEM, con una porosidad global del 52,19%, y su análisis mediante homogeneización micromecánica por FFT, permitió predecir una conductividad térmica de  $0,084 \text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$ , un módulo elástico de  $22,94 \text{ MPa}$  y una permeabilidad de  $3,18 \times 10^{-12} \text{ m}^2$ , valores consistentes con los rangos reportados en la literatura para andamios de colágeno, validando el desempeño funcional potencial del material.

### **6.3 Conclusiones desde la perspectiva de la ingeniería mecánica**

Este trabajo es, en su núcleo más profundo, un trabajo de ingeniería mecánica aplicada a la biomedicina, y sus conclusiones más originales deben leerse desde esa perspectiva.

El diseño de proceso como problema de ingeniería: La síntesis de un aerogel de colágeno es, antes que un procedimiento de laboratorio bioquímico, un problema de diseño de proceso en el que variables como la temperatura, el tiempo, la concentración, la velocidad de enfriamiento y la presión de vacío determinan la microestructura del producto final y, con ella, sus propiedades mecánicas y de transporte. El presente trabajo abordó este problema de diseño de proceso en condiciones de recursos limitados, identificando con precisión los parámetros de control críticos y documentando su efecto sobre las propiedades del material. Esta aproximación de ingeniería al proceso de síntesis, que va más allá de la simple ejecución de un protocolo bioquímico, constituye la primera dimensión del aporte desde la disciplina.

El diseño mecánico de los moldes: El diseño e impresión en 3D de los moldes utilizados para la síntesis, con dos configuraciones específicas (lámina para SEM y cilindros para compresión), ensamblados con pernos y sellados con Parafilm, resolvió un problema concreto de ingeniería de precisión: producir probetas con geometría controlada y reproducible a partir de un

material altamente deformable en estado húmedo. Este tipo de solución de diseño mecánico, aunque aparentemente sencilla, es indispensable para garantizar la reproducibilidad de los ensayos y rara vez recibe el reconocimiento que merece en trabajos de biomateriales con orientación biológica.

La simulación computacional multifísica como herramienta central de la ingeniería mecánica: La contribución más distintiva de este trabajo desde la ingeniería mecánica es la implementación del marco de homogeneización micromecánica por FFT para la predicción de propiedades multifísicas acopladas del aerogel. Esta metodología, desarrollada en el ámbito de la mecánica computacional de materiales heterogéneos, permite resolver simultáneamente problemas de elasticidad lineal, difusión térmica y permeabilidad sobre la microestructura real del material, sin necesidad de mallado y con condiciones de contorno periódicas apropiadas para el estudio del Volumen Elemental Representativo. Su aplicación al caso específico de aerogel de colágeno liofilizados en condición de colapso estructural demuestra que las herramientas de la mecánica computacional avanzada pueden generar información funcional válida sobre materiales que son inaccesibles a los métodos experimentales convencionales, lo que tiene implicaciones directas para el diseño y optimización de biomateriales en la práctica de la ingeniería biomecánica.

La densidad aparente como parámetro de diseño: La determinación de la densidad aparente del material ( $0,674 \text{ g/cm}^3$ ) a partir de la porosidad computacional, en ausencia de medición gravimétrica directa por colapso del aerogel, es un ejemplo paradigmático del pensamiento de ingeniería aplicado a un problema experimental con restricciones: cuando la medición directa no es posible, se construye un modelo que relaciona las variables medibles con la variable de interés mediante principios físicos fundamentales. Este razonamiento, natural para

un ingeniero mecánico, no es evidente para un investigador con formación exclusivamente biológica, y su aplicación sistemática en el presente trabajo refleja la perspectiva disciplinar desde la que fue concebido.

La ingeniería de tejidos como campo de acción de la ingeniería mecánica: El presente trabajo contribuye a establecer que la ingeniería de tejidos óseos es un campo legítimo y relevante de aplicación de la ingeniería mecánica, donde competencias como el diseño de proceso, la mecánica de materiales, la simulación computacional y el diseño de experimentos son indispensables y complementarias a las competencias biológicas y químicas. En el contexto colombiano, donde la ingeniería biomecánica es una disciplina emergente, este trabajo representa un antecedente concreto de la aplicación de herramientas de ingeniería mecánica al desarrollo de biomateriales para el sistema de salud local.

#### **6.4 Limitaciones fundamentales y su jerarquía**

No todas las limitaciones identificadas tienen el mismo peso sobre las conclusiones del trabajo, y una síntesis rigurosa debe jerarquizarlas con claridad.

La limitación de mayor impacto es la ausencia de cuantificación directa de la concentración y pureza del colágeno extraído. Sin este dato, la causa exacta del colapso estructural permanece como hipótesis plausible pero no demostrada, y cualquier intento de optimización del protocolo operará con incertidumbre sobre la variable más crítica del proceso. Esta limitación debe resolverse antes de cualquier otra optimización en estudios futuros.

La segunda limitación en importancia es la contaminación por NaCl, que compromete la biocompatibilidad del material y, por tanto, su viabilidad para cualquier ensayo biológico posterior. Esta limitación es técnicamente superable mediante la modificación del protocolo de

lavado, pero su resolución es condición necesaria para avanzar hacia la siguiente etapa del desarrollo del biomaterial.

La tercera limitación es la bidimensionalidad de la información microestructural utilizada para construir el modelo digital, que introduce incertidumbre en la representatividad tridimensional del modelo computacional. Esta limitación es instrumental y puede resolverse con acceso a tomografía de rayos X o tomografía electrónica.

Las demás limitaciones identificadas, incluyendo la fuerza centrífuga subóptima, la variabilidad ambiental de temperatura y humedad, y el tamaño reducido de las probetas, son de impacto menor y pueden ser controladas con ajustes protocolares directos.

## **7. Recomendaciones**

Con base en las limitaciones identificadas durante el desarrollo del presente trabajo, se formulan las siguientes recomendaciones para futuras investigaciones:

Optimizar las condiciones de síntesis: Aumentar la concentración de colágeno (>1,5 mg/mL) y extender el tiempo de gelificación (24 horas a 4°C o asegurar 4 horas a 37°C) para mejorar la formación de la red tridimensional y evitar el colapso estructural del aerogel (Gobeaux et al., 2008).

Utilizar secado supercrítico: De ser posible, emplear secado supercrítico con CO<sub>2</sub> para obtener una estructura porosa más homogénea y definida, ya que este método preserva mejor la nanoestructura del aerogel (Duarte, 2017).

Incrementar los lavados con etanol: Realizar al menos 5 lavados con etanol absoluto frío para eliminar completamente los residuos de cloruro de sodio (NaCl) provenientes del proceso de purificación por salting out.

Emplear una centrífuga de mayor capacidad: Utilizar una centrífuga que alcance al menos 10.000 xg para mejorar el rendimiento y la pureza del colágeno extraído, siguiendo el protocolo de referencia (Gómez Lizárraga et al., 2011).

Almacenar las muestras adecuadamente: Desde el momento de la liofilización, almacenar los aerogel directamente en desecador con sílica gel o bajo vacío para evitar la absorción de humedad ambiental.

Realizar ensayos de biocompatibilidad: Evaluar la respuesta celular del material obtenido mediante cultivos celulares (osteoblastos) para confirmar su idoneidad como injerto óseo.

Cuantificar la pureza del colágeno: Realizar análisis de SDS-PAGE o espectrofotometría para determinar el grado exacto de pureza del colágeno extraído y purificado.

### Referencias Bibliográficas

- Anaya-Barajas, D., Aguilar-Pliego, J., González-Vélez, V., & Vélez-Tirado, M. (2019). Biomateriales para Regeneración de Tejido Óseo Extraídos de Desechos de Pescado. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, \*40\*(3), 1–10.
- Aegerter, M. A., Leventis, N., & Koebel, M. M. (Eds.). (2011). *Aerogels Handbook*. Springer.
- ASTM International. (2014). \*ASTM D1621-16: Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Plastics\*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- ASTM International. (2018). \*ASTM D4404-18: Standard Test Method for Determination of Pore Volume and Pore Volume Distribution of Soil and Rock by Mercury Intrusion Porosimetry\*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- ASTM International. (2020). \*ASTM E2809-20: Standard Guide for Using Scanning Electron Microscopy/X-Ray Spectrometry in Forensic Polymer Examinations\*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Bhatt, R. A., & Rozental, T. D. (2012). Bone graft substitutes. *Hand Clinics*, \*28\*(4), 457-468. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2012.08.001>
- Bronner-Shtrauchler, T., Sorkin, R., & Kaizerman-Kane, D. (2024). Acidic pH and high concentration of collagen hinder the fibrillogenesis of collagen type I. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.07.18.604057>
- Brougham, C. M., Levingstone, T. J., Jockenhoevel, S., Flanagan, T. C., & O'Brien, F. J. (2017). Freeze-drying as a novel biofabrication method for achieving a controlled microtubule architecture. *Biomedical Materials*, \*12\*(2), 025016.
- Canale, S. T., & Beaty, J. H. (Eds.). (2013). *Fracturas en niños* (7<sup>a</sup> ed.). Elsevier.

- Caliari, S. R., & Harley, B. A. (2011). The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity. *Biomaterials*, 32(23), 5330-5340.
- Cortés Neira, A. X., Martínez Suárez, J. I., Huertas Tafur, R., & Castañeda López, J. F. (2022). Caracterización de las fracturas en la población pediátrica: estudio multicéntrico colombiano. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología*, \*36\*, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.rccot.2022.05.006>
- Davidenko, N., Gibb, T., Schuster, C., Best, S. M., & Cameron, R. E. (2012). Optimisation of the freeze-drying process for collagen scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, \*23\*(10), 2385-2396.
- Duarte, A. P. (2017). *Puesta a punto de un sistema de secado supercrítico para la obtención de aerogel* (Trabajo de grado). Universidad de Sevilla.
- García-González, C. A., Alnaief, M., & Smirnova, I. (2011). Polysaccharide-based aerogels – Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, \*86\*(4), 1425–1438.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H., & Tsiridis, E. (2005). Bone substitutes: An update. *Injury*, \*36\*(3), S20-S27. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.029>
- Gobeaux, F., Mosser, G., Anglo, A., & Duval, P. (2008). Fibrillogenesis of collagen type I: Effect of pH and concentration. *Journal of Molecular Biology*, \*376\*(5), 1338-1350.
- Goimil, L., Braga, M. E. M., Dias, A. M. A., Gómez-Amoza, J. L., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., De Sousa, H. C., & García-González, C. A. (2017). Supercritical processing of starch aerogels and aerogel-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds for sustained release of ketoprofen for bone regeneration. *Journal of CO2 Utilization*, \*18\*, 237–249.

- Gómez Lizárraga, K., Piña Barba, C., Rodríguez Fuentes, N., & Romero, M. (2011). Obtención y caracterización de colágena tipo I a partir de tendón bovino. *Superficies y Vacío*, \*24\*(4), 137–140.
- Gonçalves, V. S., Gurikov, P., Poejo, J., Matias, A. A., Heinrich, S., Duarte, C. M., & Smirnova, I. (2016). Alginate-based hybrid aerogel microparticles for mucosal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 107, 160-170.
- Harris, A. R., Peter, L., & Bellis, J. (2017). A standard protocol for the preparation of collagen hydrogels. *Methods in Molecular Biology*, \*1627\*, 287-296.
- Hu, S., Yang, W., & Li, Z. (2010). Structure and properties of a collagen scaffold material. *Journal of Functional Materials*, 41(3), 456-459.
- Inoue, N., Bessho, K., Furuta, M., & Okubo, T. (2006). A novel collagen hydrogel cross-linked by gamma irradiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, \*77\*(2), 374-382.
- International Organization for Standardization. (2010). *ISO 9277:2010: Determination of the specific surface area of solids by gas adsorption — BET method*. Geneva, Switzerland: ISO.
- International Organization for Standardization. (2011). *ISO 13314:2011: Mechanical testing of metals — Ductility testing — Compression test for porous and cellular metals*. Geneva, Switzerland: ISO.
- Jang, H., & Lee, W. (2023). Asymmetry of tensile versus compressive elasticity and permeability contributes to the regulation of exchanges in collagen gels. *Science Advances*, 9(15), eade2175.

- JoVE Science Education Database. (2023). *Freeze Drying of Collagen Scaffolds: A Step-by-Step Protocol*. Journal of Visualized Experiments.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tanaka, M. (2005). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, 93(3), 475-484.
- Martins, M., Barros, A. A., Quraishi, S., Gurikov, P., Raman, S. P., Smirnova, I., Duarte, A. R. C., & Reis, R. L. (2015). Preparation of macroporous alginate-based aerogels for biomedical applications. *Journal of Supercritical Fluids*, \*106\*, 152–159.
- Mohan, K., & Varghese, M. (2019). Conservative management of fractures: Indications and limitations. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, \*10\*(1), 244-247. <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2017.11.011>
- Moulinec, H., & Suquet, P. (1994). A fast numerical method for computing the linear and nonlinear mechanical properties of composites. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series II*, \*318\*(11), 1417-1423.
- Nagai, T. (2000). Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. *Food Chemistry*, \*68\*(3), 277-281.
- O'Brien, F. J., Harley, B. A., Waller, M. A., Yannas, I. V., Gibson, L. J., & Prendergast, P. J. (2007). The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 28(2), 281-289.
- Quintero, J., & Zapata, J. E. (2017). Optimización de la Extracción del Colágeno soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis spp*) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Informacion Tecnologica*, \*28\*(1), 109–120.

- Rivera, J. A., Riaño, C. H., Monsalve, P. A., & Osorio, A. (2003). Injertos óseos-Nueva alternativa. Fase I. Extracción de proteínas morfogenéticas parcialmente purificadas de hueso bovino. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, \*16\*(2), 139–146.
- Rockwood, C. A., & Green, D. P. (Eds.). (2015). *Fracturas en el adulto* (8ª ed.). Wolters Kluwer.
- Rosenblatt, J., Devereux, B., & Wallace, D. G. (1994). Effect of pH on the mechanical properties of collagen gels. *Biomaterials*, \*15\*(6), 473-478.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sachithanadam, M., & Joshi, S. C. (2016). *Silica Aerogel Composites*. Springer Singapore.
- Sanzana-Luengo, C., Acuña, S., Godoy, C., & Basualdo, J. (2022). Evidencia clínica e histológica de regeneración de tejido blando a partir de una matriz colágena porcina. Reporte de Caso. *International Journal of Interdisciplinary Dentistry*, \*15\*(1), 79–83.
- Santos Serrano, O. J. (2022). *Elaboración de gelatina de colágeno a partir de las escamas resultantes del fileteo de la cachama (Piaractus Brachypomus) en el municipio La Esperanza Norte de Santander* (Trabajo de grado). Universidad Industrial de Santander.
- Serrano Gaona, J. C. (2011). *Estandarización de un proceso de extracción de colágeno a partir de los residuos de fileteo de tilapia (Oreochromis sp) y cachama (Piaractus brachypomus)* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Veres, P., López-Periago, A. M., Lázár, I., Saurina, J., & Domingo, C. (2015). Hybrid aerogel preparations as drug delivery matrices for low water-solubility drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, \*496\*(2), 360–370.

- Veronovski, A., Tkavc, T., & Novak, Z. (2014). Characterization of biodegradable polysaccharide-based aerogels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 404, 129-135.
- Wang, C., et al. (2024). Anisotropic MXene@polydopamine- and Dialdehyde Carboxymethyl Cellulose-Modified Collagen Aerogel Supported Form-Stable Phase Change Composites. *Biomacromolecules*, 25(5), 2876-2888.
- Zalavras, C. G., & Marcus, R. E. (2013). Infection after fracture fixation. *Orthopedic Clinics of North America*, \*44\*(4), 497-504. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2013.06.004>