



Modelización del comportamiento mecánico de hidrogeles de colágeno a partir de su microestructura

Elías Núñez-Ortega¹, Pablo Blázquez-Carmona¹, Raquel Ruiz-Mateos-Brea¹,
José E. Martín-Alfonso², José A. Sanz-Herrera¹, Esther Reina-Romo¹

¹ Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Sevilla, elias.nunez.ortega@gmail.com, pbcarmona@us.es,
r Ruiz-mateos@us.es, jsanz@us.es, erreina@us.es

² Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Huelva, jose.martin@diq.uhu.es

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales reticulares, compuestas por cadenas de polímeros hidrófilos capaces de absorber grandes cantidades de agua. Esta propiedad les permite cambiar de volumen, lo cual es útil en aplicaciones como la administración de fármacos o la ingeniería de tejidos. Según su origen, los hidrogeles pueden ser naturales o sintéticos. Un ejemplo natural es el colágeno, la proteína estructural más abundante en mamíferos, de naturaleza fibrosa y responsable de mantener unidos los tejidos conectivos.

Por su parte, la reología es una disciplina clave para caracterizar mecánicamente los hidrogeles de colágeno, midiendo la deformación que experimentan bajo una tensión de cizalladura aplicada. Este método permite estudiar su comportamiento mecánico, que es altamente no lineal y muy dependiente de su microestructura. En este trabajo, se ha desarrollado una metodología para reproducir in silico el comportamiento mecánico obtenido mediante un ensayo reológico en un hidrogel a base de colágeno bovino con una concentración de 0.8 mg/ml.

La metodología propuesta reconstruye computacionalmente la red fibrilar real de colágeno, simulando las diferentes longitudes y tortuosidades de las fibras, a partir de imágenes de microscopía del hidrogel obtenidas con la técnica Focused Ion Beam - Scanning Electron Microscopy (FIB - SEM). Posteriormente, para reproducir in silico el ensayo de reología, se utiliza un modelo multiescala que permite obtener el comportamiento mecánico macroscópico de una matriz de fibras a partir de la interacción micromecánica de las fibras. La simulación computacional de la red fibrilar reconstruida es capaz de reproducir la respuesta mecánica no lineal observada en la prueba experimental.

Esta metodología permite obtener computacionalmente las propiedades reológicas de hidrogeles o redes de fibras, pudiendo ser una herramienta útil para comprender su comportamiento mecánico.

1. Introducción

Los hidrogeles son materiales tridimensionales poliméricos que tienen la capacidad de absorber grandes volúmenes de agua sin diluirse [1,2]. Esto es posible gracias a sus estructuras reticuladas, las cuales favorecen la absorción de agua a la vez que preservan la integridad de la red. Los hidrogeles a base de colágeno son materiales viscoelásticos no lineales, con un comportamiento mecánico que presenta una alta no linealidad y depende en gran medida de su microestructura. Las propiedades mecánicas de estos materiales están condicionadas por factores como el tipo de colágeno, la concentración utilizada, el método de reticulación o las condiciones de fabricación, entre otros [3,4].

Por su parte, los ensayos de reología constituyen una importante herramienta para examinar las propiedades mecánicas de los hidrogeles, generando información que puede emplearse para modificar sus características según los requisitos de las aplicaciones. Existen diversos tipos de ensayos reológicos, como los barridos de frecuencia, de tensión o de deformación, entre otros [5], que han demostrado ser útiles para comprender y caracterizar el comportamiento de estos materiales. En este contexto, se han estudiado experimentalmente las propiedades viscoelásticas de hidrogeles de colágeno de origen animal, por ejemplo, obtenidos a partir de cola de rata, tejido porcino o piel de ternero [6–8].

Además del análisis experimental, los modelos computacionales permiten simular la respuesta mecánica de las estructuras de redes de fibras, y se dividen en modelos continuos y discretos. Los modelos continuos evalúan la respuesta global de la matriz desde un enfoque fenomenológico, utilizando funciones polinómicas, exponenciales, entre otros tipos [9,10]. Aunque estos modelos son útiles para aproximar el comportamiento mecánico de la red de fibras, no modelan las fibras de forma individual, lo que limita la capacidad de obtener información detallada sobre la microestructura de la red.

En cambio, los modelos discretos modelan la microestructura de la red considerando componentes individuales. Estos modelos pueden simular matrices de fibras en 2D o 3D, omitiendo o representando las interacciones entre fibras [11,12]. Como ejemplo, Sanz-Herrera et al. [13] desarrollaron un modelo multiescala con el que analizar el comportamiento mecánico de matrices 3D de fibras curvadas. En su estudio, estos autores estudiaron la mecánica de una fibra aislada y elaboraron un modelo para reproducir matrices de fibras basadas en la densidad de fibras deseada y su geometría, someténdolas a tracción, compresión y cizallamiento simple para calcular sus respuestas mecánicas. Otro enfoque dentro de los modelos discretos consiste en utilizar imágenes de tomografía computarizada, confocal, entre otras, para reproducir las redes fibrosas, ya sea con diferentes niveles de realismo o simplificadas [14,15].

El objetivo de este trabajo es reproducir computacionalmente la respuesta mecánica de un hidrogel a base de colágeno bovino a partir de su microestructura, utilizando para ello imágenes del material obtenidas mediante Focused Ion Beam - Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM). Este estudio emplea de manera novedosa esta técnica de microscopía de última generación para analizar la matriz de fibras real del hidrogel, permitiendo una reconstrucción precisa de su entramado fibrilar caracterizado por longitudes y tortuosidades variables. A partir de dicha red de fibras, y mediante un enfoque multiescala, se simula *in silico* el comportamiento mecánico del hidrogel. Además, se lleva a cabo un ensayo experimental del material para la validación y ajuste de la metodología desarrollada.

2. Materiales y métodos

El hidrogel se preparó usando colágeno tipo-I derivado de dermis bovina a una concentración de 0.8 mg/ml, el cual fue suministrado como una solución acidificada tratada con pepsina, con una concentración inicial de 4 mg/ml (Colágeno-G; Matrix Bioscience, Deutschland, Alemania).

A través de análisis reológico, se midió el módulo elástico del hidrogel de colágeno. Para ello, se empleó un reómetro rotacional controlado por esfuerzo (MCR 301; Anton Paar, Graz, Austria) a 37°C (Figura 1a), utilizando una geometría de cono de acero estándar (CP25-1) (diámetro 25 mm; ángulo 1°) y una placa Peltier estándar. Después de una hora de polimerización y estabilizadas las propiedades viscoelásticas, se realizó un ensayo de tensión-deformación, aplicándose una rotación controlada por esfuerzo con un perfil en rampa logarítmica. Se varió la tensión de cizalladura entre 0.01 y 10 Pa, y se analizó la deformación a 20 puntos por década, interrumpiéndose el ensayo al romperse el hidrogel, lo que provocaba una significativa reducción en la pendiente tensión/deformación visualizada en la pantalla.

A continuación, se empleó la técnica Focused Ion Beam - Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) para estudiar la estructura a nanoescala del hidrogel. Esta técnica, que extrae capas sucesivas de la muestra mediante un haz de iones mientras el SEM permite capturar imágenes de alta resolución, es capaz de segmentar redes fibradas tridimensionales y medir con precisión parámetros estructurales [16].

La microestructura del hidrogel de colágeno bovino se reconstruyó a partir de las imágenes obtenidas con FIB-SEM (ver ejemplos en Figura 1b), las cuales se analizaron mediante el software Avizo. En primer lugar, se aplicó

un filtrado mediano para reducir el ruido manteniendo la integridad de los bordes de las fibras, realizando una interpretación 3D con 18 píxeles vecinos. Después, se estableció una umbralización interactiva para las fibras, utilizando el rango de intensidad 40-255. De este modo, se obtuvo la estructura 3D de colágeno.

Con el objetivo de minimizar los efectos en los bordes, se definió un volumen de interés (VDI) interior de aproximadamente $5 \times 5 \times 5 \mu\text{m}$ (Figura 1c). Este volumen fue posteriormente esqueletizado, descomponiéndose las fibras en múltiples segmentos. Tras la esqueletización, se obtuvieron de Avizo los datos de cada segmento del VDI.

Por último, se utilizaron los datos extraídos para generar la matriz de fibras. Este procedimiento se implementó en Matlab, y produjo las coordenadas, conexiones entre puntos (elementos) y nodos finales. Utilizando esta información, se visualizó la matriz de fibras reconstruida del VDI (Figura 1d).

Para reproducir computacionalmente los resultados experimentales del ensayo reológico del hidrogel, se empleó la metodología desarrollada por Sanz-Herrera et al. [13]. Este modelo multiescala permite estudiar la interacción micromecánica entre fibras, con el objetivo de obtener computacionalmente (*in silico*) el comportamiento mecánico macroscópico de matrices fibradas. De manera resumida, para calcular la tensión y deformación macroscópica a partir de la matriz fibrada microscópica, se definen los tensores de tensión y deformación en un punto material macroscópico en la macroescala, y se establece el incremento de deformación total. A continuación, en la microescala, se obtienen los desplazamientos/rotaciones nodales incrementales de la microestructura y se actualizan las coordenadas microscópicas. Por último, en la macroescala, se calculan el tensor de tensión incremental y el de rigidez tangente, y se actualizan las cantidades macroscópicas de los tensores de tensión y deformación. Este proceso se repite en el siguiente tiempo de carga (para una descripción completa de la metodología, ver referencia [13]). Como datos de entrada del modelo, se necesitó la microestructura de fibras reconstruida del VDI, en concreto, los datos de sus coordenadas, elementos y nodos finales. Además, para que la curva resultante del ensayo computacional coincidiera con la experimental, se ajustaron los valores de las rigideces axial ($1.8 \cdot 10^{-9} \text{ N}$) y de flexión de las fibras ($5.5 \cdot 10^{-27} \text{ N}\cdot\text{m}^2$).

3. Resultados y discusión

Los resultados experimentales obtenidos en el ensayo de reología se presentan en la Figura 1e, hasta una deformación por cizallamiento (γ) máxima del 30%, con valores de tensiones de cizalladura (τ) entre 0 y aproximadamente 3 Pa. La prueba reprodujo un comportamiento mecánico no lineal, típico del tejido de colágeno estudiado. En concreto, se identificó una fase aproximadamente lineal durante la primera mitad del ensayo, tras la cual la tensión de cizalladura experimentó un aumento no lineal, probablemente atribuible al estiramiento y alineamiento de determinadas fibras en la dirección de la carga.

Para simular la respuesta mecánica experimental obtenida, se realizó un ensayo *in silico* de cizallamiento simple a la matriz de fibras reconstruida del VDI a partir de las imágenes de FIB-SEM del hidrogel. Se observa que la curva *in silico* resultante (Figura 1e) se ajustó a la curva experimental a lo largo de todo el rango de deformación analizado, capturando la respuesta mecánica no lineal característica del hidrogel de colágeno. En dicha curva, la rigidez a flexión predominó en la zona de bajas deformaciones, a partir de la cual la rigidez axial comenzó a adquirir mayor relevancia, reduciendo progresivamente la contribución de la flexión.

En resumen, se ha demostrado que la metodología propuesta permite reconstruir computacionalmente la matriz de fibras real de un hidrogel, simulando las diferentes longitudes y tortuosidades de las fibras. A partir de esta matriz, es posible reproducir *in silico* con precisión el comportamiento mecánico del hidrogel que se obtendría experimentalmente. Esta metodología podría emplearse con otras redes de fibras en distintos materiales ingenieriles para obtener su respuesta mecánica no solo ante ensayos de cizallamiento, sino también en otros tipos de pruebas como las de tracción o compresión. Algunas limitaciones del estudio incluyen la suposición de un valor constante para la rigidez axial y de flexión, así como la elección de un único volumen de interés. Estas limitaciones serán abordadas en investigaciones futuras, en las que se pretende incorporar los diámetros reales variables de las fibras. Además, se contempla extender el análisis a otros hidrogeles de colágeno, como los obtenidos a partir de cola de rata.

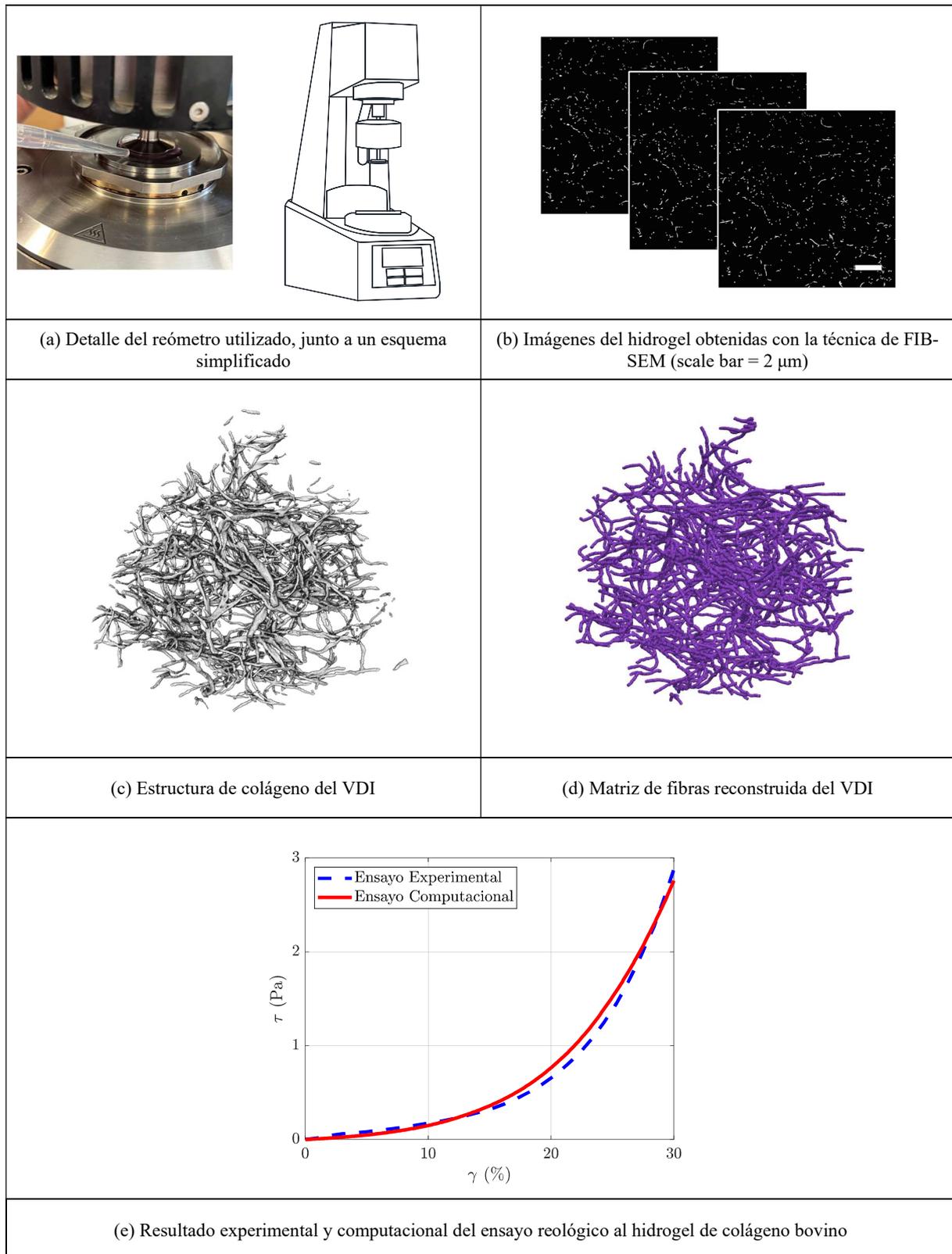


Figura 1: Resumen de la metodología y resultados.

4. Referencias

- [1] Ho T. C., Chang C. C., Chan H. P., Chung T. W., Shu C. W., Chuang K. P., Duh T. H., Yang M. H., Tyan Y. C., "Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine", *Molecules* **27**, 2902 (2022)
- [2] Karoyo A. H., Wilson L. D., "A review on the design and hydration properties of natural polymer-based hydrogels", *Materials* **14**, 1092 (2021)

- [3] She J., Liu J., Mu Y., Lv S., Tong J., Liu L., He T., Wang J., Wei D., "Recent advances in collagen-based hydrogels: Materials, preparation and applications", *Reactive and Functional Polymers* **207**, 106136 (2025)
- [4] Antoine E. E., Vlachos P. P., Rylander M. N., "Review of Collagen I Hydrogels for Bioengineered Tissue Microenvironments: Characterization of Mechanics, Structure, and Transport", *Tissue Engineering - Part B: Reviews* **20**, 683–696 (2014)
- [5] Stojkov G., Niyazov Z., Picchioni F., Bose R. K., "Relationship between Structure and Rheology of Hydrogels for Various Applications", *Gels* **7**, 255 (2021)
- [6] Castro-Abril H., Heras J., del Barrio J., Paz L., Alcaine C., Aliácar M. P., Garzón-Alvarado D., Doblaré M., Ochoa I., "The Role of Mechanical Properties and Structure of Type I Collagen Hydrogels on Colorectal Cancer Cell Migration", *Macromolecular Bioscience* **23**, 2300108 (2023)
- [7] Sánchez-Cid P., Jiménez-Rosado M., Perez-Puyana V., Guerrero A., Romero A., "Rheological and Microstructural Evaluation of Collagen-Based Scaffolds Crosslinked with Fructose", *Polymers* **13**, 632 (2021)
- [8] Tian Z., Duan L., Wu L., Shen L., Li G., "Rheological properties of glutaraldehyde-crosslinked collagen solutions analyzed quantitatively using mechanical models", *Materials Science and Engineering: C* **63**, 10–17 (2016)
- [9] Aghvami M., Billiar K. L., Sander E. A., "Fiber Network Models Predict Enhanced Cell Mechanosensing on Fibrous Gels", *Journal of Biomechanical Engineering* **138**, 101006 (2016)
- [10] Rubin M. B., Bodner S. R., "A three-dimensional nonlinear model for dissipative response of soft tissue", *International Journal of Solids and Structures* **39**, 5081–5099 (2002)
- [11] Lee B., Zhou X., Riching K., Eliceiri K. W., Keely P. J., Guelcher S. A., Weaver A. M., Jiang Y., "A Three-Dimensional Computational Model of Collagen Network Mechanics", *PLoS ONE* **9**, e111896 (2014)
- [12] Dong S., Huang Z., Tang L., Zhang X., Zhang Y., Jiang Y., "A three-dimensional collagen-fiber network model of the extracellular matrix for the simulation of the mechanical behaviors and micro structures", *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* **20**, 991–1003 (2017)
- [13] Sanz-Herrera J. A., Apolinar-Fernandez A., Jimenez-Aires A., Perez-Alcantara P., Dominguez J., Reina-Romo E., "Multiscale characterization of the mechanics of curved fibered structures with application to biological and engineered materials", *Computers & Structures* **310**, 107690 (2025)
- [14] Gaiselmann G., Tötze C., Manke I., Lehnert W., Schmidt V., "3D microstructure modeling of compressed fiber-based materials", *Journal of Power Sources* **257**, 52–64 (2014)
- [15] Alimadadi M., Lindström S. B., Kulachenko A., "Role of microstructures in the compression response of three-dimensional foam-formed wood fiber networks", *Soft Matter* **14**, 8945–8955 (2018)
- [16] Blázquez-Carmona P., Ruiz-Mateos R., Barrasa-Fano J., Shapeti A., Martín-Alfonso J. E., Domínguez J., Van Oosterwyck H., Reina-Romo E., Sanz-Herrera J. A., "Quantitative atlas of collagen hydrogels reveals mesenchymal cancer cell traction adaptation to the matrix nanoarchitecture", *Acta Biomaterialia* **185**, 281–295 (2024)