

Caracterización de copolímero a base de residuos de tilapia (*Oreochromis niloticus*), quitosano y acetato de calcio

Alfonso Chable Desiree (octavo semestre de Ingeniería Química)¹, Barroeta Bonilla David (noveno semestre de Ingeniería Biomédica)¹, Neri Rodríguez Paola del Carmen (noveno semestre de Ingeniería Química)¹, Ordaz Arellano Ana Karen (octavo semestre de Ingeniería Biomédica)^{1,*}, Bernal Cuevas Ramiro Antonino (profesor responsable)¹, Acevedo Escalante Manuel F. (profesor asesor)¹, Rodríguez Ramírez Rocío (profesora asesora)¹, Moreno Hernández Ana (profesora asesora)¹.

¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México

Resumen

La gelatina es una sustancia proteica ampliamente utilizada en la industria biomédica para la creación de copolímeros. En los últimos años la gelatina de pescado se ha convertido en una fuente alternativa debido a las preocupaciones sanitarias. Un copolímero ideal para la ingeniería biomédica debe tener propiedades excelentes, especialmente una gran capacidad de estiramiento, resistencia y elasticidad. Sin embargo, los hidrogeles de gelatina de pescado son menos duraderos y tienen temperaturas de fusión y gelificación más bajas que los hidrogeles de mamífero. Estas propiedades imponen restricciones significativas en el uso de gelatina de pescado en la tecnología biomédica, es por ello que, el objetivo de este proyecto es modificar las propiedades del hidrogel de pescado para desarrollar un copolímero que tenga las características adecuadas para su uso en apósitos médicos por medio de la adición de quitosano y acetato de calcio. Se prepararon cuatro tipos de hidrogeles de gelatina de pescado: gelatina (G), gelatina-quitosano (GQ), gelatina-acetato cálcico (GA) y gelatina-quitosano-acetato cálcico (GQA) y se investigaron sus propiedades funcionales. El copolímero GQ fue superior con un pH de 3.15 y una viscosidad de 9.40 cP. El quitosano y el acetato de calcio mejoraron la resistencia a la tracción (RT) y el módulo de Young (MY), pero redujeron el alargamiento a la rotura (AR). El copolímero GQA poseía una RT moderada de 19.6 MPa, AR de 4.76% y MY de 185 MPa. El hidrogel GQA con propiedades mecánicas y funcionales moderadas resultó más adecuado para la aplicación biomédica deseada.

Palabras clave: Copolímero, gelatina de pescado, apósito.

***Autor Corresponsal:** 190147@iberopuebla.mx

Introducción

La gelatina se deriva de la proteína madre, el colágeno, que es una proteína fibrosa ubicua que se encuentra ampliamente en los tejidos de las especies de mamíferos. El colágeno es el principal constituyente de los tejidos conectivos, huesos, cartílagos, tendones, piel y escamas [1-4]. Las tres cadenas están conectadas entre sí mediante enlaces de hidrógeno covalentes, lo que confiere al colágeno su distinguido nivel de resistencia [2,5]. La estructura única del colágeno le brinda un grupo de características deseadas, como rigidez, flexibilidad y resistencia. Éstas son necesarias para su función como proteína principal de la piel, los huesos y los tendones [6]. La gelatina se obtiene por hidrólisis parcial y rotura incompleta del entrecruzamiento de la molécula de colágeno [2,7]. La gelatina extraída se puede transformar en hidrogeles mediante procesos de autofibrogénesis dependientes del pH y la temperatura en condiciones fisiológicas [8].

Según Peppas [9], los hidrogeles son redes tridimensionales hidrófilas capaces de absorber grandes cantidades de agua, por lo que se asemejan en gran medida a un tejido biológico. Son insolubles en cualquier disolvente ya que las cadenas poliméricas están reticuladas por enlaces covalentes dobles [10,11]. Debido a dichas propiedades de los hidrogeles, como su alto contenido en agua, su consistencia blanda y gomosa, así como su baja tensión interfacial con el agua o los fluidos biológicos, se espera que sean alternativas potenciales a los tejidos naturales del ser humano [12].

Los hidrogeles se han producido tradicionalmente mediante la hidrólisis de colágeno de piel y huesos de bovino o porcino por medio de procesos ácidos o alcalinos. El uso de hidrogeles de mamífero se ha limitado en muchos países por cuestiones sanitarias, debido al brotes de enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la fiebre aftosa [13]. Es por ello que, los hidrogeles de pescado han ganado importancia como alternativa, estos pueden producirse a partir de los residuos sólidos de las industrias de procesamiento del pescado, como piel, aletas, escamas y vejiga natatoria. Varios autores han descrito la extracción de gelatina de pescado a partir de estos residuos [14-16].

Los hidrogeles basados en polímeros naturales se han estudiado ampliamente debido a sus propiedades variables y fáciles de ajustar. Al variar la composición química y los métodos de preparación, se puede controlar la estructura de los hidrogeles [17]. Las propiedades beneficiosas que incluyen la porosidad, la capacidad de hinchamiento, la estabilidad, la biocompatibilidad/biodegradabilidad y la resistencia mecánica se pueden ajustar para fines de aplicación específicos. Recientemente los hidrogeles de piel de pescado se han utilizado en aplicaciones cosméticas [18] y aplicaciones biomédicas como vendajes y cicatrización de heridas [19], terapia génica [20], ingeniería de tejidos [21], implantes, sustitutos óseos [22] y andamios [23].

Los hidrogeles se han construido a partir de una variedad de polímeros sintéticos como el poliglicolato, el polilactato, su copolímero dl-láctico-co-glicolato, así como polímeros derivados naturales como la gelatina, el colágeno, y el quitosano [24,25]. Los hidrogeles comerciales se han

formado utilizando gelatina extraída de tendones de cerdo [26], huesos de conejo blanco [27] y piel de cerdo [28,29]. Algunos autores han intentado formar hidrogeles de colágeno a partir de tilapia [30], salmón [31] y medusa [32]. Sin embargo, los hidrogeles clásicos suelen ser quebradizos, con malas propiedades mecánicas (como baja elasticidad, baja resistencia y baja resiliencia) debido a la existencia de agua, lo que limita sus aplicaciones [33,34]. Por lo tanto, es necesario desarrollar materiales de hidrogel con propiedades mecánicas elevadas [35,36]. Para diseñar hidrogeles con excelentes propiedades mecánicas, los científicos han realizado grandes esfuerzos. Así surgieron varios tipos de hidrogeles con excelentes propiedades. Por ejemplo, Dul [37] introdujo nanocristales de celulosa (CNC) en la matriz original del hidrogel y consiguió aumentar siete veces el módulo de almacenamiento del hidrogel. Wang [38] preparó un nuevo hidrogel de alta resistencia mecánica mediante la adición de quitosano. Gong [39] utilizó el método de copolimerización micelar para diseñar un hidrogel de estructura de doble red con alta resistencia, dicha técnica puede mejorar eficazmente la elasticidad de los hidrogeles. En esta técnica, las micelas actúan como reticulantes multifuncionales en el hidrogel, y sus dominios hidrófobos pueden disipar eficazmente la energía de la grieta durante la deformación y prevenir aún más el crecimiento de grietas. Tan y colaboradores [40] introdujeron la tecnología de copolimerización micelar y prepararon con éxito un hidrogel de gran elasticidad y resistencia. El hidrogel utilizaba acetato de calcio como matriz y un tensioactivo macromolecular que puede autoensamblarse en micelas como reticulantes multifuncionales. Ogawa et al. [41] opinaron que el desarrollo de hidrogeles de gelatina de pez ayudaría a generar estructuras especializadas y a utilizar los residuos del procesado de pescado. Los hidrogeles fabricados con colágeno de mamífero/pez tienen ciertas limitaciones para aplicaciones biomédicas en comparación con los fabricados con otros materiales, ya que son poco rígidos y se biodegradan rápidamente. Song et al. [42] observaron una elevada tasa de degradación enzimática del colágeno natural en estudios *in vivo* y sugirieron métodos de estabilización adecuados para los materiales basados en colágeno. El quitosano activa la reconstrucción y regeneración celular, detiene las hemorragias y tiene propiedades anestésicas [43]. El acetato de calcio también desempeña un papel importante como factor de coagulación y en la regeneración ósea. Chirito [44] reportó que la adición de quitosano y acetato de calcio mejoró las propiedades mecánicas de las películas de colágeno de piel de buey, pero no hay pruebas de sus efectos sobre las propiedades de los andamiajes de pescado. Los estudios indican un aumento del 30% en la demanda de todo tipo de hidrogeles de grado alimentario y no alimentario en el mundo, de modo que pasó de 347,9 kTon en 2011 a 450,7 kTon en 2021, donde el 40 % de su producción en 2011 se derivó de piel de cerdo. En el pasado, el colágeno se extraía de la piel y cartílago de cerdos (46 %), cueros bovinos (29.4 %), huesos (23.1 %) y otras fuentes (1.5 %) [45]. Los hidrogeles procedentes de pescado representan sólo el 1 % de la producción mundial anual [46], es por ello que, durante la última década, ha habido una tendencia en el uso de hidrogeles derivados de fuentes no mamíferas,

especialmente pescado, porque tienen características fisicoquímicas y funcionales deseables de los hidrogeles de mamíferos [47], sin embargo, existe información limitada sobre la caracterización detallada de las propiedades de estos tipos de polímeros.

Los hidrogeles de piel de pescado son mejores alternativas para ciertos usos de la industria debido a que, su fuerza de gelificación y temperatura de fusión son relativamente más bajas que las de las gelatinas de mamíferos [48]. Estas características son deseadas en algunas aplicaciones biomédicas, puesto que, tienen un gran potencial para la producción de hidrogeles de alta calidad con diferentes temperaturas de fusión y gelificación en una gama mucho más amplia que las gelatinas de mamíferos, pero con una fuerza de gelificación y viscosidad suficientemente altas [49]. Es por ello, que el objetivo de este proyecto es modificar las propiedades del hidrogel de piel de pescado para desarrollar un copolímero que tenga las características adecuadas para su uso en apósitos médicos avanzados por medio de la adición de quitosano y acetato de calcio.

Metodología

Materias primas

Como materia prima para la extracción de gelatina de pescado se utilizaron pieles de tilapia (*Oreochromis niloticus*) (7 kg). Las pieles se obtuvieron de una granja acuícola de trucha y tilapia, The Lake Golf Range, Bosques de la Laguna, Puebla, Pue. La piel se congeló a -20°C antes y durante el transporte a la Universidad Iberoamericana Puebla. La piel congelada se cortó en trozos de aproximadamente 1x1 cm.

Extracción de gelatina

La gelatina se preparó por el método de extracción ácida, según la metodología de Gudmundsson y Hafsteinsson [50]. Las pieles se lavaron con agua corriente para eliminar el material superfluo y se trataron dos veces con NaOH (0.2 g/100 g) en una proporción de 1:6 (g: mL) durante 45 min para eliminar la proteína no colagenosa. Se enjuagaron con agua potable y se volvieron a tratar dos veces con H₂SO₄ (0.2 mL/100 mL) en proporción 1:6 (g: mL) durante 45 min para aumentar el hinchamiento y eliminar las sales. A continuación, se limpiaron a fondo con agua de grifo y se trataron dos veces con HNO₃ (1 g/100 g) en proporción 1:6 (g: mL) durante 45 min; la extracción final se realizó con agua destilada en proporción 1:1 (g: mL) a 45 °C durante 24 h. El extracto se filtró con papel Whatman No.4 al vacío. El rendimiento de la gelatina se calculó mediante la relación descrita en la Eq. 1 [51]:

$$Rend = \frac{PS(g) \times 100}{PB} \quad (1)$$

Donde:

Rend: Rendimiento

PS: Peso de la gelatina en seco en gramos

PB: Peso de la muestra bruta

Caracterización fisicoquímica del colágeno de pescado

1. pH

El pH del colágeno se midió en un pH-metro (KrishnaScientific Supplies) a $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ según el procedimiento de Cheow et al. [52].

2. Cenizas

La propiedad de cenizas del colágeno se examinó según el método de Pan et al. [53]. Con ayuda de una balanza analítica se pesó el crisol y 1 g de muestra. Se introdujeron a la mufla con una temperatura de 550°C durante 3 horas. Una vez finalizado el tiempo de calcinación, se dejó enfriar hasta llegar a 200°C . Se extrajo la muestra con pinzas para crisol y se pasó al desecador por 20 min. Una vez estando a temperatura ambiente, se pesó en la balanza analítica y se calculó el porcentaje de ceniza utilizando la Eq. 2 [54]:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{Rf}{M} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

Rf : Residuo fijo (g)

M : Muestra

3. Sólidos totales y Humedad

En una cápsula de porcelana previamente calentada a 110°C , se pesó 1 g de muestra. Se introdujo a la estufa por 2 horas a 110°C , al finalizar el secado la muestra se introdujo en un desecador por 30 min para que alcanzara la temperatura ambiente. Tras dejar enfriar, se pesó en una balanza analítica, reportando el residuo como sólido total y peso perdido como humedad.

4. Hidroxiprolina

El contenido de hidroxiprolina se determinó empleando el método de colorimetría de Wang [55]. La curva de calibración empleó cinco soluciones estándar de hidroxiprolina y su contenido se calculó a partir de la curva estándar.

Preparación de hidrogeles

Se prepararon cuatro tipos de hidrogeles, gelatina simple (G), gelatina-quitosano (GQ), gelatina-acetato de calcio (GA) y gelatina-quitosano-acetato calcio (GQA). Los hidrogeles de gelatina simple se prepararon disolviendo un 3% de gelatina junto con un 0.2% de glutaraldehído en 10 ml de agua destilada. Los hidrogeles de GQ se prepararon con la adición de 1% de quitosano (MarkNature, Estados Unidos de América), previamente disuelto en ácido acético 0.3 M y se calentaron durante 20 min después de añadirlo a la solución de gelatina. Los hidrogeles de GA se prepararon añadiendo 1% de acetato de calcio (FagaLab, México) a la solución de gelatina. Los hidrogeles de GQA se prepararon con 1% de quitosano y 1% de acetato de calcio a la solución de gelatina.

La solución de formación de hidrogeles se agitó en un agitador magnético durante 1 h para producir espuma y luego se liofilizó en un liofilizador (Alpha 2, Martin Christ) y se examinaron sus propiedades mecánicas.

Caracterización mecánica de los hidrogeles

Las propiedades mecánicas como la resistencia a la tracción (RT), el alargamiento a la rotura (AR) y el módulo de Young (MY) se determinaron con los hidrogeles de gelatina por los métodos estándar ASTM D 882 [56] utilizando una máquina universal de esfuerzos (AG-XPLUS series, Shimadzu). Los hidrogeles se cortaron en rectángulos de $15 \text{ mm} \times 40 \text{ mm}$ y se fijaron en las mordazas del aparato. Luego, se separaron a una velocidad de cruceta de 5 mm por minuto. La RT, se calculó dividiendo la fuerza máxima de rotura entre el área de la sección transversal de la lámina y se expresó en megapascuales (MPa). La AR y el MY se calcularon a partir de la longitud máxima extendida en el momento de la rotura y la relación entre la tensión y la deformación de las películas; se expresaron en porcentajes y megapascuales, respectivamente. Los grosores de los hidrogeles se midieron con una precisión de 5 m con el micrómetro en seis posiciones aleatorias.

Caracterización física de los hidrogeles

1. Temperatura de fusión y gelificación

La temperatura de fusión y gelificación se determinaron por el método de Muyonga et al. [57]. La solución de gelatina, 10 g/100 mL se introdujo en 3 tubos de ensayo Borosil R estándar (12.75 mm) y se colocaron en un baño maría mantenido a 40°C . El baño se enfrió lentamente a razón de 0.2°C por minuto. Se introdujo un termómetro en la solución y la temperatura se obtuvo en intervalos de 30 s. La temperatura a la que la solución ya no goteaba de la punta del termómetro se registró como la temperatura de gelificación.

1. Prueba de pH

El valor del pH de la solución de gelatina se midió utilizando el método de la British Standard Institution, BSI 757. Se preparó una solución de gelatina al 1.0% (p/v) en agua destilada y se enfrió a una temperatura de 25°C en un baño de agua. El pH se midió con un electrodo de vidrio (Toledo MPC 227, Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Suiza) tras estandarizar el pH-metro con tampones de pH 4.0 y 7.0.

Análisis estadístico

Los valores medios se calcularon a partir de tres determinaciones ($n = 3$) y se expresaron con la desviación estándar. El experimento se repitió tres veces para obtener resultados simultáneos.

Resultados y Discusión

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la extracción de colágeno a partir de la piel de tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Se realizó un análisis de varianza en cuanto a la concentración y tiempo de extracción, en el cual se observó que existe diferencia entre los tratamientos. Siendo el mejor tratamiento en donde se empleó una relación de piel: solución de extracción 1:20 (p/v) y un tiempo de extracción de 48 horas, ya que, con éste se logró extraer mayor cantidad

de proteína. El rendimiento teórico de extracción de colágeno es de 4 %, por ello, se replicó el proceso de extracción bajo dichas condiciones y se obtuvo un rendimiento de extracción del 3.56 %, el cual es inferior al rendimiento teórico [38].

Tabla 1: Rendimiento de las diferentes extracciones de colágeno

Relación p/v (g/ml)	Tiempo (h)	Rendimiento (%)
1:10	48	1.05
1:20	48	3.56
1:10	54	2.94
1:20	54	3.12

Una vez realizada la extracción de colágeno bajo las mejores condiciones, éste fue caracterizado con la finalidad de comprobar si realmente obtenemos colágeno. Para ello se llevó a cabo 4 pruebas físico-químicas; pH, hidroxiprolina, cenizas y sólidos totales.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización del colágeno. Se observa que el producto final cumple con los requisitos físico-químicos de la norma NTC 3750 [17], ya que los valores de pH, Hidroxiprolina, el porcentaje de ceniza y sólidos totales se encuentran dentro del rango requerido. Comprobando así que el producto final se trata de colágeno hidrolizado.

Los hidrogeles de gelatina simple (G) se preparon con gelatina de piel de tilapia, también se realizó la preparación de gelatina-quitosano (GQ), gelatina-acetato cálcico (GA) y gelatina-quitosano-acetato de calcio (GQA). Los resultados de las diferentes propiedades físico-funcionales de los diferentes hidrogeles de gelatina se discuten a continuación.

Tabla 2: Valores de caracterización del colágeno a partir de la norma NTC 3750

Requisitos	Valor	Producto final
pH	3-4	3.87
Porcentaje de sólidos totales	5 máx.	3.05
Hidroxiprolina	.134 mín.	.144
Porcentaje de cenizas	1 máx.	0.82

1. Temperatura de fusión y gelificación

Las temperaturas de fusión de G y GQ eran las más altas, mientras que las temperaturas de fusión de las demás muestras eran más bajas. Se observó que las temperaturas de fusión de G y GQ eran significativamente diferentes, aunque muy próximas (Tabla 3). Del mismo modo el par de GA y GQA también tenían una diferencia en la temperatura de fusión, estas mediciones reológicas de las temperaturas de fusión y gelificación son muy precisas, por lo que, incluso diferencias muy pequeñas podrían ser estadísticamente significativas. En general, había una diferencia de aproximadamente 9.5 °C entre las temperaturas de fusión y de 5.1°C en la temperatura de gelificación de las muestras G y GQA. Puesto que, una gelatina con altos niveles de hidroxiprolina tiene mayor punto de fusión, este aminoácido es crucial en la renaturalización de las subunidades de gelatina durante la gelificación. Los puntos de fusión típicos de las gelatinas de mamífero oscilan entre 17-32 °C y la temperatura de gelificación está entre los 24-27 °C, esto se

debe a la proporción de hidroxiprolina de la molécula de colágeno original [58].

Tabla 3: Temperatura de fusión y gelificación

Muestra	Temperatura de fusión (°C)	Temperatura de gelificación (°C)
G	24.4 ± 0.2	14.4 ± 0.2
GQ	23.8 ± 0.2	13.7 ± 0.2
GA	17.2 ± 0.2	5.8 ± 0.1
GQA	14.9 ± 0.2	9.3 ± 0.1

2. pH

El pH de los hidrogeles es una de las propiedades más importantes para sus aplicaciones biomédicas, debido a la carga superficial de los hidrogeles en función del pH [59]. El pH medio del hidrogel de gelatina simple fue de 3.22 y el de los hidrogeles de GQ fue bajo. La adición de ácido acético para disolver el quitosano durante la preparación del hidrogel redujo el pH. El pH medio del hidrogel de GA era superior al de los hidrogeles de gelatina simple debido a la naturaleza básica de las sales. El hidrogel de GQ era más viscoso con un valor de 9.4 cP que el hidrogel de gelatina simple (Tabla 4). Se presentó un aumento de la viscosidad del hidrogel de gelatina comercial con la adición de quitosano, los autores Leffler y Müller también informaron de un aumento de la viscosidad del hidrogel de gelatina comercial con la adición de quitosano [60]. La adición de sales de acetato de calcio redujo la viscosidad de los hidrogeles GQA en comparación con los hidrogeles de gelatina simple, mientras que los hidrogeles GA tenían viscosidades intermedias entre los hidrogeles de GQ y los de gelatina simple. Las sales de acetato de calcio absorbidas por las moléculas de gelatina probablemente perturbaron las interacciones proteína-proteína y redujeron la viscosidad. Pan et al. [60] afirmaron que el pH de los hidrogeles también afecta a las propiedades de viscosidad e hinchamiento de los hidrogeles. Anteriormente, Jamilah y Harvinder [61] también informaron que el efecto del pH en la viscosidad es mínimo en el punto isoiónico de la gelatina y máximo a un pH de 3 y 10.5. También se demostró que los hidrogeles GQ tenían una viscosidad alta debido a su pH bajo, así como que los hidrogeles GQA tenían una viscosidad baja debido a su pH casi neutro.

Tabla 4: Propiedades físico-funcionales de diferentes hidrogeles de gelatina

Hidrogeles	pH	Viscosidad (cP)
G	3.22 ± 0.065	8.00 ± 0.246
GQ	3.15 ± 0.012	9.40 ± 0.107
GA	4.05 ± 0.077	7.30 ± 0.157
GQA	3.54 ± 0.311	8.50 ± 0.097

Donde:

G: Gelatina simple

GQ: Gelatina con quitosano

GA: Gelatina con acetato de calcio

GQA: Gelatina con quitosano y acetato de calcio

1. Espesor

El espesor medio de los hidrogeles de gelatina fue de 6 mm y aumentó en 2 mm en los hidrogeles GC (Tabla 5) aumentó en 2 mm en los hidrogeles de GC (Tabla 5) puesto que el quitosano es una macromolécula y forma enlaces cruzados con moléculas de gelatina a través de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas aumentado el grosor del hidrogel. La adición de acetato de calcio redujo considerablemente el grosor medio de los hidrogeles de GCA. Aparentemente las sales de acetato de calcio se solubilizaban parcialmente, lo que contribuía a reducir el grosor de los hidrogeles de GCA solubilizadas contribuyendo a un menor grosor de los hidrogeles.

2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los diferentes hidrogeles de gelatina examinados mostraron que la RT media del hidrogel de gelatina simple era de 10.15 MPa (Tabla 5) La RT de los hidrogeles de gelatina de cerdo fue de 2.50 MPa [62] y las de gelatina comercial fue de 4.7 MPa [63], que eran comparativamente más bajos que los de los hidrogeles de gelatina de piel de pescado. El hidrogel GQ tenía una RT muy alta de 26.7 MPa debido a la interacción de la gelatina con el quitosano mediante enlaces electrostáticos y de hidrógeno. Banerjee et al. [64] también han afirmado que la adición de polímero sintético, poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), había aumentado el RT de los hidrogeles de gelatina. La incorporación de sales de acetato de calcio había aumentado ligeramente la RT de los hidrogeles de GA a comparación de los hidrogeles de gelatina simple. Chirita [65] observó que la adición de calcio mejoraba la estabilidad del colágeno. En los hidrogeles de GQA la RT era ligeramente superior a la de los hidrogeles GA, pero inferior a la de los hidrogeles GQ debido al efecto combinado del quitosano y el calcio. El AR media de los hidrogeles de gelatina simple fue del 6.38%, mientras que los preparados con quitosano y acetato de calcio tenían hidrogeles inferiores. Se ha informado de que la AR del hidrogel de gelatina comercial era del 4.70% [66], ligeramente inferior a la nuestra. El AR de los hidrogeles de gelatina animal fueron mucho más bajos con 0.93% [67] se había reducido el AR de los hidrogeles de GC a aproximadamente el 3.73%. Del mismo modo, la adición de acetato de calcio también había reducido el AR. Contrariamente a Banerjee et al. [64] informaron que la adición de polímero, PLGA, había aumentado el AR de los hidrogeles de gelatina. Parecía que

el tipo de polímero y su naturaleza iónica alteran la interacción entre las moléculas y la elasticidad resultante. El AR media del hidrogel de gelatina de pescado simple fue de 169 MPa, mientras que algunos autores han comunicado valores bajos, por ejemplo, 105 MPa para el hidrogel de gelatina porcina [62]. La adición de quitosano y acetato de calcio había aumentado el MY de los hidrogeles de gelatina de pescado y el efecto fue más pronunciado en los hidrogeles de GQ. El quitosano y el acetato de calcio interfirieron en la formación de la de la red proteica durante las interacciones gelatina-quitosano/acetato de calcio y provocaron un aumento sustancial de la rigidez de los hidrogeles. La combinación de quitosano y acetato de calcio, sin embargo, no mejoró los valores de MY.

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

Los resultados obtenidos sugieren que la caracterización del colágeno es útil en la discriminación de métodos de extracción para la elaboración de hidrogeles de gelatina, ya que, los atributos físicos examinados del colágeno de pescado coinciden con la bibliografía consultada. Se comprobó que las condiciones de extracción afectan a la percepción de las características físicas de los hidrogeles de gelatina. Por ello, se confirma que la concentración de ácido es uno de los parámetros de extracción más importantes que debe optimizarse, ya que afecta los valores del pH y la hidroxiprolina de los hidrogeles.

El uso de quitosano y acetato de calcio afectaron significativamente a la microestructura de los copolímeros como indica el análisis térmico, en particular las temperaturas de fusión y de gelificación. Los cambios en los parámetros de temperatura sugieren un aumento de la estabilidad cuando se incluye quitosano y acetato de calcio en un mismo hidrogel, lo que podría estar relacionado con variaciones en la movilidad molecular. En el caso de la temperatura de gelificación, la disminución estaba relacionada con cambios en la morfología cristalina.

El análisis indicaba que las propiedades mecánicas y funcionales de los copolímeros de gelatina simple eran inferiores a las de los copolímeros compuestos de gelatina de pescado. Los copolímeros de GQ presentaban una viscosidad elevada. Los copolímeros de GQ también presentaban una RT y un MY elevado. Sin embargo, el espesor y el AR eran bajos en los copolímeros de GQ debido a su microestructura con cavidades más grandes.

Tabla 5: Propiedades mecánicas de diferentes hidrogeles de gelatina

Hidrogeles	RT (MPa)	AR (%)	MY (MPa)	Espesor (mm)
G	10.1 ± 1.54	6.38 ± 2.20	169 ± 21.0	6.30 ± 0.27
GQ	26.7 ± 3.02	3.73 ± 0.95	277 ± 38.4	8.70 ± 0.70
GA	12.0 ± 1.05	5.26 ± 1.03	199 ± 26.5	3.55 ± 0.24
GQA	19.6 ± 1.73	4.76 ± 1.14	185 ± 17.8	5.61 ± 0.61

Donde:

G: Gelatina simple

GQ: Gelatina con quitosano

GA: Gelatina con acetato de calcio

GQA: Gelatina con quitosano y acetato de calcio

Por lo tanto, los copolímeros de GQA que tenían propiedades mecánicas moderadas, pero un mejor espesor y AR se consideraron los mejores para aplicaciones biomédicas, puesto que el copolímero compuesto tenía buenas propiedades mecánicas (Tabla 5) y estabilidad térmica (Tabla 3), todo lo cual ayudaría en el desarrollo de un apósito médico avanzado. Se encontró que la combinación de gelatina de pescado con quitosano y acetato de calcio era prometedora para superar los inconvenientes y reforzar las propiedades del gel. Los copolímeros de gelatina de pescado tienen un futuro prometedor en la industria biomédica. Sin embargo, se necesitan más estudios para dilucidar la estructura de los copolímeros de gelatina de pescado, así

como caracterizaciones más especializadas, las cuales brinden información especializada de los distintos copolímeros derivados de la gelatina de pescado. Además, se considera que se requiere un examen *in vivo* de estos copolímeros de gelatina de pescado para probar el efecto de sus propiedades mecánicas, funcionales.

Agradecimientos

Los autores desean dar las gracias a Silas Eugene Wiseman por haber proporcionado el apoyo necesario para la realización de este trabajo.

Referencias

1. Jeong B., Bae Y.H., Lee D.S., Kim S.W. **Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems.** *Nature*. 1997;388:860–862. doi:10.1038/42218.
2. Holtz J.H., Asher S.A. **Polymerized colloidal crystal hydrogel films as intelligent chemical sensing materials.** *Nature*. 1997;389:829–832. doi: 10.1016/S0956-5663(97)84356-4.
3. Ahmed E.M. **Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review.** *J. Adv. Res.* 2015;6:105–121. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
4. Sun Y., Kaplan J.A., Shieh A., Sun H.-L., Croce C.M., Grinstaff M.W., Parquette J.R. **Self-assembly of a 5-fluorouracil-dipeptide hydrogel.** *Chem. Commun.* 2016;52:5254–5257. doi: 10.1039/C6CC01195K.
5. Kim S.H., Sun Y., Kaplan J.A., Grinstaff M.W., Parquette J.R. **Photo-crosslinking of a self-assembled coumarin-dipeptide hydrogel.** *New J. Chem.* 2015;39:3225–3228. doi: 10.1039/C5NJ00038F.
6. Verhulsel M., Vignes M., Descroix S., Malaquin L., Vignjevic D.M., Viovy J.L. **A review of microfabrication and hydrogel engineering for micro-organs on chips.** *Biomaterials.* 2014;35:1816–1832. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.021.
7. Daniele M.A., Adams A.A., Naciri J., North S.H., Ligler F.S. **Interpenetrating networks based on gelatin methacrylamide and PEG formed using concurrent thiol click chemistries for hydrogel tissue engineering scaffolds.** *Biomaterials.* 2014;35:1845–1856. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.009.
8. Yu X., Jiao Y., Chai Q. **Applications of Gold Nanoparticles in Biosensors.** *Nano LIFE.* 2016;6:1642001. doi: 10.1142/S1793984416420010.
9. Peppas X., Chen X., Chai Q., Ayres N. **Synthesis of polymer organogelators using hydrogen bonding as physical cross-links.** *Colloid Polym. Sci.* 2016;294:59–68. doi: 10.1007/s00396-015-3797-z.
10. Billiet T., Vandenhaute M., Schelfhout J., van Vlierberghe S., Dubruel P. **A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering.** *Biomaterials.* 2012;33:6020–6041. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.04.050.
11. Peppas N.A., Merrill E.W. **Poly(vinyl alcohol) hydrogels: Reinforcement of radiation-crosslinked networks by crystallization.** *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 1976;14:441–457. doi: 10.1002/pol.1976.170140215.
12. Hoffman A.S. **Hydrogels for biomedical applications.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012;64:18–23. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010.
13. Wang T., Jiao Y., Chai Q., Yu X. **Gold Nanoparticles: Synthesis and Biological Applications.** *Nano LIFE.* 2015;5:1542007. doi: 10.1142/S1793984415420076.
14. Ding R., Yu X., Wang P., Zhang J., Zhou Y., Cao X., Tang H., Ayres N., Zhang P. **Hybrid photosensitizer based on amphiphilic block copolymer stabilized silver nanoparticles for highly efficient photodynamic inactivation of bacteria.** *RSC Adv.* 2016;6:20392–20398. doi: 10.1039/C6RA01660J.
15. Lee K.Y., Mooney D.J. **Hydrogels for tissue engineering.** *Chem. Rev.* 2001;101:1869–1880. doi: 10.1021/cr000108x.
16. Pan L., Yu G., Zhai D., Lee H.R., Zhao W., Liu N., Wang H., Tee B.C.K., Shi Y., Cui Y., et al. **Hierarchical nanostructured conducting polymer hydrogel with high electrochemical activity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012;109:9287–9292. doi: 10.1073/pnas.1202636109.
17. Zhai D., Liu B., Shi Y., Pan L., Wang Y., Li W., Zhang R., Yu G. **Highly sensitive glucose sensor based on Pt nanoparticle/polyaniline hydrogel heterostructures.** *ACS Nano.* 2013;7:3540–3546. doi: 10.1021/nn400482d.
18. Li L., Wang Y., Pan L., Shi Y., Cheng W., Shi Y., Yu G. **A nanostructured conductive hydrogels-based biosensor platform for human metabolite detection.** *Nano Lett.* 2015;15:1146–1151. doi: 10.1021/nl504217p.

19. Zhu Z., Guan Z., Jia S., Lei Z., Lin S., Zhang H., Ma Y., Tian Z.Q., Yang C.J. **Nanoparticle encapsulated target-responsive hydrogel with volumetric bar-chart chip readout for quantitative point-of-care testing.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014;53:12503–12507.
20. Pan G., Guo Q., Ma Y., Yang H., Li B. **Thermo-responsive hydrogel layers imprinted with RGDS peptide: A system for harvesting cell sheets.** *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013;52:6907–6911. doi: [10.1002/anie.201300733](https://doi.org/10.1002/anie.201300733).
21. Yu X., Cao X., Chen X., Ayres N., Zhang P. **Triplet–triplet annihilation upconversion from rationally designed polymeric emitters with tunable inter-chromophore distances.** *Chem. Commun.* 2015;51:588–591. doi: [10.1039/C4CC07589G](https://doi.org/10.1039/C4CC07589G).
22. Koetting M.C., Guido J.F., Gupta M., Zhang A., Peppas N.A. **pH-responsive and enzymatically-responsive hydrogel microparticles for the oral delivery of therapeutic proteins: Effects of protein size, crosslinking density, and hydrogel degradation on protein delivery.** *Control. Release.* 2016;221:18–25. doi: [10.1016/j.jconrel.2015.11.023](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.11.023).
23. Jin Z., Liu X., Duan S., Yu X., Huang Y., Hayat T., Li J. **The adsorption of Eu(III) on carbonaceous nanofibers: Batch experiments and modeling study.** *J. Mol. Liq.* 2016;222:456–462. doi: [10.1016/j.molliq.2016.07.067](https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.07.067).
24. Matanović M.R., Kristl J., Grabnar P.A. **Thermoresponsive polymers: Insights into decisive hydrogel characteristics, mechanisms of gelation, and promising biomedical applications.** *Int. J. Pharm.* 2014;472:262–275. doi: [10.1016/j.ijpharm.2014.06.029](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.06.029).
25. Peppas N. **Hydrogels of poly(vinyl alcohol) and its copolymers.** *Hydrogels Med. Pharm.* 2016;2:1–48.
26. Peppas N.A., Mongia N.K. **Ultrapure poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2017;43:51–58. doi: [10.1016/S0939-6411\(96\)00010-0](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(96)00010-0).
27. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. **Hydrogel nanoparticles in drug delivery.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008;60:1638–1649. doi: [10.1016/j.addr.2008.08.002](https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.08.002).
28. Bajpai A.K., Shukla S.K., Bhanu S., Kankane S. **Responsive polymers in controlled drug delivery.** *Prog. Polym. Sci.* 2008;33:1088–1118. doi: [10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005).
29. Overstreet D.J., McLemore R.Y., Doan B.D., Farag A., Vernon B.L. **Temperature-responsive graft copolymer hydrogels for controlled swelling and drug delivery.** *Soft Matter.* 2013;11:294–304. doi: [10.1080/1539445X.2011.640731](https://doi.org/10.1080/1539445X.2011.640731).
30. Zhou Y., Cai Y., Hu X., Long Y. **Temperature-responsive hydrogel with ultra-large solar modulation and high luminous transmission for “smart window” applications.** *J. Mater. Chem. A.* 2014;2:13550–13555. doi: [10.1039/C4TA02287D](https://doi.org/10.1039/C4TA02287D).
31. Schoener C.A., Hutson H.N., Peppas N.A. **pH-responsive hydrogels with dispersed hydrophobic nanoparticles for the oral delivery of chemotherapeutics.** *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2013;101:2229–2236. doi: [10.1002/jbm.a.34532](https://doi.org/10.1002/jbm.a.34532).
32. De S.K., Aluru N., Johnson B., Crone W., Beebe D.J., Moore J. **Equilibrium swelling and kinetics of pH-responsive hydrogels: Models, experiments, and simulations.** *J. Microelectromech. Syst.* 2002;11:544–555. doi: [10.1109/JMEMS.2002.803281](https://doi.org/10.1109/JMEMS.2002.803281).
33. Dong L., Jiang H. **Autonomous microfluidics with stimuli-responsive hydrogels.** *Soft Matter.* 2007;3:1223–1230. doi: [10.1039/b706563a](https://doi.org/10.1039/b706563a).
34. Zhao Y.-L., Stoddart J.F. **Azobenzene-Based Light-Responsive Hydrogel System.** *Langmuir.* 2009;25:8442–8446. doi: [10.1021/la804316u](https://doi.org/10.1021/la804316u).
35. Lo C.-W., Zhu D., Jiang H. **An infrared-light responsive graphene-oxide incorporated poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel nanocomposite.** *Soft Matter.* 2011;7:5604–5609. doi: [10.1039/c1sm00011j](https://doi.org/10.1039/c1sm00011j).
36. Murakami Y., Maeda M. **DNA-responsive hydrogels that can shrink or swell.** *Biomacromolecules.* 2005;6:2927–2929. doi: [10.1021/bm0504330](https://doi.org/10.1021/bm0504330).
37. Dul P.J., Rehner J., Jr. **Statistical mechanics of cross-linked polymer networks II. Swelling.** *J. Chem. Phys.* 1943;11:521–526. doi: [10.1063/1.1723792](https://doi.org/10.1063/1.1723792).
38. Wang P.J. **Principles of Polymer Chemistry.** Cornell University Press; Ithaca, NY, USA: 2013.
39. Gong N.A., Merrill E.W. **Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks.** *J. Appl. Polym. Sci.* 1977;21:1763–1770. doi: [10.1002/app.1977.070210704](https://doi.org/10.1002/app.1977.070210704).
40. Tan L.R.G. **The Physics of Rubber Elasticity.** Oxford University Press; Oxford, UK: 2015.
41. Ogawa P.J., Rabjohn N., Shaffer M.C. **Dependence of elastic properties of vulcanized rubber on the degree of cross linking.** *J. Polym. Sci.* 1949;4:225–245. doi: [10.1002/pol.1949.120040301](https://doi.org/10.1002/pol.1949.120040301).
42. Song N., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. **Hydrogels in pharmaceutical formulations.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000;50:27–46. doi: [10.1016/S0939-6411\(00\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(00)00090-4).
43. Lowman A.M., Peppas N.A. **Analysis of the complexation/decomplexation phenomena in graft copolymer networks.** *Macromolecules.* 1997;30:4959–4965. doi: [10.1021/ma970399k](https://doi.org/10.1021/ma970399k).
44. Chirito J.E. **Polymer Networks.** Springer; Heidelberg, Germany: 2012. pp. 1–26.
45. Klouda L., Mikos A.G. **Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications.** *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008;68:34–45. doi: [10.1016/j.ejpb.2007.02.025](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.02.025)

46. Qiu Y., Park K. **Environment-sensitive hydrogels for drug delivery**. *Adv Drug Deliver Rev.* 2001;53:321–339. doi: [10.1016/S0169-409X\(01\)00203-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00203-4).
47. Gao X., Cao Y., Song X., Zhang Z., Xiao C., He C., Chen X. **pH-and thermo-responsive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid derivative) copolymers and hydrogels with LCST dependent on pH and alkyl side groups**. *J. Mater. Chem. B.* 2013;1:5578–5587. doi: [10.1039/c3tb20901f](https://doi.org/10.1039/c3tb20901f).
48. Schild H. **Poly(N-isopropylacrylamide): Experiment, theory and application**. *Prog. Polym. Sci.* 1992;17:163–249. doi: [10.1016/0079-6700\(92\)90023-R](https://doi.org/10.1016/0079-6700(92)90023-R).
49. Ruel-Gariépy E., Leroux J.-C. **In situ-forming hydrogels—Review of temperature-sensitive systems**. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004;58:409–426. doi: [10.1016/j.ejpb.2004.03.019](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.019).
50. Gudmundsson K., Pedersen J.S. **Structural study on the micelle formation of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymer in aqueous solution**. *Macromolecules.* 1993;26:805–812. doi: [10.1021/ma00056a035](https://doi.org/10.1021/ma00056a035).
51. Jaeger J.A. **Landscape division, splitting index, and effective mesh size: New measures of landscape fragmentation**. *Landscape Ecol.* 2000;15:115–130. doi: [10.1023/A:1008129329289](https://doi.org/10.1023/A:1008129329289).
52. Cheow T., Peppas N.A. **Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks**. *J. Biomed. Mater. Res.* 1989;23:1183–1193. doi: [10.1002/jbm.820231007](https://doi.org/10.1002/jbm.820231007).
53. Pan Y., Luo X., Payne G.F., Rubloff G.W. **Biofabrication: Programmable assembly of polysaccharide hydrogels in microfluidics as biocompatible scaffolds**. *J. Mater. Chem.* 2012;22:7659–7666. doi: [10.1039/c2jm16215f](https://doi.org/10.1039/c2jm16215f).
54. Klemm D., Kramer F., Moritz S., Lindström T., Ankerfors M., Gray D., Dorris A. **Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials**. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011;50:5438–5466. doi: [10.1002/anie.201001273](https://doi.org/10.1002/anie.201001273).
55. Wang M., Malinen M.M., Lauren P., Lou Y.-R., Kuisma S.W., Kanninen L., Lille M., Corlu A., GuGuen-Guillouzo C., Ikkala O. **Nanofibrillar cellulose hydrogel promotes three-dimensional liver cell culture**. *J. Control. Release.* 2012;164:291–298. doi: [10.1016/j.jconrel.2012.06.039](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.039).
56. Isobe N., Lee D.-S., Kwon Y.-J., Kimura S., Kuga S., Wada M., Kim U.-J. **Immobilization of protein on cellulose hydrogel**. *Cellulose.* 2011;18:1251–1256. doi: [10.1007/s10570-011-9561-8](https://doi.org/10.1007/s10570-011-9561-8).
57. Kim M.H., An S., Won K., Kim H.J., Lee S.H. **Entrapment of enzymes into cellulose–biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid**. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2012;75:68–72. doi: [10.1016/j.molcatb.2011.11.011](https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.011).
58. Velázquez K., Upton Z., Schrobback K., Ehrbar M., Hubbell J.A., Lutolf M.P., Rizzi S.C. **The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels**. *Biomaterials.* 2010;31:8454–8464. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.07.046](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.046).
59. Nicool J.W., Koshy S.T., Bae H., Hwang C.M., Yamanlar S., Khademhosseini A. **Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels**. *Biomaterials.* 2010;31:5536–5544. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.03.064](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.064).
60. Leffler, L. Müller, J. **3D cell entrapment in crosslinked thiolated gelatin-poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels**. *Biomaterials.* 2012;33:48–58. doi: [10.1016/j.biomaterials.2011.09.031](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.031).
61. Pan R.-Z., Chen Y.-C., Moreno-Luna R., Khademhosseini A., Melero-Martin J.M. **Transdermal regulation of vascular network bioengineering using a photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogel**. *Biomaterials.* 2013;34:6785–6796. doi: [10.1016/j.biomaterials.2013.05.060](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.060).
62. S. Behera, P.A. Mahanwar, **Superabsorbent polymers in agriculture and other applications: a review**, *Polym. Technol. Mater.* 59 (2020) 341–356. doi: [10.1080/25740881.2019.1647239](https://doi.org/10.1080/25740881.2019.1647239).
63. A. Nešić, G. Cabrera-Barjas, S. Dimitrijević-Branković, S. Davidović, N. Radovanović, C. Delattre, **Prospect of polysaccharide-based materials as advanced food packaging**, *Molecules.* 25 (2020). doi: [10.3390/molecules25010135](https://doi.org/10.3390/molecules25010135).
64. Banerjee S, Rinoldi M., Schot S., Saheb F., Shari E., Jalilian K., **Drug delivery systems and materials for wound healing applications**, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 127 (2018) 138–1666. doi: [10.1016/j.addr.2018.04.008](https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.008).
65. Chirita R., Choudhary, M. Saraswat, S.K. Venkatraman, **A Fundamental Approach Toward Polymers and Polymer Composites: Current Trends for Biomedical Applications**, in: *Polym. Nanocomposites Biomed. Eng.*, 2019: pp. 1–28. doi: [10.1007/978-3-030-04741-2_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-04741-2_1).
66. N.A. Peppas, J.Z. Hilt, A. Khademhosseini, R. Langer, **Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology**, *Adv. Mater.* 18 (2006) 1345–1360. doi: [10.1002/adma.200501612](https://doi.org/10.1002/adma.200501612).
67. M.S. Hamid Akash, K. Rehman, S. Chen, **Natural and synthetic polymers as drug carriers for delivery of therapeutic proteins**, *Polym. Rev.* 55 (2015) 371–406. doi: [10.1080/15583724.2014.995806](https://doi.org/10.1080/15583724.2014.995806).