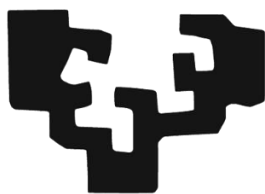


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Nekazal eta industria hondakinen
balorizazioa kolagenoan oinarrituriko
produktu biodegradagarriak ekoizteko**

Mireia Andonegi San Martín

Zuzendariak:

Koro de la Caba eta Pedro Guerrero

Ingeniaritza Kimikoa eta Ingurumen Ingeniaritza Saila

Donostia-San Sebastian, 2022

Esker onak / Agradecimientos / Acknowledgements

Lerro hauek idaztean ohartzen zara, lau urte iraun duen etapa hau amaitzear dela eta bide honetan zehar bizitako esperientziez zein ezaguturiko pertsonaz oroitzen zara. Horrengatik, eskerrak eman nahi dizkiet ikerkuntza ibilbide hau nirekin konpartitu dutenei baita nire ondoan egon diren pertsona guztiei ere.

Para empezar, me gustaría agradecer a mis directores, Koro de la Caba y Pedro Guerrero. Gracias por ofrecerme la oportunidad de realizar el proyecto fin de carrera, el trabajo fin de grado y master con vosotros. Gracias también por la confianza depositada en mí y por todo lo que me habéis enseñado, tanto en lo profesional como en lo personal, a lo largo de toda la tesis doctoral. Vuestra constante dedicación, seguimiento, supervisión ha sido imprescindible para conseguir este trabajo.

I would also like to thank Carlos Miguel Costa and Daniela Correia for having directed me during my both scientific stays in the University of Minho. Their teachings on ionic liquids and electricity have contribute enormously to advance in my research. Muito obrigada a todos vocês do grupo, pela agradável acolhida na vossa pequena-grande família. Foi um prazer trabalhar com vocês.

Bestalde, doktorego-tesi honetan, nire ondoan egon diren lankideei, beraien laguntza sostengua eta pazientzia eskertu nahi dizkiet. Mila esker laguntza emateko prest egon zareten guztioi eta ibilbidea nirekin burutu duzuenoi. Aldi berean, etxekoei zein lagunei emandako babesa eta animoak eskertu nahiko nizkieke. Mila esker denoi hor egoteagatik, nigan sinesteagatik.

Amaitzeko, Eusko Jaurlaritzak doktorego-tesia burutzeko (PRE_2017_1_0025) emandako diru-laguntzagatik. Biomat ikerketa taldeari ere eskerrak emandako babes ekonomikoagatik. UPV/EHU-ko SGIker ikerkuntza zerbitzu orokorrak ere eskertu nahiko nituzke.

LABURPENA

Ingurunearekiko lagungarria den kudeaketa jasangarriagoetan azken urteotan jarri den interesa dela eta, baliabide berriztagarrietan oinarritutako material biodegradagarriak izugarritzko arreta erakarri dute. Izan ere, nekazal eta industria hondakin eta azpiproduktuen balorizazioa etorkizun handiko aukera izan daiteke, ez bakarrik hondakinak minimizatzeko, baita balio erantsi handiko produktuak ekoizteko ere. Ildo horretatik, abeltzaintza eta itsaskien hondakinetatik erauz daitekeen kolagenoa, elikagai, kosmetika, farmazia eta biomedikuntza arloko aplikazioetan oso erabilia izan da, bere ugaritasuna, propietate biologiko, egitura propietate eta forma fisikoak ezberdinak eratzeko duen aldakortasuna esker. Gainera, kolagenoa beste osagai batzuekin konbina daiteke aplikazio-eremu berriei atea irekiz.

Testuinguru honetan, doktoretza-tesi honen helburu orokorra, behi- eta zerri-larruen hondakinetatik lortutakoak kolagenoa lehen gai gisa erabiliz propietate hobetu zein egitura ezberdineko produktu biodegradagarriak garatzea izan da; horretarako, beste konposatu batzuk erantsi eta hainbat prozesatze-metodo erabiliz. Helburu hau betetzeko hamaika kapitulutan banaturiko azterketa burutu da. **1. kapituluak** kolagenoan aberatsak diren biohondakinen balorizazio, kolagenoaren egitura eta propietate, zein kolageno eta bere deribatuen aplikazioen ikuspegi orokorra ematen du. Ondoren, **2. kapituluan**, erabilitako material eta erreaktiboak, kolagenoaren eta artilearen tratamenduak, kolagenoan oinarrituriko produktuak garatzeko erabilitako teknikak eta ikerketa-lan honetan egindako karakterizazio-metodoak deskribatzen dira.

3-5. kapituluetan, konpresio bidezko moldaketa erabili zen kolagenoan oinarritutako materialak prozesatzeko. **3. kapituluan**, ontze danborra erabiliz behi-azaletik kolagenoa lortuz, laborategiko arraboletan azido zitrikoaren eduki desberdinekin tratatu eta, azkenik, konpresio bidezko moldeaketarekin lortutako xaflen propietate

funtzionalak ikertu ziren. **4. kapitulu**an, tratamendu mekanikoen bidez zerri-azaletik kolagenoa lortu, eta berezko propietate biologikoak dituen aloe vera gehitu zen kolageno-formulazioetan, aplikazio biomedikoetarako izan dezakeen egokitasuna ebaluatzeko. Gainera, **5. kapitulu**an, kitosano-zerri kolagenozko filmak garatu eta karakterizatu ziren, aplikazio biomedikoetarako egokiak diren aztertzeko.

Kitosano-kolagenozko filmen emaitzak kontuan hartuta, **6. kapitulu**an formulazio bereko aldamiok liofilizazio bidez prestatu ziren. Bertan, materialak eta ingurumen aspektuak hartu ziren kontuan, biomaterial jasangarriagoetarako estrategia globala eskaintzeko. Bestalde, **7. kapitulu**an, xiringa bidezko 3D estrusio-inprimagailua erabili zen, tetrahidrokurkumina (THC) erantsitako zerri-kolagenozko aldamiok lortzeko, eta THC-ren askapenerako sistema kontrolatu gisa zuten potentziala aztertu zen. Prozesatu aurretik, 3D inprimaketa-baldintza optimoak analisi erreologikoen bidez zehaztu ziren.

Ondoren, behien kolagenoan oinarritutako filmen propietate elektrikoak aztertu ziren. **8. kapitulu**an, disoluzio metodoaren bidez prestatutako kolageno-formulazioei ZnO nanopartikulak (NPk) gehitu zitzaizkien, aplikazio biomedikoetarako garrantzitsuak izan daitezkeen elektro-eroankortasun induzitua duten filmak lortzeko helburuarekin. Gainera, elektronika jasangarrirako hurrengo belaunaldiko material funtzional aurreratuak garatzeko, **9. kapitulu**an, kolageno-formulazioetan artilea eta kolina dihidrogeno fosfatoa edo kolina serinatoa sartu eta konpresio bidezko moldaketa bidez prestatu ziren filmak.

Azkenik, **10. kapitulu**ak doktoretza-tesiaren ondorioak laburtzen ditu, eta lan honetan zehar aipatutako erreferentziak **11. kapitulu**an biltzen dira.

HELBURUAK

Doktoretza tesi honen helburu nagusia behi eta zerri azaletik lortutako kolagenoan oinarrituriko materialak garatzea izan zen, propietateak hobetzeko konposatuak, horietako batzuk biohondakinetatik erauziak, gehituz eta prozesatze metodo ezberdinez baliatuz.

Helburu espezifikoak honela laburbiltzen dira:

- Erauzketa eta prozesamenduan kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura mantentuz, propietate hobetuak dituzten azken produktuak lortzeko.
- Erabilitako prozesatze-metodo bakoitzerako kolageno-formulazioak optimizatu.
- Tetrahidrokurkumina (THC) duten aldamiok lortzeko, 3D inprimatze-parametroak optimizatu.
- Artilea eta likido ionikoak (ILk) dituzten filmak prestatzeko konpresio bidezko moldeaketaren prozesatze tenperatura optimoa zehaztu.
- Aloe vera, kitosanoa eta THC duten kolageno-filmen portaera aztertu: askapen bioaktiboa, mukoatxikidura, degradazioa, biobateragarritasuna eta zelulazkuntza.
- Kolageno filmi propietate elektriko eta dielektrikoak ematen, ZnO NPak, ILak eta artilea erantsiz.

AURKIBIDEA

1. SARRERA	1
1.1 LABURPENA	3
1.2 BIO-HONDAKINEN BALORIZAZIOA	5
1.3 KOLAGENOAREN EGITURA ETA PROPIETATEAK	10
1.4 KOLAGENO ETA KOLAGENO-DERIBATUEN APLIKAZIOAK	13
1.4.1 Peptidoak kosmetika eta industria nutrizentikoan	14
1.4.2 Gelatina elikagaien industrian	16
1.4.3 Kolagena biomedikuntzan.....	18
1.4.4 Etorkizuneko ikuspegia eta ondorio nagusiak.....	23
2. MATERIALAK ETA METODOAK	25
2.1 MATERIALAK	27
2.2 LAMINEN PRESTAKETA	28
2.3 FILM ETA ALDAMIOEN PRESTAKETA	28
2.3.1 Tratamenduak	28
2.3.2 Disoluzio metodoa	29
2.3.3 Konpresio bidezko moldeaketa	30
2.3.4 Liofilizazioa	31
2.3.5 3D inprimaketa.....	31
2.4 KARAKTERIZAZIO TERMIKOA	32
2.4.1 Analisi termograbitmetrikoa (TGA).....	32
2.4.2 Ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC)	33
2.4.3 Analisi dinamiko-mekanikoa (DMA)	33
2.5 EBALUAZIO ERREOLOGIKOA	33
2.6 KARAKTERIZAZIO FISIKO-KIMIKOA	35
2.6.1 Fourierren transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR).....	35
2.6.2 Hezetasun edukia (MC) eta masa galera (ML)	35
2.6.3. Uraren xurgapen (WU) neurraketa	36
2.7 EGITURAREN KARAKTERIZAZIOA	36
2.7.1 Ekorketa elektro-mikroskopioa (SEM).....	36
2.7.2 X-izpien difrakzioa (XRD).....	36
2.7.3 X-izpien bidezko espektroskopia fotoelektrikoa (XPS)	36
2.8 HESI-PROPIETATEAK	37
2.8.1 Ur-ukipen angelua (WCA)	37
2.8.2 Ur-lurrunaren iragazkortasuna (WVP).....	37
2.8.3. Ultramore-ikuskor (UV-vis) espektroskopia	38
2.9 PROPIETATE MEKANIKOAK	38

2.9.1	Trakzio-saiakuntza	38
2.9.2	Konpresio-saiakuntza	38
2.10	PROPIETATE ELEKTRIKO ETA DIELEKTRIKOAK	39
2.11	BIOAKTIBOEN ASKAPENA	40
2.12	IN VITRO MUKI-ATXIKIDURA SAIKUNTZA	41
2.13	DEGRADAZIO AZTERKETA	41
2.14	ZITOTOXIKOTASUN AZTERKETA	42
2.15	BIOBATERAGARRITASUN AZTERKETA	43
2.16	ZELULEN KULTIBOA	44
2.17	INGURUMEN AZTERKETA	44
2.18	ANALISI ESTADISTIKOA	45
3.	AZIDO ZITRIKODUN KOLAGENO LAMINAK	47
3.1	LABURPENA	49
3.2	EMAITZAK ETA EZTABAIDA	49
3.2.1	Propietate termikoak	49
3.2.2	Propietate fisiko-kimikoak	51
3.2.3.	Propietate morfologiko eta mekanikoak	54
3.3	ONDORIOAK	57
4.	ALOE VERADUN KOLAGENO FILMAK	59
4.1.	LABURPENA	61
4.2.	EMAITZAK ETA EZTABAIDA	61
4.2.1	Propietate fisiko-kimikoak	61
4.2.2	Propietate termikoak	63
4.2.3.	Barrera eta propietate mekanikoak	65
4.2.4.	Propietate morfologikoak	67
4.2.5	Degradazio eta biobateragarritasuna	68
4.3	ONDORIOAK	70
5.	KITOSANO-KOLAGENO FILMAK	71
5.1	LABURPENA	73
5.2	EMAITZAK ETA EZTABAIDA	73
5.2.1	Propietate fisiko-kimikoak	73
5.2.2	Propietate termikoak	76
5.2.3	Propietate morfologikoak	78
5.2.4.	Hesi-propietate eta propietate mekanikoak	80
5.2.5	Biodegradazioa eta zitotoxikotasun ebaluazioa	82
5.3	ONDORIOAK	84
6.	KITOSANO-KOLAGENO ALDAMIOAK	87
6.1	LABURPENA	89

6.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....	89
6.2.1 Ingurumen azterketa	89
6.2.2 Fourierren transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR).....	92
6.2.3 X-izpien difrakzioa.....	93
6.2.4 X-izpien bidezko espektroskopia fotoelektrikoa (XPS)	94
6.2.5 Ekorketa elektroik mikroskopia (SEM).....	96
6.2.6 Konpresio-saiakuntza	97
6.2.7 Degradazio azterketa	98
6.3 ONDORIOAK	99
7. TETRAHIDROKURKUMINADUN KOLAGENO ALDAMIOAK.....	101
7.1 LABURPENA.....	103
7.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....	103
7.2.1 Propietate erreologikoak	103
7.2.2 Propietate fisiko-kimiko eta termikoak	107
7.2.3 Propietate morfologiko eta barrera propietateak.....	109
7.2.4 Ur-xurgapen (WU) ahalmena eta THC askapena.....	111
7.2.5 Muki-itsasgarritasun propietateak.....	112
7.3 ONDORIOAK	114
8. ZnO NANOPARTIKULADUN KOLAGENO FILMAK	115
8.1 LABURPENA.....	117
8.2. EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....	117
8.2.1 Aminoazido konposizioa	117
8.2.2 Propietate fisiko-kimikoak.....	119
8.2.3 Propietate termikoak.....	121
8.2.4. Propietate mekaniko, elektriko eta hesi-propietateak	123
8.2.5 Propietate morfologikoak	126
8.3 ONDORIOAK	128
9. LIKIDO IONIKO ETA ARTILEDUN KOLAGENO FILMAK.....	129
9.1 LABURPENA.....	131
9.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA.....	132
9.2.1 Propietate erreologikoak	132
9.2.2 Propietate termiko eta fisiko-kimikoak	133
9.2.3 Propietate morfologikoak	135
9.2.4 Propietate mekanikoak	136
9.2.5 Propietate elektriko eta dielektrikoak.....	138
9.3 ONDORIOAK	139
10. ONDORIO OROKORRAK	141
11. ERREFERENTZIAK.....	145

1. kapitulua

SARRERA

1.1 LABURPENA

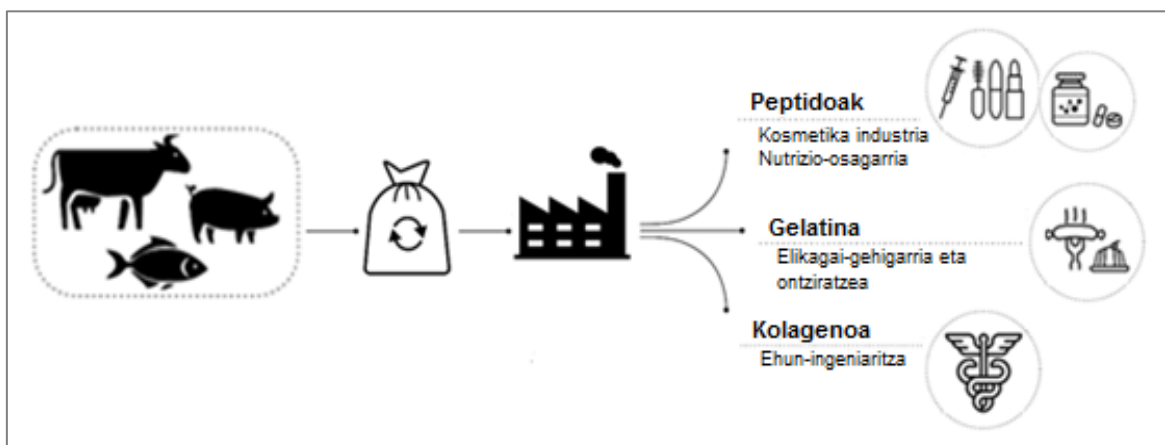
Plastiko kontsumoaren etengabeko igoerak, ingurumen kontzientziazioa areagotu du, hala nola fabrikazioan askatutako emisio, erabilitako errekurtso eta hondakinen gestioan (Clark et al., 2016). Hau dela eta, material biodegradagarriak ekoizteko baliabide berriztagarriek arreta berezia erakarri dute azken urteetan, petrolio-deribatutako polimeroak murriztu eta jasangarriagoak diren materialak garatzeko helburuekin (Gandini et al., 2016). Materialen balorizazioa bereziki, etorkizun handiko irtenbidea izan daiteke, hondakinak minimizatzeke ez ezik, balio erantsi handiko produktuak ekoizteko ere (Xiong et al., 2019). Testuinguru honetan, abeltzaintza eta arrainen prozesatze industrietan sortutako azpiproduktuetako biomaterialen erauzketak, besteak beste, proteina eta polisakaridoak, balorizazio erronka handia suposatzen du (Lee et al., 2020; Meena et al., 2020).

Kolagenoa, ornodunen matrize extrazelularreko (ECM) proteina ugariena da eta ugaztunen proteina-masa totalaren % 30 inguru osatzen duelarik (Balaure et al., 2019; Martínez-Ortiz et al., 2015). 46 polipeptido-kate ezberdinez osaturiko, 28 kolageno mota ezagutzen dira gutxienez, eta ehun konektibo, azala, tendoi, odol-hodi, kornea, kartilago eta hezurren parte handiena osatzen dute (Koch et al., 2001; Myllyharju eta Kivirikko, 2001). I, II eta III. motako kolagenoak, zuntz-egitura duten kolageno klasikoak dira eta hiru alfa polipeptido kate paraleloz osatzen dira, zeinak kate hauek beraien artean biltzen diren altuki ordenatutako zuntzexka erretikulatuak eratuz. Aldi berean, zuntzexka hauek zuntzetan biltzen dira matrize extrazelularra trinkotasun, eta helize hirukoitzeko estruktura konpaktu horri esker urarekiko egonkortasun eta erresistentzia mekaniko altuarekin hornitzen dute (An, Lin eta Brodsky, 2016; Liu, Hu eta Han, 2018). Esan beharra dago, egitura helikoidal hirukoitzaren errepikapena kolageno-mota guztietan aurki daitekeela, baina helizearen luzera eta helikoidala ez den zatiaren tamaina eta izaera aldatu egiten da kolageno mota batetik bestera (Miller, 1984; Shoulders eta

Raines, 2009). I. motako kolagenoa zehazki, azal eta hezurretan aurkitzen kolageno ugariena (% 90) da (Ding, Zhang eta Li, 2014).

Egitura rolaz gain, rol funtzionalak ere betetzen ditu kolagenoak, ehunen erregulazio, hazkuntza eta sendatzean parte hartuz (Ferreira et al., 2012). Propietate estruktural eta biologikoak hauek, gel, film, zare, aldamio eta zuntzak eratzeko zein erausteko duen erraztasunarekin batuz, kolagenoa ehun-ingeniaritza eta medikuntza birsortzailea bezalako aplikazio biomedikoetarako hautagai erakargarria bihurtzen dute (Agrawal eta Ray, 2001; Di Summa et al., 2014; MacNeeil, 2007; Muthukumar et al., 2018). Horretaz gain, kolagenoa farmazia- (Jeevithan et al., 2013), elikagai- (Wang et al., 2018) eta kosmetika-industrietan (Avila Rodríguez et al., 2018) oso erabilia da.

Kapitulu honek, kolagenoan oinarrituriko materialen ikuspegi orokorra eskaintzen du. Hasteko, bio-hondakinen balorizazioa eta kolagenoaren erauzketarako teknikak laburki azaltzen dira eta ondoren, kolagenoaren egitura eta propietateak aztertzen dira. Amaitzeko, kolagenoa eta kolageno-eratorriek elikagai industrian, kosmetikan eta biomedikuntza industrian duten aplikazio posibleak deskribatzen dira (**1.1 Irudia**).



1.1 Irudia. Laborpen grafikoa: kolageno-iturriak, balorizazioa eta aplikazioak.

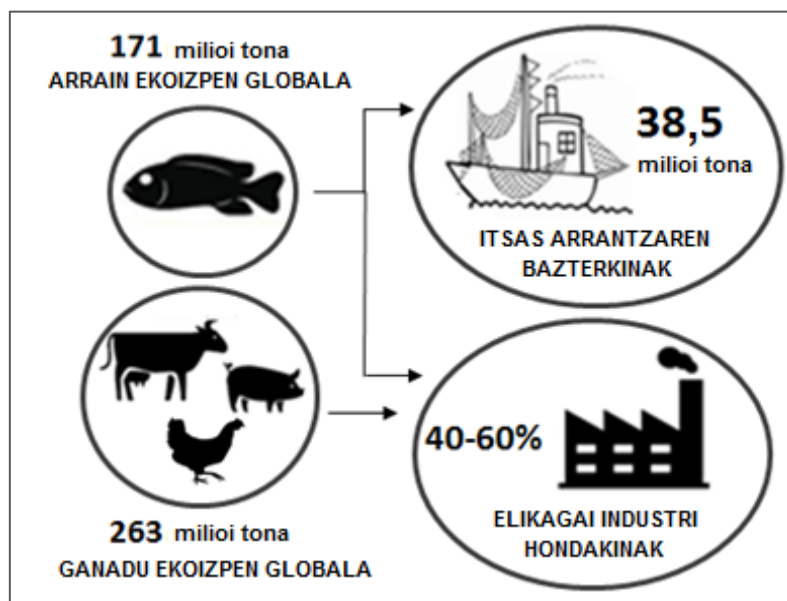
1.2 BIO-HONDAKINEN BALORIZAZIOA

Munduko biztanleria igoerak zein gizarte- eta ingurumen-kezkak direla eta, elikagaien ekoizpen jasagarria erronka kritiko bihurtu da. Testuinguru honetan, lehengaiak prozesatzean, hondakinen sorrera ezinbesteko emaitza izanik, balorizazio-estrategiak etorkizun handiko irtenbidea izan daitezke hondakinak minimizatzeko ez ezik, balio erantsi handiko produktuak sortzeko ere (Six, Velghe eta Verstichel, 2016; Xiong et al., 2019).

Nazio Batuek elikagai hondakinak, elikagai industrien birziklatu ez diren edo beste helburu batzuetarako erabili ez diren azken produktuak, bezala definitu zituzten. Hauek, berrerabiltzeko bilketa- eta berreskuratze-kostua baino balio ekonomiko txikiagoa duten lehengaien fluxu ez-produktiboak dira, eta beraz, hondakin gisa baztertzen dira (Nazio Batuak, 2015). Mundu mailan, elikagaien hondakinen prebentzioa sustatzeko hainbat ekimen ezarri dira bizi etapa guztietan. 2015. urtean, Nazio Batuek, kontsumo- eta ekoizpen-eredu iraunkorrek ziurtatzeko, Garapen Jasangarrirako 12. Helburua (GJH) definitu zuten, 2030erako munduko per capita elikagai-galera kontsumo- eta ekoizpen-eredu iraunkorrek bermatzeko, 2030erako txikizkako salmenta eta kontsumoan munduko per capita elikagai-hondakinak erdira murriztu, eta ekoizpen- eta hornikuntza-kateetako elikagai-galerak murrizteko helburuarekin, uzta ondoko galerak barne (Nazio Batuak, 2015). Ondoren, Europako Batzordeak helburu hori lortzeko konpromisoa hartu zuen Ekonomia Zirkularrerako Europako Ekintza Planean (Europako Batzordea, 2020), non ekologia industrialaren “sehaskatik sehaskara” eta “zero hondakin” bezalako kontzeptuak sustatu ziren. Hau horrela, elikagai-hondakinak proteina, polisakarido, lipido, mineral, mantenugai eta zaporeen iturri gisa ustiatzeak ikertzaileen eta industrien arreta erakarri du, elikagai-hondakinak balio erantsiko lehengai bihurtzea sustatuz (Martínez-Alvarez, Chamorro eta Brenes, 2015; Ong et al., 2018).

1. SARRERA

Ildo beretik, abeltzaintza, hegazti eta itsaskien prozesatze industrietako azpiproduktuen balorizazioa, produktu iraunkorrek garatzeko ikuspegi baliogarria izan daiteke. 2016an, akuikulturatik eta arrantzatik eratorritako itsaskien ekoizpen globala 171 milioi tona ingurukoa izan zen (FAO, 2018), eta horietatik 38,5 milioi tona arrantza osagarri edo bazterkin bezala jo ziren, arrain-espezie horiek merkatu balio baxua baitzuten (Etemadian et al., 2021). Bestalde, urtean 263 milioi tona abere ekoizten dira guztira (Aspevik et al., 2017). Gainera, elikagaien (arrain, ganadu eta haztegiko hegazti) industriako hondakin solidoak, produktu gordinaren pisuaren % 40-60a izatera irits daitezke, kolagenoan aberatsak diren azpiproduktu ugari sortuz: buruak, hezurak, odola, azala, erraiak, apatzak, azala eta lumak (Ferraro et al., 2017; Venkatesan et al., 2017) (**1.2 irudia**). Balorizazio-estrategiei dagokienez, kolagenoa ia ornodun guztietatik erauz daitekeen arren, behi-, txerri- eta oilasko azala eta hezurak dira eskala komertzialeko iturri nagusiak (Abdollahi et al., 2018). Hala ere, behien entzefalopatia esponjiformea (EEB) eta prioiek eragindako beste gaixotasunak zein kosher eta halal produktuei dagozkien erlijio faktoreak direla eta, arrain azpiproduktuak etorkizun handiko kolageno-iturri bihurtu dira (Coppola et al., 2020; Pal eta Suresh, 2016; Senadheera, Dave eta Shahidi, 2020).



1.2 Irudia. Arrain eta ganadu ekoizpen globala eta hondakinak.

Arrantza eta abeltzaintza azpiproduktuen kolageno erauzketa prozesua bi urrats nagusitan oinarritzen da: lehengaien aurretratamendua eta kolagenoaren erauzketa. Oro har, bai proteina ez-kolagenikoak eta lipidoak bezalako ezpurutasunak zein azken erauzitako kolagenoaren kalitatea hobetzeko aurretratamendu alkalinoa burutzen da (Ahmed et al., 2018); eta base sendo bat erabiliz egin daiteke, sodio hidroxidoa, esaterako (Kittiphattanabawon et al., 2016; Sinthusamran et al., 2014). Batzuetan, lipidoak kentzeko, etanola (Chen et al., 2016c; Tkaczewska et al., 2018), isopropanola (Sae-leaw et al., 2016) edo alkohol butilikoak (Gomez et al., 2018) bezalako alkoholak erabiltzen dira. Gainera, etilendiaminotetraazetikoak (EDTA) erabiliz lehengaiak desmineraliza daitezke, honela kaltzioa edo beste materia inorganikoak kentzen dira (Chuaychan et al., 2016). Ondoren, kolageno-erauzketa burutu ohi da.

Kolagenoa erauzteko metodo ugari daude, hiru erauzketa-prozesu nagusitan oinarrituak: gatzetan disolbagarria den kolageno (SSC) erauzketa, azidoan disolbagarria den kolageno (ASC) erauzketa eta entzimetan disolbagarria den kolageno (ESC) erauzketa (**1.3 Irudia**). Erauzketa-metodo horiek zuzenean eragiten dute kolagenoaren propietate eta errendimenduan (Wang et al., 2014), eta zenbait faktoreren mende daude, arrain-espezieen eta adinaren mende, adibidez (Liao et al., 2018). Azpimarratu beharra dago, erauzketa-tenperatura altu eta denborak luzeek erauzketa-errendimendu altuagoak eskaini arren, kolageno-erauzketaren barruko prozedura guztiak 24-48 orduz tenperatura baxuan (~4 °C) mantenduz egin oi direla, desiragarria ez den kolageno-degradazioa ekiditeko helburuarekin (Liu et al., 2015).

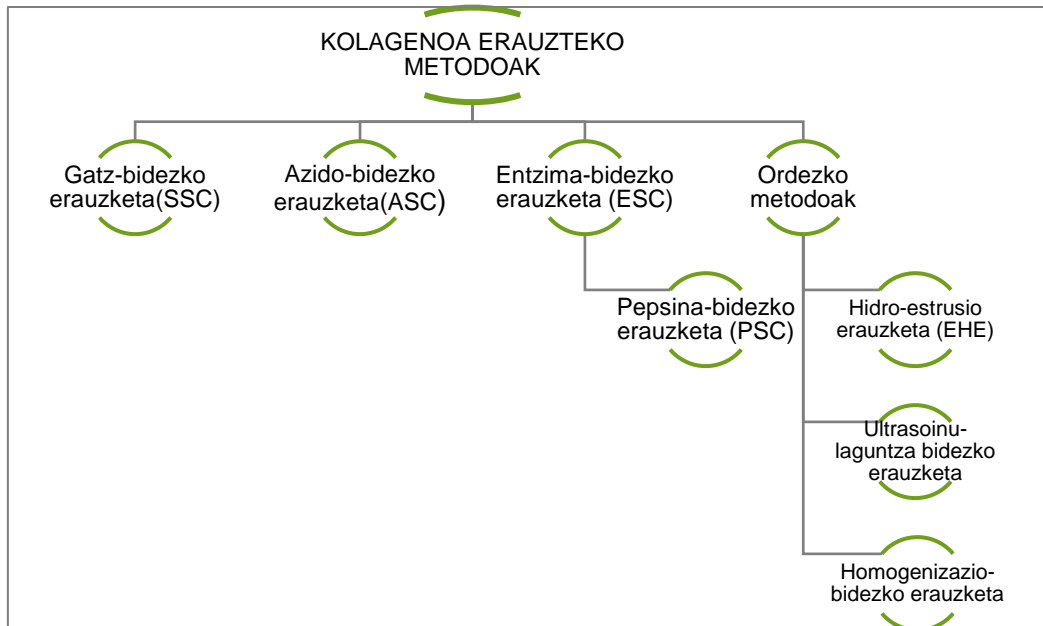
SSC erauzketari dagokionez, ASC eta ESC erauzketek baino errendimendu baxuagoa eskaintzen du (Liang et al. 2014a); eta beraz, ez da metodo oso erabilia. ASC erauzketaren kasuan, azido azetiko ingurunea erabiltzen da, kolagenoa zenbait azpiproduktutatik erauzi eta isolatzeko; adibidez, kolaka azala (Chen et al., 2016) eta lupi ezkatat (Chuaychan et al., 2015). Azido azetikoaz gain, beste azido organiko batzuk, hala nola azido zitrikoa (Sae-leaw et al., 2016) eta azido klorhidrikoa (Tan eta

Chang, 2018) edo azido fosforikoa (Hanjabam et al., 2015) bezalako azido ez-organikoak ere erabil daitezke kolagenoaren erauzketan. Hala ere, kateen arteko hainbat loturek, kolagenoak ingurune azidoan duen disolbagarritasuna mugatzen dutela kontuan hartu behar da; telopeptido mailan, aldehidoak lisina eta hidroxilisinarekin ematen duen kondentsazio erreakzioaren bidez eratutako lotura kobalenteek hain zuzen ere (Pal et al., 2015). Gainera, bai animalien habitat eta adin, zein kolageno-iturriek zuzenean eragiten dute keto-imina lotura kantitatean; ASC erauzketa errendimenduan, alegia. (Thuy et al., 2014). Disolbagarritasuna hobetu eta errendimendu handiagoa lortzeko, erauzketa-parametroak alda daitezke, hots, azidoen/lehengaien disoluzio-kontzentrazioa, erauzketa-tenperatura eta denbora; dena den parametro horiek kontrolatuak izan behar dira kolagenoaren degradazioa saihesteko (Pal eta Suresh, 2016). Kolagenoaren agregazio-mailaren arabera, erauzketa-prozesuan entzima proteolitikoak ere erabil daitezke eta, disoluzio azidoarekin konbinatuz (erauzketa kimikoa eta biologikoa), erauzketa-errendimendua handitu (Ahmad et al., 2017; Chen et al., 2016b; Chuaychan et al., 2015; Jridi et al., 2015; Liang et al., 2014b; Sila et al., 2015). Ohiko entzimen artean, tripsina eta pepsina digestio proteasak (Abdollahi et al., 2018) zein bakterio kolagenasak aurkitzen dira (Ahmed et al., 2018), pepsina izanik erabiliena eta bere bitartez erauzten den kolagenoari, pepsinan disolbagarria den kolageno (PSC) deritzo (Jeevithan et al., 2013). Digestio-proteasa honek, proteina ez-kolagenikoak ere hidroliza ditzake; eta ondoren, pepsina, gatza bidezko prezipitazioa eta dialisiaren bidez ezaba daiteke, erauzitako kolagenoaren purutasuna handituz. Gainera, pepsinak kolageno telopeptidoak hidroliza ditzake, ingurune azidoetan tratatutako kolagenoaren disolbagarritasunean lagunduz, eta beraz, ASC erauzketaren errendimendua handitu dezake (Wang et al., 2014). Nabarmendu behar da, pepsina komertziala, oro har, zerriaren mukosa gastrikotik lortzen dela; hala ere, zenbait muga erlijioso saihesteko, entzima proteolitiko ugari, pepsina barne, arrainaren erraietatik atera daitezke (Gómez et al., 2018). Horretaz gain, pHa, tenperatura, hidrolisi-denbora eta entzima kontzentrazioa eta erauzketa-parametro egokiak ezarri behar dira erauzketa etekin

optimoa izan dadin. Azken urteetan, SSC, ASC eta ESC erauzketa-metodoen etekina hobetzeko beste teknika batzuk ere erabili dira, ultrasoinu tratamendu eta homogeneousazioaren bidez lagundutako metodoak hain zuen ere (**1.3 Irudia**). Zou et al. (2017) lanean, dortoka oskoleko kalipetik kolagenoa erauzteko, ultrasoinu tratamendua (24 kHz, 200 W) erabili zuten. Tan eta Changek (2018) lanean berriz, kolagenoa siluru larrutik arrakastaz erauzi zen, siluru larruak azido klorhidrikotan eta pepsinan 7000 bira/min-ko abiaduran 5 minututan homogeneousatu arte nahastu eta ondoren, ordubetez 4 °C-tan irabiatuz.

Erauzketa-prozesuen ondoren, azken urrats batzuk egin ohi dira kolagenoa berreskuratzeke: gatz-hauspeatzea, zentrifugazioa, dialisia eta liofilizazioa. Gehienetan, kolageno-disoluzioa NaCl erabiliz hauspeatzen da. Kolagenoaren hauspeatzeko erabiltzen diren gatz-kontzentrazio hauek doi daitezke, kolagenoaren berreskuratzea eta ezpurutasunen ezabatzea maximoa izan daitezke. Ondoren, hauspeatutako kolagenoa jasotzeko zentrifugazioa (10000-20000 bira/min inguru) erabiltzen da. Lortutako prezipitatu azido azetikoan disolbatzen da ur destilatuaren kontrako dialisia egin aurretik. Azkenik, izoztu eta kolageno-hautsa lortzen da (Pal et al., 2015).

Arestian aipatutako metodo guztiak, oro har, denbora, energia eta errektibo kontsumitzen dituzten lote-prozesuak dira. Hori dela eta, ordezeko erauzketa-metodo berriak garatzen ari dira, besteak beste, hidro-estrusioa erauzketa (EHE) prozesuak (**1.3 Irudia**). Elikagai industrian, estrusioa oso erabilia den prozesatze metodo bat da, ekoizpen jarraitua, errendimendu altuak eta hondakin kopuru txikiak eskaintzen baititu. Horrela, Huang et al. (2016) lanean, tilapia ezkatetatik kolagenoa erauzteko EHEren prozesu berri bat garatu zen, non estruzio bidez lorturiko ezkata-laginek, estruitu gabekoek baino 2-3 aldiz errendimendu handiagoak aurkeztu zituzten.



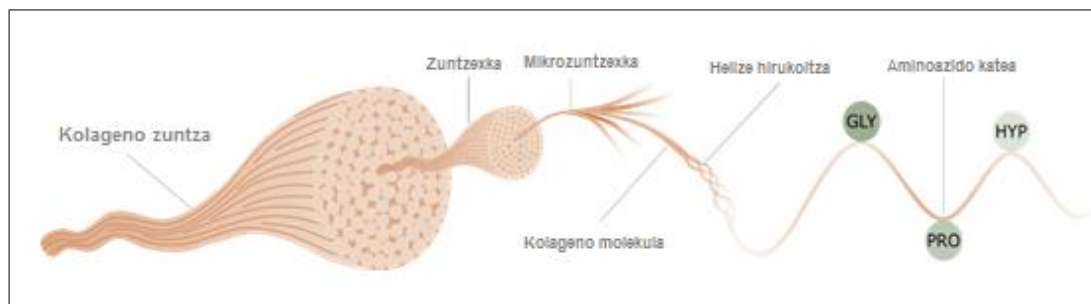
1.3 Irudia. Kolagena erauzteko metodoak.

1.3 KOLAGENOAREN EGITURA ETA PROPIETATEAK

Kolagenoek, matrize estrazelularren (ECM) proteina famili handiena osatzen dute (Exposito et al., 2002). Izan ere, kolagena, ornodunetan aurki daitekeen proteina ugariena da, ugaztunen proteina totalaren % 30 ingurukoa izanik (Richard-Blum, 2011). Kolageno guztien egitura, ezkerrean biratzen diren hiru α kate polipeptidiko elkarren baitan bilduzeskuinera biratzen den helize hirukoitzeko unitatean bereizgarrian oinarritzen da (Brodsky eta Ramshaw, 1997; Shoulders eta Raines, 2009). Oro har, polipeptido kate bakoitzak 1000 aminoazido inguruz dago osatua eta gutxienez Gly-X-Y sekuentzia errepikakor zati bat du, non Gly glizina den eta X eta Y edozein aminoazido izan daitekeen. Sekuentzia honek, helize hirukoitzeko egitura eratzea ahalbidetzen du, glizina proteinaren nukleoan eta X eta Y aminoazidoak azalean geratuz (Van der Rest eta Garrone, 1991). Horretaz gain, prolina (Pro) eta hydroxiprolinak (Hyp) elkar jarraitzen dute maiz eta katearen % 10 inguruk Gly-Pro-Hyp sekuentzia errepikakorra aurkezten dute (Patino et al., 2002). Ildo horretan, kolageno guztiek helize hirukoitzeko egitura aurkezten duten arren, beste egitura tridimentsional batzuetan tolestean diren eremu ez-kolageniko ezberdinei esker, kolageno tipo bakoitza bakarra da (Sherman, Yang eta

Meyers, 2015). Honela, gaur egun kolageno gisa 28 proteina daude identifikatuak, gizakietan ezagutzen diren osagai berak izanik eta beren egitura supramolukarretan oinarrituta, bi multzo nagusitan sailka daitezke: zuntz egiturako kolagenoak eta zuntz egitura ez duten kolagenoak (Heino, 2007).

Zuntz egiturako kolagenoak, helize hirukoitzeko eremu handiago batez osatzen dira, zeinak elkarrekin biltzen diren altuki ordenaturiko zuntz eta zuntzexkak eratuz. Egitura hauek, lamina edo beste egitura batzuetan biltzen dira askotan propietate biologiko, biomekaniko eta zuntz-propietate espezifikoak eskainiz (Lodish et al., 2000) (**1.4 Irudia**). Kolageno klasiko hauen artean, I, II, III, V eta XI. kolageno motak dira ezagunenak eta berriki karakterizaturiko kolageno XXIV eta XXVII motakoak ere zuntz egiturako kolageno taldean sar daitezke (Hulmes, 2002). I. kolageno mota da larru, tendoi, hezur, kornea eta biriketan aurkitzen den egitura proteina ugariena da, kolageno totalaren % 80-99 osatzen duelarik. II. kolageno motak berriz, ehun-konformazio espezifikoa du, funtsean kartilagora mugatua, eta III. motakoa, berriz, ehun elastikoetan aurkitzen da, hala nola enbrioi-azalean, biriketan eta odol-hodietan. V eta XI. kolageno motak I. kolageno motaren inguruan eta II. kolageno motaren inguruan, hurrenez hurren (Van der Rest eta Garrone, 1991). Gutxi dakigu, XXIV eta XXVII motako kolagenoari buruz; badirudi XXIV, II. motako ehunei eta XXVII, I. motako kolagenoari lotuta daudela eta beraien (Gly-X-Y) sekuentzia erlatiboki motza dela (Plumb et al., 2007). Azpimarratu beharra dago kolageno zuntzexka gehienak bi kolageno mota edo gehiagoz osatuak daudela (Patino et al., 2002).



1.4 Irudia. Zuntz egiturako kolagenoa.

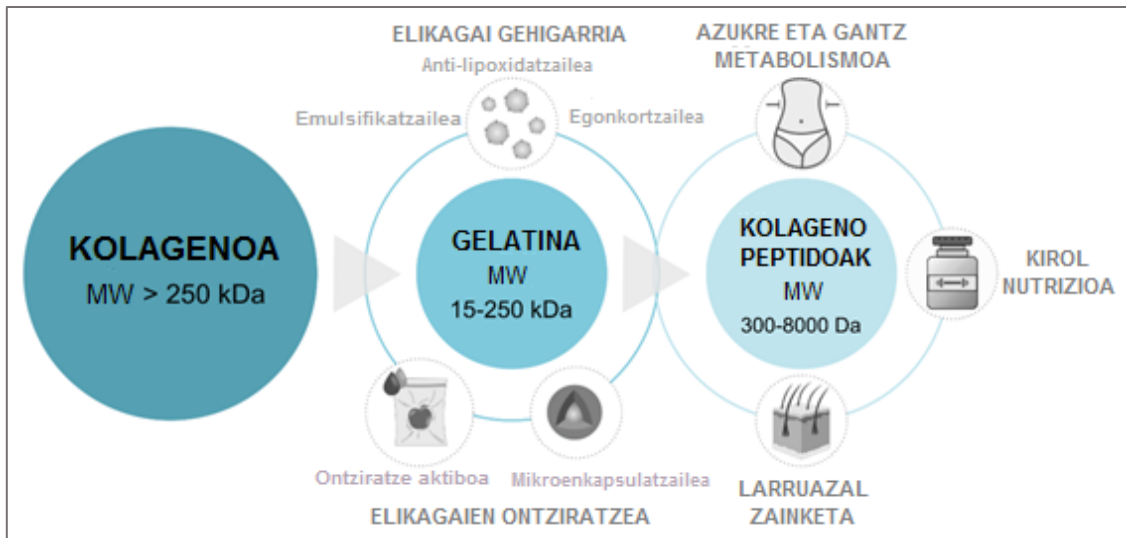
Zuntz egitura ez duten kolagenoen kasuan, berain ezaugarri molekular, egitura supramolekular eta sare extrazelular motaren arabera, mintz basal, aledun harizpia, kate laburreko kolagenoak eta zuntzexketara lotuta kolagenotan (FACIT) sailkatzen dira. Mintz basaleko kolagenoa, IV. mota barne, ehunen mugetan aurkitzen diren egituretan hartzen dute parte, hala nola, zelula epitelial, endotelial, adiposo, gihar, nerbio eta baita lotura dermoepidermikoan ere aurki daitezke (Gelse, Pöschl eta Aigner, 2003). VI. kolagenoa, harizpiko kolageno nagusia da eta ehun konektibo ia guztietan agertzen dira eta egitura lanak burutzen ditu (Knup eta Squire, 2005). Kate motzeko kolagenoen artean berriz, VIII. motakoa endotelio-zeluletan eta X. motakoa kartilagoaren eremu hipertrofikoetan aurki daitezke (Sutmuller, Bruijn eta Hear, 1997). Azkenik, FACIT taldea, IX, XII, XIV, XV, XIX, XX eta XXII motako kolagenoek osatzen da (Gelse, Pöschl eta Aigner, 2003). IX. motako kolagenoa talde honen sortzaileetako bat da, eta kartilagoko kolageno-zuntzeken osagai garrantzitsua da, II. eta XI. kolagenoarekin batera. XII. eta XIV. motako kolagenoaren antzeko egitura ere, I. motako kolagenoarekin lotu izan da larruazal, tendoi, lotailu eta kornean (Sherman, Yang eta Meyers, 2015). Zuntz egitura ez duten kolagenoen sailkapen labur baten ondoren, kapitulu honetan zuntz-egiturako kolagenoak aztertuko dira.

Tradizionalki, zuntz-egiturazko kolagenoei egitura-funtzioa esleitu izan zaie, ehunen antolamendu, forma eta propietate mekanikoetan parte hartuz. Antolamendu altuko kolageno zuntzexkak, kolagenoan aberatsak diren ehunen oinarrizko egitura blokea izanik, hezur, azal, tendoi eta lotailu zein odol-hodi, nerbio eta heste bezalako egitura konplexu anitzetan mihiztatzen dira, propietate mekaniko oso desberdinak eskainiz, hala nola, egonkortasun, erresistentzia eta zailtasun mekanikoa (Fratzl et al., 1998). Egitura-funtzioez gain, kolagenoak zuzen eta zeharkako funtzio rolak ere betetzen dituela frogatu da (Ghodbane eta Dunn, 2016). Zelulak atxikitze eta hazteko substratu gisa jarduteko duen gaitasuna dela eta, gailu mediko berriztagarriak diseinatzeko hautagaitzat hartu da kolagenoa. Gainera, kolagenoa, hein handi batean,

ez-inmunogenikoa eta ez antigenikoa, eta beraz, biobateragarria da (Lynn, Yannas eta Bonfield, 2004). Hori gutxi balitz, nahiz eta kolagenoa proteasa arruntekiko erresistentzia eta beraz, bizitza baliagarri luzea izan, gorputzean biodegrada daitezke matrize metaloproteasiko (MMP) familiako entzima batzuen bitartez, kolagenozko material biodegradagarriak emanez (Fu et al., 2018). Kolageno-egitura horiek, propietate fisiko eta biologikoak, zein gel, film, sare, aldamio eta zuntzak osatzeko duten aldakortasun fisikoa direla eta, kolagenoa hainbat aplikaziotarako hautagai erakargarria bihurtu da.

1.4 KOLAGENO ETA KOLAGENO-DERIBATUEN APLIKAZIOAK

Kolagenoa, matrize extrazelularreko osagarri nagusia da eta gel, aldamio porotsu, zuntz, film, zere eta mikropartikula/nanopartikula bezalako hainbat produktu osatzeko duen aldakortasun fisikoa eta bere propietate funtzionalei esker, elikagaien industrian eta kosmetikan oso erabilia da (**1.5 irudia**), bai zuntz-egituran eta baita desnaturalizazioaren ondoren ere (Olivira et al., 2021). Testuinguru honetan, 15 kDa eta 250 kDa bitarteko pisu molekularreko (MW) kolageno desnaturalizatua den gelatinak, propietate erreologiko bakarrak aurkezten ditu eta elikagai industrian elikagai-gehiragari, mikrokapsulatzaille eta ontziratze material biodegradagarri gisa erabiltzen da (Bello et al., 2020). Bestalde, 300-8000 Da bitarteko aktibitate biologiko altuko peptidoak, kolageno edo gelatinari hainbat hidrolisi kimiko, tratamendu entzimatiko edo/eta fermentazio proteolitiko burutuz erauzten da (León-López et al., 2019). Kolagenotik eratorritako peptidoei buruzko ikerketek, oxidazio eta hipertentsioaren aurkako propietateak, bai eta aplikazio kosmetiko zein nutrazeutikoetarako etorkizun handiko beste propietate onuragarri batzuk erakutsi dituzte (Ngyen, Heimann eta Zhang, 2020).



1.5 Irudia. Kolagenoaren aplikazioak elikagai eta kosmetika industrian.

1.4.1 Peptidoak kosmetika eta industria nutrizeutikoan

Arestian aipaturiko propietate bioaktiboek esker, kolagenoa adinaren aurkako produktu kosmetikoen formulazioetan sarri erabili ohi da, propietate hidratatzaile, leungarri, antioxidatzaile eta UV-izpiekiko babesa eskainiz (Abuine et al., 2019; Zamorano-Apodaca et al., 2020) (**1.5 Irudia**). Esan beharra da, kolageno hidrolizatuak direla formulazio hauetan erabilienak, pH neutroetan duten disolbagarritasun handia, ura xurgatu eta dermisen sartzeko duten gaitasunari esker kolageno natiboa baino efektu hobeak eskaintzen baitituzte (Alves et al., 2017; Skov et al., 2019). Dena den, kolageno hidrolizatu epidermisen sar badaiteke ere, ezin du azaleko kolageno galdua ordezkatu (Venkatesan et al., 2017). Hau horrela, kosmetika-industriek larruazalpeko injekzio eta ahozko osagarrietan jarri dute interesa. Biodegradagarritasuna, prezioa eta ekoiztu izateko duen erraztasuna dela eta, kolageno injekzioak, akats dermatologikoak konpontzeko erabili izan dira, baita larruazalpeko arazoak konpontzeko ere, hala nola akne-orbainak eta zahartze-sintomak (Cockerham eta Hsu, 2009). Badirudi, kolageno dermisen injektatzen denean fibroblastoen ahalmen biosintetiko eta ingurune fisiologiko ezin hobea sortu eta beraz, zelula-jarduera, hidratazioa eta kolagenoaren sintesia hobetzen dituela (Ganceviciene et al., 2012). Horretaz gain, berriki, kolagenoan

oinarrituriko osagarriek larruazalaren itxuran eragin positiboak dituela jakin da (Wang et al., 2018a). Likido, pilula edo elikagai funtzional gisa peptido bioaktiboek digestio-erraztasunak fibroblastoen dentsitatea handitu eta ondorioz, kolagena sortzen laguntzen duela dirudi. Honela, zenbait ikerketek, peptido bioaktiboek eguneroko osagarriak, larruazalaren hidratazio, zimur, elastikotasun eta dentsitatearekiko eraginkorrak direla frogatu dute (Genovese, Corbo eta Sibilla, 2017; Ito, Seki eta Ueda, 2019; Kim et al., 2018).

Aplikazio kosmetikoez gain, berriki egindako zenbait ikerketek, kolagenoak elikagai funtzional, pilula eta edari gisako osasun-aplikazioetan duen potentziala erakutsi dute (Bilek eta Bayram, 2015; Guo et al., 2015; Pal eta Suresh, 2016). Batetik, kolageno peptidoek, gantz-azidoen metabolismoa handitu eta gantzak erretzen zituzten, baita hipertentsioa eta hiperlipedemia murriztu ere. Horrez gain, gibelesko gantz-azidoen sintesia inhibi dezakete, gibelesko gantz-metaketa murriztuz (Ishak eta Sarbon, 2018). Bestetik, Lauritano eta lanora (2016) lanean, intsulinarekiko sentikortasuna handitu eta odoleko azukre maila txikitu dezake, bere ahalmen antioxidatzaileari egotz dakiokelarik. Beraz, peptido bioaktiboek, obesitatea eta 2. motako diabetesa prebenitu eta tratatzeko erabil daitezke, pisu galeran lagundu eta odoleko lipido zein glukosa-mailak berrezarrituz (Ambassador et al., 2018). Ildo horretan, beste ikerketa batzuk, kolageno hidrolizatuaz aberasturiko elikagai edo edarien kontsumoak zaurien sendatze, hezurren eraketa, mineral-dentsitatearen igoera eta osteoartritisaren prebentzioan lagun dezaketela aditzera eman zuten (Sato, 2017; Suresh et al., 2015). Kirol-elikadura arloan ere mantenuetikaren industriak kolagenezko osagarri dietetikoak eskaintzen ditu; izan ere, muskulua handitu, indarberritze-denbora murriztu, kaltetutako artikulazioak berreraiki eta errendimendu kardiobaskularra hobetu ditzakete (Oer-Hagemann et al., 2019).

1.4.2 Gelatina elikagaien industrian

Kolageno eta gelatinak, elikagaien industrian, hainbat erabilera aurki ditzakete, hala nola, elikagai-gehigarri eta ontziratze material gisa (**1.5 Irudia**). Gehigarrien dagokienez, elikagaien kolore, testura, zapore eta trinkotasuna bezalako ezaugarriak aldatzeko, gelatina gehitzen da elikagai-prozesaketan. Oro har, elikagaien egonkortzaile eta loditzaile gisa erabili ohi da, gel, emulsio edo apar egonkorak eratzeko hain zuzen ere (Mardani et al., 2019; Yan et al., 2020). Gelatinaren erabilera ezagunena ur-gelezko postreetako gelifikazio-agentearena da, bere testura atseginagatik, baina hidrogel lotura disolbaezinak eratzeko ere erabili ohi da, bere formari eusten baitio uraren xurgapen oreka lortu ondoren (Huang et al., 2019; Li et al., 2021). Beste aldetik, termikoki trataturiko kolageno-zuntzak, emulsionatzaile sintetikoen ordeztako natural gisa erabili ohi da, bereziki produktu azidoetan. Adibidez, kolagenoa gehitzean hestebeteen propietate erreologikoak hobetu eta olioaren emulsioa-teknikan sor daitezkeen gantz-tapoiak saihesten laguntzen du (Fustier et al., 2015; Huang et al., 2020). Azkenik, bere propietate antioxidatzaileari esker, kolageno-hidrolizatua lipidoen peroxidazioa inhibitzeko erabili izan da maiz, lipido horien erreakzio-produktuak giza osasunerako arriskutsuak baitira (Bolognesi, Spier eta Rocha Garcia, 2020). Jarduera antioxidatzaile hori, histidinaren imidazol taldearen xurgatze-ahalmen lotuta dago (Pan et al., 2020).

Gelatinan oinarrituriko film eta estaldurek zeregin garrantzitsua izan dute elikagaia babestu, mantendu eta bizitza-baliagarria luzatzeko ontziratze-material jasangarrien garapenean (Moreno et al., 2018; Pellá et al., 2020). Orokorrean, elikagaiak ontziratze materialak, oxigeno eta hezetasunaren migrazioaren aurkako babesa eskaini, ezaugarri sensorialak mantendu eta gantzen oxidazioa, dekolazioa eta aktibitate mikrobiarra ekidin behar dute (Regubalan et al., 2018). Hau honela, gelatina oso aztertua izan da filmak eratzeko duen gaitasuna, biodegradagarritasuna eta gasekiko dun hesi-propietate bikainei esker. Hala ere, bere erresistentzia mekaniko baxuak, elikagaien ontziratze zuzena mugatzen dute, hezetasun handiko elikagaiekin

kontaktuan jartzean puztu eta disolbatu egiten baitira (Jiang et al., 2020; Liu et al., 2020). Propietate hauek hobetzeko, erretikulazioa (Beghetto et al., 2019; Tonndorf, Aibibu eta Cherif, 2020; Uranga et al., 2020; Wu et al., 2019) bezalako metodo fisiko eta kimikoak zein beste biopolimero batekin konbinatzeko (Bhumbhar, Bhagwat eta Dandge, 2019; Hou et al., 2020; Zhuang et al., 2017) estrategiak erabili ohi dira. Erretikulatzaileek gelatina kateen mugikortasuna murrizten dute, egonkortasun dimentsionala, ura eta beroarekiko erresistentzia, hesi-propietate eta propietate mekanikoak hobetuz (Huang et al., 2019).

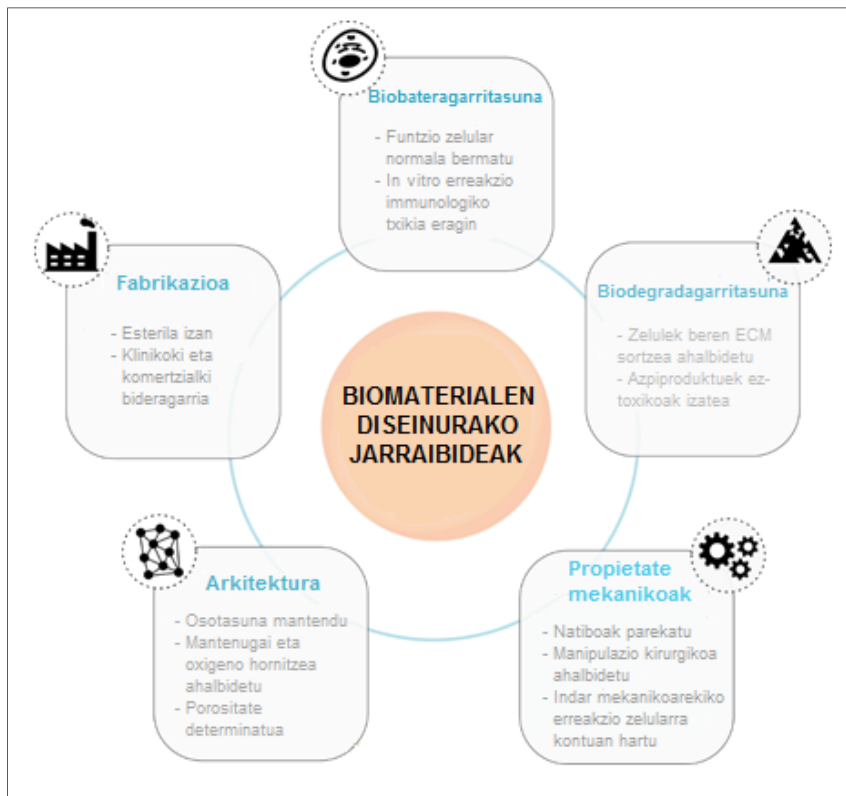
Koestrizio-bidezko hestebete-bilgarrien produkzioa izan da kolageno eta gelatina filmen aplikazio industria esanguratsuenak. Dena den, gelatinak hezetasunarekiko duen sentikortasun handiak bilgarrien propietate mekaniko eta hesi-propietateak murrizten ditu (Chen et al., 2019; Tosati et al., 2017) eta arazoari aurre egiteko, geruza anitzeko egiturak erabili ohi dira estrategia bezala; non baldintza espezifikoak betetzeko hezetasun eta oxigeno hesi-propietate desberdineko geruzak konbinatzen diren (Figuroa-López et al., 2018; Nilsuwan et al., 2020; Wang et al., 2020).

Azken urteetan, gelatina izan da sustantzia bioaktiboaren eramaile erabilienetariko bat. Gelatina film eta estaldurak oxidazio eta mikrobioen aurkako propietateak dituzten osagarriekin funtzionaliza daitezke, ontziratze aktiboak lortuz. Hainbat eta hainbat bioaktibo dauden arren, azken urteetan, landare estraktuek geroz eta interes handiagoa sustatu dute, hala nola, erromeroa (Yeddes et al., 2020), mahatsa (Rodrigues et al., 2020), limoia (Jiang et al., 2020) eta oreganoa (Almirante Nava et al., 2020). Estraktu horiek argia, beroa eta oxigenoaren eraginez desaktibatuta egiten direnez (Molino et al., 2020), zenbait ikertzaile, material solido, likido eta gaseosoak mikrokapsuletan sartzen zaiatu dira, osagarri funtzionalak eramaile batean bildu, babestu eta haien askapen kontrolatu lortzeko helburuarekin (Mohseni eta Goli, 2019). Gainera, kapsulazioa, landare-estraktu batzuen zaporea eta usaina gutxitzeko erabilgarria izan daiteke. Beraz,

gelatinan oinarrituriko elikagai formulazio funtzionalak fabrikatzeko kapsulatze teknologia oso erabilgarria izan daiteke (Kuai et al., 2020; Paula et al., 2019; Peanparkdee, Yamauchi eta Iwamoto, 2018; Rezaee et al., 2018).

1.4.3 Kolagenoa biomedikuntzan

Ehun-ingeniaritza, ingeniaritza eta biologia ezagutzak konbinatzen dituen diziplina anitzeko eremua da, non kaltetutako ehunak eta organoak ordezkatu edo hobetzeko gai diren ehun-ordezkoak garatzen ditu. Zientzia honen metodologia biologikoki aktiboak diren zelulak, molekulak eta materialak integratzean oinarritzen da, jatorrizko egitura birsortuz (Langer eta Vacanti, 1999). Testuinguru honetan, materialak, zelulen ugalketarako beharrezko den egitura integritatea emateko txantilo gisa jokatu, espazio potentziala zehaztu, birsortze bitarteko berregituraketan gidatu, mantenugai eta gas difusioa ahalbidetu eta propietate mekanikoak eskaintzen ditu (Hollister, 2009). Hau da, materiala zelulentzako mikroingurumen egokia sortzen saiatzen da (**1.6 Irudia**).



1.6 Irudia. Biomateriala hautatu edo diseinatzean kontuan hartu beharrezko irizpideak.

Hasiera batean, biomedikuntza arloan erabilitako biomaterialak geldoak izan ziren, hala nola, metalak eta zeramikak, immunitate-erantzuna saihesteko helburuarekin. Hala ere, denboraren poderioz eta biologia zelularraren kontzientzia handiagoarekin, material berriak erabiltzen hasi zen, polimero natural eta artifizialak, besteak beste. Material hauen erabilera etorkizun handiko ikuspegia izan da, aldami baten funtzioa betetzeaz gain, organismoarekin berezko interakzioa baitute, birsorkuntza aktiboa bultzatu eta ehun berrien garapena erraztuz. Polimero hauen artean, kolagena da erabiliena, matrize extrazelular natiboa baita (O'Brien, 2011) eta beraz, biobateragarri, biodegradagarritasun eta moldagarritasun handia aurkezten du. Hala ere, kolagenoak propietate mekaniko eskasak aurkezten dituen zuntz egiturak dauka eta beraz, aldaketa batzuk burutzea beharrezkoa da eraginkortasun ezin hobea izan dezan (Benayahu et al., 2018, 2020; Yang, Best eta Cameron, 2016). Erabilitako estrategietako bat, kolagena eta beste polimero natural batzuen arteko konbinazioa da. Kolagena eta kitosanoaren arteko konbinazioa bereziki asko erabiltzen da, ehun-ingeniaritzako aplikazioetan potentzial handia baitu (Shah et al., 2019). Kitosanoak biobateragarritasun handia, degradazio ertaina eta mikrobioen aurkako babesa eskaintzen du, besteak beste. Horrela, kitosanoa gehituz, osotasun, propietate mekaniko eta bideragarritasun hobeko xafla egiturak lortzen dira (Hayshi et al., 2012; Hollister, 2009; McBane et al., 2013). Bibliografiaren arabera, kolageno-kitosano konstruktuek ezaugarri egokiak kolageno kontzentrazio handiagoak erabiltzen direnean (> % 50) aurkezten dituzte, kitosano proportzio txiki bat nahikoa baita zelulen atxikidura eta proliferazioa mantenduz nahi diren propietate mekanikoak lortzeko (Pezeshki-Modaress, Zandi eta Rajabi, 2018).

Berriki, materialen ezaugarriak egokiak direla bermatzeko estrategia fisiko eta kimikoak ezarri ziren. Batetik, ezaugarri mekanikoak teknika fisiko edo kimikoen bidez optimiza daitezke; interakzio ez-kobalenteak sortuz, UV-izpien edo tenperaturaren bidez, adibidez (Guan et al., 2017). Baina, prozesuaren monitorizazioa zaila izan ohi da

eta ez du baldintza mekanikoak betetzeko erretikulazio-maila nahikoa lortzen (Perez-Puyana et al., 2019). Horregatik, biomaterialen, hots, kolageno-kitosano aldamioren, mugak gainditzeko ikuspeirik ohikoena, erretikulazio kimikoa da. Metodo honen bitartez, materialari konposatu kimiko bat gehitzen zaio lotura kobalenteak sortu eta molekulen artean interkonexioak lortzeko. Metodo honen bitartez bai propietate mekanikoak eta egonkortasuna hobetzea lortzen da. Hala ere, aldamiorearen barruan erreakzionatu gabe gelditzen den erretikulatzaileak zitotoxikotasuna areagotu dezake, baita erreakzioak berak eragindako prozesatze-zailtasuna ere (Hennink eta van Nostrum, 2012; Reddy, Reddy eta Jiang, 2015; Shah et al., 2019).

Erretikulatzaile kimiko asko daude, lortu nahi den hobekuntza-mailaren arabera. Kolageno eta kitosanoz egindako ehun artifizialen kasuan, konposatu kimiko erabilienetako bat glutaraldehidoa da, oso eraginkorra baita, baina % 10etik gorako kontzentrazioek zitotoxikotasuna eragiten dute (Liu, Ma eta Gao, 2012; Reddy, Reddy eta Jiang, 2015; Reyna-Urrutia et al., 2019). Azido tanikoa berriz, mikrobio, inflamazio eta oxidazioaren aurkako propietateengatik da ezaguna (Shah et al., 2019; Sionkowska, Kaczmarek eta Lewandowska, 2014); N-etil-N´-(3-dimetilamino propil) karbodiimida eta N-hidroxisukzinimida (EDC-NHS) konbinatuta, egitura porotsua mantentzen da (Martínez et al., 2015; Reddy, Reddy eta Jiang, 2015); eta azido zitriko esker, bi materialen arteko lotura berriak sor daitezke, biojuntagailu berriak eginez (Reddy, Reddy eta Jiang, 2015; Uranga et al., 2019). Azkenik, Gardenia jasminoidetan aurkitzen den genipin aglikonoa aurki daiteke. Konposatu natural hau eraginkorra da kontzentrazio baxuetan eta molekula barneko eta molekulen arteko loturak sortzen ditu kolageno eta kitosanoen amina primarioen artean, eta jatorrizko porositatea mantentzen duen egitura guztiz egonkorra lortuz (Perez-Puyana et al., 2019; Yan et al., 2010). **1.1 Taulan**, arestian aipatutako erretikulatzaileak erabiliz lortutako kolageno-kitosano aldamioren propietateak laburtzen dira.

1.1 Taula. Kolageno-kitosano aldamiotan erabiltzen diren erretikulatzaile ebaluazioa, erretikulazioaren eraginkortasun edo maila, zitotoxikotasun, propietate biomekanikoen hobekuntza eta ondoriozko egitura morfologiaren arabera. Tekniken arteko desberdintasunak ---/+++ eskalan ageri dira; non +++ gurutzatze, zitotoxikotasun eta hobekuntza biomekanikoaren maila handienari dagokion.

ERRETIKULATZAILEA		ERRETIKULAZIO MAILA	ZITOTOXIKOTASUNA	PROPIETATE BIOMEKANIKOAK	EGITURA MANTENTZEA
FISIKOAK	Temperatura	-	--	++	Ez da aldatzen
	Glutaraldehidoa	+++	+	+	Porotxiak
	Azido tanikoa	+	-	+	Porositate altua
KIMIKOAK	EDC-NHS	+	-	+	Ez da aldatzen
	Azido zitrikoa	+	-	+	Gainazal zimurragoa
	Genipina	++	-	+	Ez da aldatzen

Bere ezaugarri bikainei esker, moldagarritasuna bereziki, bikainak dituenek, kolageno eta kitosanoaren arteko konbinazioa ehun-mota ugari birsortzeko erabili da. Aplikazio zabalenetako bat hezurra birsortzea izan da. Frogatu ahal izan denez, kolageno-kitosanoaren mintzek kolagenoz soilik eratutako aldamiok baino haustura-elongazio handiagoa eta degradagarritasun-tasa txikiagoa dute; hauek hezur-birsorkuntzarako faktore kritikoak direlarik (Guo et al., 2020). In vitro, kolageno-kitosano konbinazioak osteoideak bereizteko gaitasuna du, baita bereizketa zehatzik ez dagoenean ere, eta horrek autobereizketa eragiteko gaitasuna adierazten du (Georgopoulou et al., 2018; Wang et al., 2016a). In vitro, kolageno-kitosano konpositeek, propietate ezin hobekak erakutsi dituzte hezurren birsorkuntza gidaturako ere. Kasu honetan, elektrohariketa bidez lorturiko kolageno-kitosano mintzen bidez hezur berria sor daiteke kalbario hezurretako akats ereduatan. Zortzigarren astean, hezur-ehun masibo eta helduek guztiz berrezarri zuten garezurreko akatsa (Guo et al., 2020; Lotfi et al., 2016). Era berean, karbodiimidarekin lotutako kolageno-kitosano aldamiok, untxiaren kartilago articularreko akatsen birsortzea sustatzen zuela frogatu zen.

Kartilagoaren eraketa berria hilabeteren buruan ikusi zen, eta 6,5 hilabeteren buruan, zelula kopurua, kolageno edukia zein konpresio eta biltegitate moduluak ohiko kartilagoaren balioetara hurbildu ziren (Whu et al., 2013). Duela gutxi, hidroxiapatitaz aberastutako kolageno-kitosano egitura porotsua osagai bioaktibo gisa garatu zen (Campos et al., 2020).

Kitosano-kolageno aldamioek gertuki hurbiltzen dira larruazaleko matrize extrazelular natiboaren egitura-hierarkia, antolaketa, konposizio biokimiko eta ezaugarri funtzionaletara. Gainera, konposateak propietate hemostatikoak eta bakterioen aurkakoak propietateak ditu, baita fibroblastoen indukzioaren bidez matrize extrazelularreko konposatuen sintesia azkartzeko ahalmena ere; beraz, larruazal-ehunaren ingeniartzarako potentziala du. Mikrozuntzeko egiturek propietate horiek erraztu ditzakete, frogatuta baitago erretikulaturiko mikrozuntzeko kolageno-kitosano aldamioek lurruntze bidezko ur galera kontrola dezaketela. Gainera, aldamioa aplikatu eta 14 egunera, fibroblastoen infiltrazio gidatuaren eta kolagenoaren birmoldaketaren bidez eta aldamioaren degradazioarekin sinkronian, zauriak berriro epitelizatzen direla frogatu da (Sarkar et al., 2013). Larruazaleko ehun ingeniartzan, injertoaren lodiera funtsezkoa da, konstruktua ezarpenaren eraginkortasunean eragina baitu. Aldamio meheenek, batez ere 0,5 mm-ko lodierakoak, antolatutako fibroblastoen infiltrazioa eta kolagenoaren birmoldaketa hobetu egin zuten. Larruazaleko akatsetan inplantea jarri eta 16. astean, inplante horiek erabateko degradazioa, ongi antolaturiko ehun osasuntsuaren bidezko ordezkapen totala, hodi berrien sortzea eta jatorrizko azalaren % 76ko trakzio-erresistentzia erakutsi zuten (Haifei et al., 2014).

Duela gutxi, kolageno-kitosano konbinazioa ehun neuralarekin zerikusia duten gaixotasunetan erabiltzeko zenbait saio egin dira, hots, bizkarrezur-muineko lesioan. Kasu horretan, 3D inprimaketa bidez sorturiko aldamioek eragin terapeutiko garrantzitsuak izan ditzakete, axoiak hausturan zehar lotuz eta zelulak mugikortasuna ahalbidetuz; eta horrela, axoien birsorkuntzarako mikroingurune partzialki berrezartzen

da. Arratoi-modeloetan ezarri ondoren, nerbio-zuntzen birsorkuntza eta berreskuratze neurologiko eta lokomozioaren berreskuratzea lortu ziren (Sun et al., 2019).

1.4.4 Etorkizuneko ikuspegia eta ondorio nagusiak

Biomedikuntzaren arloan, kolageno eta kitosano konstruktuen propietateak eskakizun klinikoetara egokitze ahalegin handiak egiten ari dira. Hari beretik, gehigarri bidezko fabrikazioko tekniken garapenak aurrerapauso handiak ekarri ditu, 3D forma konplexuak azkar erreproduzitzeko aukera ematen baitute. Duela gutxi, 4D inprimaketa berritzailean, material tradizionalak eta adimendunak konbinatu dira. Kanpoko estimuluei (beroa, hezetasuna, argia, eremu magnetikoa edo pH-a) erantzuteko ezaugarriak ere badituzte, eta haien propietateak mikroingurunera egokituz (forma edo kolorea aldatu, korrante elektrikoa sortu, bioaktibo bihurtu edo aurreikusitako funtzio bat egin). 4D inprimaketa material adimendunen propietateez baliatzen da, erantzun dinamikoak izan eta konstruktua espazioan zein denboran kontrolatzeko. Era berean, 4D inprimaketak post-tratamenduak burutzeko kanpoko gailu edo metodoen beharra ezabatzen du. Beraz, 4D inprimaketak eremu medikoan eragin disruptiboa izan dezake, potentzia handia baitu terapia ez-inbasore eta urruneko kontrolako terapietan, hala nola farmakoen askapen, biosentsore edo birsortze-medikuntzan. Kontuan hartuz medikuntzan modelo bakoitza gaixo batetik bestera aldatzen dela, 4D inprimaketak medikuntza pertsonalizatu eraginkorra lortzea ahalbidetuko luke (Lui et al., 2019; Mantha et al., 2019; Piedade, 2019; Shie et al. 2019; Tamay et al., 2019).

2. kapituluu

MATERIALAK ETA METODOAK

2.1 MATERIALAK

Tenerias Omegak (Nafarroa, Espainia) hornitutako ebakin eta banaketa-deribatu hondakinetatik eratorritako behi eta txerri kolagenoa erabili ziren formulazioetako osagai nagusi bezala. Txerri eta behi kolagenoen aminoazido konposizioa **2.1 Taulan** azaltzen dira. Panreac-ek (Barcelona, Espainia) emandako glizerol purua (gradu farmazeutikoa) erabili zen plastifikatzaile gisa. Panreac-ek hornituriko azido azetiko eta ur destilatua erabili ziren laginen prestaketan.

2.1 Taula Behi eta txerri kolagenoen aminoazido konposizioa, ioi-trukearen kromatografia bidez lortua (hondarrak/1000 hondarrak bezala adierazia).

Aminoazidoa	Behi kolagenoa	Txerri kolagenoa
Azido aspartikoa	45,3	43,0
Treonina	16,1	15,3
Serina	37,0	33,7
Azido glutamikoa	72,5	71,5
Glizina	330,9	336,7
Alanina	109,7	108,2
Balina	18,7	20,4
Metionina	6,0	6,6
Isoleucina	10,3	8,2
Leucina	28,8	23,4
Tirosina	5,7	4,4
Fenilalanina	15,6	14,8
Hidroxilisina	6,7	5,8
Lisina	25,7	29,3
Histidina	4,5	3,8
Arginina	45,4	44,7
Hidroxi prolina	98,1	91,2
Prolina	122,9	129,7
<i>Imino azidoak</i>	221,0	43,0

Sigma Aldrich-ek (Madrid, Espainia) hornitutako zink oxido nanopartikulak ($\emptyset < 100$ nm, $10 - 25$ m²/g-ko gainazal espezifikoa), % 75 baino desazetilazio gradu altuagoa duten pisu molekular altuko (HMW, batch MMBC0059, 375 kDa) eta pisu molekular baxuko (LMW, batch MKBB9037, 190 kDa) kitosanoak; OPPAC-ek (Nafarroa, Espainia) hornituriko azido zitriko anhidroa (% 99,5ko purutasuna); Agora Valencia-k (Valentzia, Espainia) emandako aloe vera hautsa, Sabinsa korporazioak (East Windsor, New Jersey, AEB) emandako tetrahidrokurkumina, Ionic Liquids Technologies GmbH-ak hornituriko (Alemania) kolina dihidrogeno fosfatoa ([Ch][DHP], > % 98) eta kolina

2. MATERIALAK ETA METODOAK

serinatoa ([Ch][Seri], > % 95, % 60 H₂O-tan), Ametzaga Zuiako (Araba) Landazurieta baserriak emandako latxa ardiaren artilea eta erabili ziren formulazio gehigarri gisa.

2.2 LAMINEN PRESTAKETA

Behi kolagenoa, "Process of obtaining collagen from the skin of an animal" patentean (PCT/ES2011/070467, 2013) deskribatzen den teknologiaren bidez lortu zen. Behi azala, ontze danbor batean 80 °C-tan soluzio alkalino baten bidez 10 minutuz aurretratu zen, bigundu eta ondorengo prozesuak errazteko helburuarekin.

Jarraian, kolagenoa, glizerola eta azido zitrikoa (hautsa), aurrez 55 °C-tan beroturiko laborategiko arraboletan 15 minutuz nahastu ziren guztiz homogeneousatu arte. Ondoren, nahasteak konpresio bidez moldeatu ziren 80 °C eta 300 bar-etako baldintzapean, 1,30 mm-ko lamina errektangularrak lortuz. Lamina hauetan, % 25 glizerol (kolageno idorrarekiko masa ehunekoa) eta % 2,5; 5,0; 7,5; eta 10,0 azido zitriko (kolageno idorrarekiko masa ehunekoa) erabili ziren. Azido zitriko kantitatearen arabera, laginak CA2.5, CA5.0, CA7.5 eta CA10.0 bezala izendatu ziren, kontrol lagina azido zitrikorik gabeko nahastea izanik.

Propietateak aztertu baino lehen, film guztiak 25 °C eta % 50eko hezetasun erlatiboko ganbera klimatiko batean (ACS SU700V) gorde ziren. Filmen lodiera 0,001 mm-ko zehaztasunarekin neurtu zen, eskuz heldu daitekeen QuantuMike digimatic mikrometro baten laguntzaz (Mitutoyo Spain, Elgoibar, Espainia) eta $1,42 \pm 0,13$ mm-ko balioak lortu ziren.

2.3 FILM ETA ALDAMIOEN PRESTAKETA

2.3.1 Tratamenduak

Behi eta txerri larruazalak 1 M NaOH soluziotan tratatu ziren, 12 orduz giro tenperaturan utziz. Jarraian, fosfato buffer gatz-soluziotan (PBS, pH 7,4) neutralizatu

ziren. Lagin hauek kolageno natibo bezala definitu ziren. Ondorengo prozesaketa errazteko helburuarekin, kolageno natiboa, birrindu eta liofilizatu zen.

Ezpurutasunak kentzeko, artile zuntzak xaboia eta iturriko urarekin garbitu eta labe batean 40 orduz 30 °C-tan lehortu ziren.

2.3.2 Disoluzio metodoa

ZnO nanopartikula (NP) kantitate ezberdineko (% 0, 2, 4, 6, 8, kolageno idorrarekiko masa ehunekoa) behi kolageno filmak disoluzio metodoaren bitartez prestatu ziren. Jarraian, 0,5 M azido azetiko 100 mL soluzioan, 5 g kolageno, % 20 glizerol (kolageno idorrarekiko masa ehunekoa) eta formulazio bakoitzari dagokion ZnO nanopartikulak gehitu eta 3 orduz giro tenperaturan 150 bira minutuko abiaduran irabiatu zen. Filmak lortzeko, soluzioak petri ontzietara isuri eta 48 orduz giro tenperaturan lehortzen utzi ziren. Filmak 2ZnO, 4ZnO, 6ZnO eta 8ZnO bezala izendatu ziren ZnO NP-en kantitateen arabera. ZnO gabeko filma prestatu eta kontrol film gisa izendatu zen.

% 30 (kolageno idorrarekiko masa ehunekoa) LMW eta HMW kitosanoak disoluzio metodoaren bidez prestatu ziren. Hasteko, kitosanoa 0,5 M azido azetikotan (1:20 kolageno/azido zitriko ratioa) disolbatu zen, 30 minutuz giro tenperaturan 200 bira minutuko abiaduran irabiatuz. Ondoren, kolageno natiboa eta % 20 glizerol (kolageno idorrarekiko masa ehunekoa) gehitu eta nahastea, 3 h orduz agitazio mekanikopean eduki zen abiaduran irabiatu zen. Azkenik, petri ontzietara isuri eta giro tenperaturan lehortzen utzi ziren, filmak lortuz. Filmak, HMW eta LMW bezala kitosanoaren funtzio izendatu ziren. Kitosano gabeko filmak kontrol bezala definitu ziren.

Film guztiak 25 °C eta % 50eko hezetasun erlatiboa zuen ganbera klimatiko batean (ACS SU700V) gorde ziren, karakterizatu aurretik. Filmen lodiera 0,001 mm-ko zehaztasunarekin neurtu zen, eskuz heldu daitekeen QuantuMike digimatic mikrometro baten laguntzaz (Mitutoyo Spain, Elgoibar, Espainia). Kolageno-ZnO NP filmen kasuan

$42 \pm 16 \mu\text{m}$ -ko balioak lortu ziren eta kolageno-kitosano filmetan berriz $265 \pm 55 \mu\text{m}$ -koak.

2.3.3 Konpresio bidezko moldeaketa

Aloe vera gehituta zituzten filmak konpresio bidezko moldeaketa erabiliz prestatu ziren. Lehenik, 5 g kolageno natibo, aloe vera (% 0, 10, 20 eta 30, kolageno idorrarekiko masa ehunekoa), % 20 glizerol (kolageno idorrarekiko masa ehunekoa) eta 0,05 M azido azetiko (1:1 kolageno/azido azetiko ratioa) eskuz nahastu ziren, ehuneko guztiak kolageno idorrarekiko eta masa portzentaiaren arabekoak izanik. Lortutako nahasteak plastikozko poltsa banatan sartu eta 24 orduz giro tenperaturan mantendu ziren nahastearen hidratazioa homogeneiza zedin. Jarraian, Specac laborategi prentsaren bidez, hidrataturiko nahasteak tenperaturaren bitartez moldatu ziren. Filmak lortzeko, nahasteak bi aluminio xaflen artean kokatu eta 30 segundoz $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan mantendu ziren eta ondoren, 0,5 MPa-tako presiopean beste minutu batez filmak lortuz. Esan beharra dago tenperatura eta presio baldintza horiek aukeratu zirela, tenperatura eta presio baxuagoetan ezin izan zirelako filmik lortu. Hiru film sistema prestatu eta AV10, AV20 eta AV30 bezala izendatu ziren, aloe vera kantitatearen arabera. Aloe vera gabeko filmak prestatu eta kontrol film bezala izendatu ziren.

% 0,1 [Ch][DHP], % 0,1 [Ch][Ser] edo % 5 eta 10 artile (gehigarri guztiak kolageno idorrarekiko masa ehunekotan) duten behi kolageno filmak konpresio bidezko moldeaketaren bidez prestatu ziren. Kolageno, gehigarriak, % 20 glizerol (kolageno idorrarekiko masa ehunekotan) eta 0,5 M azido azetiko (1:2 kolageno/azido azetiko ratioa) T25 ultra-turrax (IKA, Alemania) erabiliz nahasi ziren, masa homogeneoak lortuz (2000 rpm, 2 min). Filmak lortzeko, nahasteak bi aluminio xaflen artean kokatu eta 30 segundoz $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan mantendu ziren eta ondoren, 0,5 MPa-tako presiopean beste minutu batez filmak lortuz. Azpimarra beharra dago, konpresio tenperatura analisi erreologikoen bidez determinatu zela. Filmak 5wool (% 5 artile duen lagina), 10wool (% 10 artile duen

lagina), CDHP (% 0,1 [Ch][DHP] duen lagina) eta CS (% 0,1 [Ch][Seri] duen lagina) bezala definitu ziren. IL eta artile gabeko filmak prestatu eta kontrol gisa izendatu zen.

Film guztiak 25 °C eta % 50eko hezetasun erlatiboa zuen ganbera klimatiko batean (ACS SU700V) gorde ziren, karakterizatu aurretik. Filmen lodiera 0,001 mm-ko zehaztasunarekin neurtu zen, eskuz heldu daitekeen QuantuMike digimatic mikrometro baten laguntzaz (Mitutoyo Spain, Elgoibar, Espainia) eta lortu ziren balioak 59 ± 13 μm -koak izan ziren AV dun laginetan eta 20-30 μm -koak IL-ak eta artilea duten filmetan.

2.3.4 Liofilizazioa

% 30 (kolageno idorrarekiko masa ehuneko) HMW edo LMW kitosanoa duten behi kolageno aldamiok liofilizazio metodoaren bidez prestatu ziren. Horretarako, kitosanoa 100 mL 0,5 M azido azetikotan disolbatu zen etengabeko agitaziopean. Ondoren, 5 g kolageno eta % 20 (kolageno idorrarekiko masa ehuneko) glizerol gehitu eta 3 orduz 125 bira minutuko abiadurako agitazio mekanikopean nahasi ziren. Nahasteak 12 putzuko plaketan (Costar 3513, Corning Incorporated) isuri eta 24 orduz izozkailuan eduki ondoren -23 °C-tan 48 orduan liofilizatu ziren (Alpha 1-4 LDplus, CHRIST). Azkenean, zilindro formako kitosano/kolageno aldamiok (2,26 cm-ko diametroa eta 1 cm-ko altuera) putzuetatik atera, 0,4 M NaOH soluzio batean 15 minutuz eduki eta uretan garbituz neutralizatu ziren. Horrela, kitosanoaren amino taldeak desprotonatu egin ziren, aldarapen ionikoak desagertu eta kolagenoarekiko saretze fisikoa hobetuz. Aldamio guztiak 25 °C eta % 50eko hezetasun erlatiboa zuen ganbera klimatiko batean (ACS SU700V) gorde ziren, karakterizatu aurretik.

2.3.5 3D inprimaketa

Tetrahidrokurkumina (THC) duten txerri kolagenozko aldamiok 3D inprimaketaren bidez prestatu ziren. Horretarako, kolageno natibo, THC (% 0, 2, 4, 6; kolageno idorrarekiko masa ehuneko) eta 0,5 M azido azetiko (1:5 kolageno/azido

2. MATERIALAK ETA METODOAK

azetiko ratioa) ultra-turrax T25 (IKA, Alemania) bidez nahastu ziren, pasta homogeneo bat lortu arte eta xiringatan $-4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ gorde ziren. Nahaste prozesua (2000 bira/min, 2 min) bainu hotz batean egin zen, masa berotu ez zedin. Azkenik, nahasteak $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ tenperaturan gorderiko argiarekiko babesa duten xiringatan gorde ziren erabili arte. Aldamioak THC2, THC4 eta THC6 gisa izendatu ziren, THC edukiaren arabera. THC gabeko filmak kontrol lagin gisa prestatu eta izendatu ziren.

3D inprimaketa prozesuan, Cura (Ultimake Cura 4.6.1 softwarea, Utrecht, The Netherlands) erabili zen aldamioak % 75ko betegarritasuneko (340 μm -ko poro diametroa) sare zilindriko (21 mm-ko diametroa; 0,9 mm-ko altura) bezala diseinatzeko. Kolageno aldamioak xiringa bidezko estrusio 3D DomoBIO inprimagailua (Domotek, Tolosa, Espainia) eta 35 $^{\circ}\text{C}$ -ko inprimaketa tenperaturan prestatu ziren. 3D inprimatze-abiadura 3 mm/s-koa izan zen. 3D inprimaketa-abiadura 3 mm/s-koa izan zen, 0,84 mm-ko barne-diametroa zuen G18 pita baten bidez. 3D inprimagailuaren oheko tenperatura 25 $^{\circ}\text{C}$ -tan finkatu zen, eta 0,3 mm-ko altuera izan zuen geruzak. Ez zen ondoren prozesatzeko tratamendurik egin. Aldamio guztiak 25 $^{\circ}\text{C}$ eta % 50eko hezetasun erlatiboa zuen ganbera klimatiko batean (ACS SU700V) gorde ziren, karakterizatu aurretik.

2.4 KARAKTERIZAZIO TERMIKOA

2.4.1 Analisi termograbitmetrikoa (TGA)

Laginen egonkortasun termikoa TGA/SDTA 851 termobalantza (Mettler Toledo, Espainia) erabiliz burutzen zen. 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ -ko beroketa abiadura erabiliz, 25 $^{\circ}\text{C}$ -tik 750 $^{\circ}\text{C}$ arteko azterketa dinamikoak burutu ziren, atmosfera inertepean (10 N_2 mL/min), erreakzio termo-oxidatzailea ekiditeko. Lagin bakoitzeko neurketa bikoitzak burutu ziren.

2.4.2 Ekorketa diferentzialeko kalorimetria (DSC)

DSC neurketak Mettler Toledo DSC 822 (Mettler Toledo, Espainia) batetan burutu ziren. 3 mg inguruko laginak 25 °C-tik 250 °C-ra 10 °C/min-ko beroketa abiadurarekin berotu ziren atmosferapean inertepean (10 N₂ mL/min), erreakzio oxidatzaileak ekiditeko. Aloe vera zuten laginen azterketa, -50 eta 250 °C temperatura tartean burutu zen. Horretaz gain, kontrol eta AV20 laginen zein ZnO dituzten laginen bi beroketa burutu ziren: lehen, 25 °C-tik 125 °C-tara eta gero, 25 °C-tik 250 °C-tara. Hermetikoki itxitako aluminiozko kapsulak erabiltzen ziren saiakeran zehar masa galera ekiditeko.

2.4.3 Analisi dinamiko-mekanikoa (DMA)

ZnO NP-ak zituzten filmen neurketak termo-mekanikoak DMA Explexor 100 N, Gabo Qualimeter (JM Toneu, Spain) erabiliz burutu ziren. Saiakuntzak, -100 °C-tik 250°C-rako temperatura tartean eta 2 °C/min-ko beroketa abiadurarekin burutu ziren. Neurketak tentsiopean eta 1 Hz-ko maiztasun konstantean burutu ziren, aplikatutako tentsioa % 0,05ean konponduz.

2.5 EBALUAZIO ERREOLOGIKOA

THC, IL-ak eta artilea duten kolageno nahasteen propietate biskoelastikoak Thermo Scientific Haake Rheostress1 erreometroa (Waltham, Massachusetts, AEB) erabiliz aztertu ziren. Horretarako, 35 mm diametroko plater-plater geometria eta plateren arteko 20 mm tartea erabili zen eta saiakuntza 35 °C-tan burutu zen. % 0,01 eta % 100 arteko deformazio ekorketa entsegua burutu zen, 1 Hz-ko maiztasun konstantepean, biskoelastikotasun linearraren (LVR) tartea zein LVR tarteko tentsio kritikoa ezagutzako.

Ondoren, LVR tarteko 0,01 eta 50 Hz bitartean maiztasun ekorketa entsegua burutu zen, modulu elastikoa (G'), modulu likatsua (G'') eta galera tangentea (tag δ)

2. MATERIALAK ETA METODOAK

ezagutzeko. Azkenik, zizaila abiadura proba burutu zen zunda eta gab berdina erabiliz eta 0,1 - 50 s⁻¹-ko zizaila abiadura ($\dot{\gamma}$) tartean. Laginak, proba hasi baino 5 minutu lehenago platerean kokatu ziren, estres hondarraren erlaxazioa ahalbidetu eta tenperatura egonkortzeko.

Lortutako fluxu datuak zizailaduragatik fintzen diren materialekin bat egiten duen Williamson modelora doitu zen:

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + (k \cdot \dot{\gamma})^{(1-n)}}$$

non η likatasuna, η_0 zizaila baxuko likatasun minimoa, k loditze koefizientea eta n zizailadura bidezko fintze indizea den (Williamson, 1929).

Horretaz gain, laginen fluxu diagramak kurba nagusi batean bildu ziren, non nahasteen fluxu jokaera azaltzen den. Denbora-kontzentrazio gainezarpen bat burutu zen: lehenik bertikalki mugitu zen, nahaste bakoitzaren η_0 -rekiko normalizatuz; eta ondoren, horizontalki, denbora-kontzentrazio faktore (a_c) baten bitartez espezifikatuz (Álvarez-Castillo et al., 2021). Amaitzeko, kurba nagusia Williamson modelora doitu zen:

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + (k a_c \cdot \dot{\gamma})^{(1-n)}}$$

Horretaz gain, 3D inprimaketa prozesu baldintzapeko kolageno-THC oreen fluxu portaera Weissenberg-Rabinowitsch ekuazioaren bidez neurtu daiteke:

$$\dot{\gamma}_w = \dot{\gamma}_{wN} \frac{(3n + 1)}{4n}$$

non n fluxu indizea, $\dot{\gamma}_w$ paretetako zizaila abiadura, $\dot{\gamma}_{wN} = (8V/D)$ zizaila abiadura nominal, D pita diametroa eta V fluidoaren sarrerako batez besteko abiadura diren (Chhabbra eta Richardson, 1999).

Bestalde, modulu elastiko (G') eta likatsua (G'') zein likatasun konplexua (η^*) ezagutzeko, IL-ak eta artilea duten kolageno nahasteen 35-70 °C bitarteko temperatura ekorketa 1,0 Hz-ko frekuentzia eta % 1ko maiztasunpean burutu zen.

2.6 KARAKTERIZAZIO FISIKO-KIMIKOA

2.6.1 Fourierren transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR)

Fourierren transformatuaren bidezko espektroskopia infragorria (FTIR), horizontalki kokaturiko erreflektantzia orokor motelduko (ATR) kristalez (ZnSe) hornituriko Nicolet 380 FTIR espektrofotometroaren bidez neurtu zen. Guztira, 32 ekorketa egin ziren, 4 cm^{-1} -eko erresoluzioarekin. Espektratu guztiak Savitzky-Golay funtzioaren bitartez leundu ziren. Bestalde, Origin bidezko kurben egokitze prozesurako, amida zonako bigarren deribatuaren espektroak erabili ziren gailurren posizio gida bezala, OriginPro 9.1 softwarea erabiliz.

2.6.2 Hezetasun edukia (MC) eta masa galera (ML)

Laginen MC determinatzeko, pisatu (w_0) eta liofilizatu egin ziren. Ondoren, laginak berriro pisatu (w_1) eta MC kalkulatu zen ondorengo ekuazioa erabiliz:

$$\text{MC (\%)} = \frac{w_0 - w_1}{w_0} \times 100$$

Masa galera balioak, lagin lehorrak (w_1) erabiliz kalkulatu ziren. Laginak, 5 egunez 200 mL PBS-tan murgildu ziren eta jarraian, berriro pisatu ziren (w_2). Masa galera ondorengo ekuazioa erabiliz kalkulatu zen:

$$\text{ML (\%)} = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \times 100$$

Neurketak sistema bakoitzeko 3 laginei burutu zitzairen.

2.6.3. Uraren xurgapen (WU) neurketa

Film edota aldamioren xurgatze gaitasuna aztertzeko, konposizio bakoitzeko hiru zati errektangular (1 cm x 2 cm) edo aldamiok pisatu (w_i) eta jarraian, PBS soluzioan murgildu ziren. Ondoren, denbora zehatz batzuetan laginak PBS soluziotik atera eta berriro pisatu ziren (w_t) balio konstanteak lortu arte. Uraren xurgatzeko gaitasuna ondoko ekuazioaren bitartez kalkulatu zen:

$$WU (\%) = \frac{w_t - w_i}{w_t} \times 100$$

2.7 EGITURAREN KARAKTERIZAZIOA

2.7.1 Ekorketa elektro-mikroskopia (SEM)

Ekorketazko elektro-mikroskopia S-4800 (Hitachi, Espainia) erabili zen laginen morfologia aztertzeko. Laginak, bi aldeko zinta itsasgarriaren laguntzaz metalezko oinarrian kokatu ziren eta hutsean urrez estali ziren, JEOL JFC-1100 (Izasa, Espainia) argoi atmosferan estaldura fineko langargailu ionikoa erabiliz. Lagin guztiak 10 kV-ko azelerazio tentsioa erabiliz aztertu ziren

2.7.2 X-izpien difrakzioa (XRD)

Laginen XRD analisisa, PANalytical Xpert PRO difrakzio unitatearekin burutu zen, 40 kV eta 40 mA-an funtzionatuz. Erradiazioa Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) iturri batekin sortuz zen. Difrakzio datuak 2 eta 50 °C arteko 2θ balioetan bildu dira, non θ laginaren gaineko X-izpien intzidentzia angelua den.

2.7.3 X-izpien bidezko espektroskopia fotoelektrikoa (XPS)

XPS SPECS espektrometro batean burutu zen Al K α (1486,6 eV) zuen erradiazio monokromatikoa erabiliz. Lotura-energia Ag 3d $_{5/2}$ gailurrarekin 368,28 eV-an kalibratu zen. Espektro osoa 90 °-an aztertu zen. Espektroak 1,0 eV pauso eta 40,0 eV pasatze

energiarekin neurtu ziren eta erresoluzio altuko tarteak 0,1 eV pauso eta 20,0 eV pasatze energiarekin. C 1s gailurra 284,6 eV-an erreferentzia gisa hartu zen espektroaren maila guztientzako. CasaXPS 2.3.19 PR1.0 softwarearen bidez aztertu ziren eta gailurren azalera Gaussian-Lorentzian prozeduraren bidez kuantifikatu ziren.

2.8 HESI-PROPIETATEAK

2.8.1 Ur-ukipen angelua (WCA)

Kitosanoa eta aloe vera duten filmen ur-ukipen angelu neurketak DataPhysics OCA 20 kontaktu angelu sistema erabiliz neurtu ziren. 3 µL-ko ur destilatu tantatxoa filmen gainazalean kokatu zen laginen jokaera hidrofobiko edo hidrofilikoa estimatzeko. Tantaren irudia SCA20 softwarea erabiliz atera zen.

2.8.2 Ur-lurrunaren iragazkortasuna (WVP)

ZnO NPak zituzten laginen WVP balioak, PERME™ W3/0120 (Labthink Instruments Co. Ltd., China) hezetasun kontrolatuko ingurune ganberan eta ASTM E96-00 (ASTM, 2000) araua jarraituz (ASTM, 2000) determinatu ziren. Filmak 7,40 cm-etako diametroko zirkulu forman moztu ziren eta saiakera 33 cm²-ko gainazala 38 °C-ko temperatura eta % 90eko hezetasuna jasan araziz egin zen. Ur baporearen transmisio-abiadura (WVTR) ondorengo ekuazioaren bitartez kalkulatu zen:

$$\text{WVTR} \left(\frac{\text{g}}{\text{s cm}^2} \right) = \frac{G}{t \times A}$$

non G pisu aldaketa (g) den, t denbora (s) eta A azalera (cm²). WVP balioak ondorengo ekuazioa erabiliz kalkulatu zen:

$$\text{WVP} \left(\frac{\text{g}}{\text{cm s Pa}} \right) = \frac{\text{WVTR} \times L}{\Delta P}$$

non L filmaren lodiera (cm) den eta ΔP ur baporearen presio partzialaren diferentzia (Pa) filma zeharkatzean. WVP sistema bakoitzeko hiru laginetan neurtu zen.

2.8.3. Ultramore-ikuskor (UV-vis) espektroskopia

Filmen argiarekiko hesi-propietateak, UV-Jasco espektrofotometroa (V-630 modelo) erabiliz determinatu ziren, 200 eta 800 nm bitarteko uhin luzeradun argiaren absortzioa neurtuz.

2.9 PROPIETATE MEKANIKOAK

2.9.1 Trakzio-saiakuntza

Trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB), 250 N-eko zelula kargadun Insight 10 test sistema elektromekanikoaren (MTS, Espainia) bitartez eta ASTM D 638-03 estandarra jarraituz burutu zen (ASTM, 2003). Filmak, 4,75 mm x 22,25 mm-ko txakur hezur forman moztu ziren eta azido zitrikoa duten laminak 5 mm/min-ko trakzio abiadurarekin entseatu ziren kasuan eta aloe vera, ZnO NP eta kitosanoa duten filmetak berriz, 1 mm/min-ko abiaduran. Konposizio bakoitzeko 5 lagin aztertu ziren.

2.9.2 Konpresio-saiakuntza

Kitosano/kolageno aldamioren konpresio saiakuntza 50 kg-ko zelula kargadun TA XT plusC Texture Analyzer (Stable Micro Systems) ekipoa egin ziren. Entsegua 50 mm Dia Aluminium Radiused AACC zundarekin burutu zen. Erabilitako entsegu abiadura 1 mm/s-koa izan zen eta aktibazio indarra berriz 0,05 N-ekoa. Saiakuntza guztiak giro-temperaturan burutu ziren eta laginen jatorrizko altueraren % 80raino konprimatu arte aplikatu zen. Analisisirako erabilitako softwarea Exponent 7,0, 7, 0 izan zen. Aldamio hidratatuak aztertzeke, laginak PBS soluzioan murgildu ziren, uraren xurgapen orekara iritzi arte (120 min). Aldamio hidratatu bakoitzaren konpresio saiakuntza lau aldiz burutu zen, aldamiok konprimatu ondoren hasierako tamaina berreskuratzen zutenetik.

2.10 PROPIETATE ELEKTRIKO ETA DIELEKTRIKOAK

Faraday-ren kaiolan eta giro tenperaturan, erdi-eroaleentzako ekipaturiko Keithley 4200-SCS ekipoarekin, ZnO NPak zituzten kolageno filmen propietate mekanikoak azertu ziren. Tentsio-kurbak lortzeko, bi puntu-neurketa burutu zen eskuz eraikitako gailu batekin, -20 V-tik 20 V-raino eskaneatze linealak eginez. Filmak polikarbonatozko plakei itsatsitako bi kobrezko xaflekin kontaktuan jarri ziren eta kobrezko plaketatik sortutako kobrezko bi kable ekipoaren elektrodoekin kontaktuan jarri ziren zirkuitu elektrikoa ixteko. Bi elektrodoen arteko distantzia 2 mm-koa izan zen. Laginak, 1,0 cm²-ko sekzioa eta 0,25 mm-ko altuerakoak izan ziren.

Artilea eta ILak dituzten filmen korrante zuzeneko (DC) bolumen eroankortasun elektrikoa (σ , S/cm) lortzeko, giro tenperaturan I-V kurba karakteristikoak neurtu ziren \pm 10 V arteko tentsioetan, Keithley 487 pikoametro/tentsio-iturri (Bartzelona, Espainia) bat erabiliz. Neurketak egin aurretik, laginen bi aldeak 5 mm diametroko elektrodo zirkularrekin estali ziren, eta σ honela kalkulatu zen:

$$\sigma = \frac{d}{R \cdot A}$$

non d lodiera, R laginen erresistentzia eta A elektrodo azalera den.

IL-ak eta artilea duten filmen neurketa dielektrikoak ere egin ziren, Quadtech 1920 LCR doitasun-neurgailua erabiliz. Kapazitatea eta $\tan \delta$ giro tenperaturan lortu ziren, 1kHz eta 1 MHz bitarteko maiztasun tartean, eta 0,5 V-eko tentsio aplikatuarekin. Ondoren funtzio dielektrikoaren zati erreal (ϵ') lortu zen:

$$\epsilon' = \frac{C \cdot d}{\epsilon_0 \cdot A}$$

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

2. MATERIALAK ETA METODOAK

non C kapazitantzia (F), ϵ_0 espazio librearen permitibitatea ($8,85 \times 10^{-12} \text{ F}\cdot\text{m}^{-1}$), A elektroaren azalera (m^2) eta d laginen lodiera (m) den.

Korrante alternoaren (AC) eroankortasun elektrikoa honela kalkulatu zen:

$$\sigma'(\omega) = \epsilon_0 \omega \epsilon''(\omega)$$

non ϵ_0 espazio librearen permitibitatea, $\omega = 2\pi f$ frekuentzia angeluarra, eta $\epsilon''(\omega) = \epsilon' \tan \delta$ permitibitate dielektrikoaren maiztasunaren mendeko zati irudikaria den.

2.11 BIOAKTIBOEN ASKAPENA

Kolageno aldamiok PBS soluzioan duten THC askapena zehazteko, UV-vis espektroskopia (UV-Jasco V-630 espektrofotometroa) erabili zen. Lehenik eta behin, THCrako xurgapen maximoko uhin luzera neurtu zen PBS soluzioan ($\lambda_{\text{max}} 280 \text{ nm}$), eta ondoren, kalibrazio-kurba bat ezartzeko ($y = 0,0004x + 0,0683$; $R^2 = 0,9635$) kontzentrazio tarte bateko THC soluzio estandarrak (3,906 - 1000 ppm) prestatu ziren.

THCren askapena, aldamiok 2 egunez eta giro tenperaturan PBS soluzioan (10 mL, pH 7,4) murgilduz burutu zen. Denbora tarte jakin batzuetan (4, 6, 8, 24, 30 eta 48 ordu), buffer alikuotak (3 mL) atera, buffer berriarekin ordezkatu eta 280 nm- tako UV-vis absorbantzia aztertu zen. Konposizio bakoitzeko hiru laginen azterketa burutu zen.

Korsmeyer-Peppas modeloa erabili zen THCren askapen datuak zinetiko ebaluatzeko:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

non M_t/M_∞ t denborako bioaktiboaren askapen frakzioari dagokien eta k egitura eta geometria bezalako askapen sistemaren propietateekin erlazionaturiko Korsmeyer-Peppas konstantea den. Askapen mekanismoa berriz n esponenteak azaltzen du: $n < 0,45$, difusio mekanismo pseudo-Fickianoa; $n = 0,45$, mekanismo Fickianoa; $0,45 < n <$

0,89, difusio mekanismo anomaloa; eta $n = 0,89$ difusio mekanismo ez-Fickianoa izanik (Costa eta Lobo, 2001).

2.12 IN VITRO MUKI-ATXIKIDURA SAIKUNTZA

Kolageno-THC aldamioren muki-itsaskorren propietateak zehaztu ziren, 5 kg-ko zelula-karga eta 3,5 mm-ko diametroko zilindro-zunda batez hornituriko TA.XT.Plus V testura-analizatzailea (Aname Instrumentazio zientifikoa, Espainia) erabiliz. Txerri estomagoko Type II muzina (Sigma-Aldrich, Madrid, Espainia) erabili zen substratu biologiko gisa. Proba burutu aurretik, paper iragazlea II motako muzinaren PBS soluzioan (% 1.0, masa ehunekoa) 5 minutuz eta 37 °C-tan murgildu zen.

Likido soberakina kendu eta substratua zilindro-zundan horizontalki kokatu zen. Formulazio bakoitzaren laginak ontzi zilindriko batean (15 mm-ko diametroa) kokatu zen eta goialdeko zunda zilindrikoan jarri zen. Zunda hori 1 mm/s-ko abiadura konstantepean jaitsi zen, gainazal muki-atxikigarria ukitu arte. 0,2 N-ko ukipen indarpean 30 segundo mantendu ondoren, lagina duen zunda abiadura konstantean (1 mm/s) igo zen. Texture Exponent 32 softwarea (Stable Micro Systems) erabili zen bereizte-indar maximoa (F_{max}) eta atxikitze-lana (W_{adh}) neurtzeko. Konposizio bakoitzeko neurketa guztiak gutxienez bost bider errepikatu ziren.

2.13 DEGRADAZIO AZTERKETA

Kitosano/kolageno film eta aldamioren degradazioaren azterketa burutu zen, degradazio hidrolitiko eta entzimatiakoaren bidezko masa galera neurtuz. Horretarako, laginak 8 mm-ko diametroko diskotan moztu eta pisatu (w_0) ziren. Jarraian, aldamiok % 70 etanoletan 30 minutuz garbitu eta beste 30 minutuz UV izpiekin irradiatuz esterilizatu ziren. Behin prestaketak buruturik, laginak 37 °C-tan eta bi degradazio agentedun ingurunetan inkubatu ziren. Denbora zehatz batzuetan, filmak liofilizatu eta berriro pisatu

2. MATERIALAK ETA METODOAK

(w_t) ziren. Aldamioen kasuan, neurketa bakarrik burutu zen, 4 egun pasa ondoren. Degradazio gradua (DD), ondorengo ekuazioaren bitartez kalkulatu zen:

$$DD (\%) = \frac{w_0 - w_t}{w_0} \times 100$$

Degradazio hidrolitikoa (HDD), laginak 500 μ L PBS soluzioan murgilduz egin zen. Kolagenoaren degradazio enzimatiakoaren (EDD) kasuan berriz, kolagenasa D (Roche, Basel, Switzerland) 1 mg/mL aldamiotan eta 0,5 mg/mL filmetan, eta kultibo-inguruneaz osaturiko 500 μ L soluzio erabili zen.

Aloe vera duten kolageno filmen degradazio azterketa ere burutu zen. Horretarako, degradazio hidrolitikoa, zelula bidezko degradazioa eta “gorputz jariakinen simulatu” bidezko degradazioaren bidezko pisu galera determinatu ziren. Hau horrela, laginak (8 mm-ko diametroa) hiru degradazio agenteren aurrean jarri eta 37 °C-tan inkubatu ziren. Denbora zehatz batzuetan, laginak atera, liofilizatu eta berriro pisatu ziren. Degradazio hidrolitikoa (HDD) laginak PBS-etan sartuz egiten zen. Zelula-degradaziorako (CDD), aldamioko 30.000 HS27 fibroblastozko zelula erein ziren. “Gorputz-jariakin simulatua” bidezko degradazioan (BFDD) berriz, gorputz jariakin estimulatzailea (FBS) gehitu zen putzuetan. Konposizio bakoitzeko bost neurketa egin ziren.

2.14 ZITOTOXIKOTASUN AZTERKETA

Kitosano/kolageno filmen zitotoxikotasun azterketa, filmak L-929 fibroblastoekin (ATCC® 30-2003™) kontaktuan jarriz burutu zen, gailu medikoen ebaluazio biologikorako ISO 10993-5:2009 gida (ISO 10993-5, 2009) jarraituz. Labur-labur, 24 putzuko plaka batean 35.000 zelula/putzu medio osoko EMEM 500 μ L-tan erein ziren eta 24 orduz 37 °C-tan inkubatu ziren. Gero, kultibo-ingurunea xurgatu, 600 μ L ingurune berria jarri eta 8 mm diametroko filmak putzuen behealdean ereindako fibroblastoekin kontaktuan jarri ziren. 48 orduz inkubatzen eduki ondoren, filmak kendu eta kultibo

ingurunea, CCK-8 (Sigma-Aldrich, Espainia) soluzioaren (1:11) 370 µL/putzu-rekin ordezkatu zen. Beste 4 orduz inkubatu ondoren, absorbantzia plaka-irakurgailu batekin irakurri zen (Infinite® 200 PRO seriea, Tecan Trading AG, Männedorf, Suitza) 450 nm-tan, 650 nm erabiliz erreferentziazko uhin-luzera gisa. Film gabeko zelula-kultiboa erabili zen % 100eko bideragarritasun-oinarri bezala (zuria).

2.15 BIOBATERAGARRITASUN AZTERKETA

Aloe vera duen filmen biobateragarritasun azterketa burutu zen. Horretarako, 24 putzuko plaka batean, ingurune osoko 200 µL-tan 10.000 zelula/cm² erein ziren. 37 °C eta % 5eko CO₂ atmosferan 24 orduz eduki ondoren, film laginak zelulekin kontaktuan jarri ziren. ISO 10993-5:2009 estandarra jarraituz, zelulek materialarekiko kontaktu zuzenean eta zeharkako kontaktuan egotearen artean bereizketa bat egin zen, laginak zuzenean zelulen gainean edota “transwells” plakaren gainean jarritz, hurrenez hurren. Azterketa burutu aurretik, aldordioak % 70 etanoletan 10 minutuz murgildu, UV-izpiekin 30 minutuz irradiatu eta 72 orduz PBS soluzioan dialisiaren bidez garbituz esterilizatu ziren. Horretaz gain, putzu batzuk laginik gabe utzi ziren, ondoren kontrol positibo eta negatibotzat hartzeko. Putzu guztiak 300 µL-ko kultibo ingurunearekin osatu ziren. Saiakuntza hauek HS27 zelulen kontrol eta AV20 filmen biobateragarritasuna ebaluatzeko egin ziren.

Batetik, zelula-hilkortasuna mintz plasmaticoaren osotasunaren arabera ebaluatu zen. Horretarako, Cell-Tox (Promega #G8742) zitotoxikotasun saiakuntza berdea erabili zen. Horretarako, fabrikatzaileak gomendatutako protokoloa jarraitu zen. Labur-labur, tindagaia putzuetan gehitu zen, ingurunean 1:1000 proportzioan diluituz eta 15 minutuz argitik babestuta inkubatu zen. Ondoren, fluoreszentsia neurtu zen.

Bestalde, zelulen erredukzio-ahalmenaren arabera jardura metabolikoa neurtu zen. Kasu horretan, Cell Count Kit-8 (Merck #96992) saiakuntza kolorimetrikoa erabili zen. Fabrikatzailearen gomendioak jarraituz, eta aurreko saiakuntzako

2. MATERIALAK ETA METODOAK

produktuak kentzeko PBS soluzioa erabiliz zenbait garbiketa egin ondoren, konposatua gehitu eta absorbantzia neurtu zen 2 orduko inkubazioaren ondoren.

Azterketa-baldintzez gain, kontrol positiboak eta negatiboak ere egin ziren. Lehenengoetarako (CTR+), zelulak baldintzan berdinetan eta biomaterialik gabe erein ziren. Kontrol negatiboetarako (CTR-), Promegaren kitak emandako lisi-tanpoiarekin tratatutako zelulak erabili ziren heriotza zelularra eragiteko. 1., 2., 4. eta 7. esposizio-egunetan egin ziren saiakuntzak eta baldintza bakoitzean azterketa hirukoitza burutu zen. Emaitzak lortu ondoren, kontrolekiko erlatibizatu ziren. Heriotza-tasaren kasuan, CTR- hilkortasunaren % 100 izan zen eta CTR+ berriz, % 0. Jarduera metabolikoaren saiakuntzan, alderantziz hartu ziren kontuan.

2.16 ZELULEN KULTIBOA

Aloe vera duten filmen zelula-kultiboa aztertu zen. Gailu medikoen ebaluazio biologikorako ISO 10993-5:2009 arauetako gomendioei jarraituz, HS27 (ECACC) zelulak, % 10 (b/b) FBS inaktiboa (Sigma), % 1 (b/b) penizilina-estreptomizina (Lonza) eta % 1 (b/b) L-glutaminarekin (Gibco) osaturiko Dulbeccok aldatutako Eaglelen ingurunean (Sigma) hezetutako inkubatzailer batean (37 °C; % 5 CO₂ atmosfera) kultibatu ziren. Saiakuntza biologiko guztiak baldintza aseptikoan egin ziren eta astero zelulapasarteak egin ziren, zelulen elkargunearen arabera. Bosgarren pasartean HS27 zelulak % 0,05 tripsinarekin (Sigma, Darmstadt, Alemania) bildu, eta giro-temperaturan zentrifugatu (1.500 bira/min; 5 min) ziren. Degradazio- eta biobateragarritasun-azterketen plaka esperimentalak egin ondoren, lortutako prezipitatua lehenago deskribatutako inguruan sartu zen, zelula-esekidura homogeen bat lortzeko.

2.17 INGURUMEN AZTERKETA

Kitosano/kolageno aldamioen ingurumen-azterketa ISO 14.040 arauaren jarraibide eta gomendioen arabera egin zen. Erabilitako softwarea Mea Pro 9.0.0.30 izan

zen (PRé Consultants, Herbehereak). Inbentarioaren azterketa egiteko, laborategian erabilitako materialak eta aurretratatamenduetan eta prestakuntza-urratsetan erabilitako energia-kontsumoa hartu ziren kontuan, baita behi-larruen garraioa ere (Bergara-Donostia), Ecoinvent datu-baseko datuak erabiliz. Azterlan honetan kontuan hartu zein unitate funtzionala 5 g kolageno izan zen. Inbentarioko datuetan oinarrituta, ingurumen-inpaktuak ReCiPe 2016 erdi-puntuaren bertsio hierarkikoaren arabera ebaluatu ziren. Aztertutako inpaktu-kategoriak hauek izan ziren: berotze globala, estratosferako ozonoaren agortzea, erradiazio ionizatzailea, ozono-sorrera (giza osasuna), materia partikulatu finen eratzea, ozonoa sortzea (lurreko ekosistemak), lurraren azidotzea, ur gezaren eutrofizazioa, itsasoko eutrofizazioa, lurreko ekotoxikotasuna, ur gezaren ekotoxikotasuna, itsasoko ekotoxikotasuna, giza toxikotasun kartzinogenikoa, gizakien toxikotasun ez-kantzerigenoa, lurraren erabilera, baliabide mineralen urritasuna, baliabide fosilen urritasuna eta uraren kontsumoa.

2.18 ANALISI ESTATISTIKOA

Bariantza analisisa (ANOVA) erabili zen laginen arteko diferentzien garrantzia zehazteko. Azterketa SPSS ordenagailu programaren (SPSS Statistic 23,0) laguntzaz egin zen, konparaketa anitzak egiteko Tukey-ren testa erabiliz. Entsegu guztiak gutxienez hiru aldiz burutu ziren. Diferentziak estatistikoki esanguratsuak ziren $P < 0,05$ mailan.

3. kapitulua

AZIDO ZITRIKODUN KOLAGENO LAMINAK

Azido zitrikoak konpresio bidez moldeaturiko kolageno laginetan
duen eragina

3.1 LABURPENA

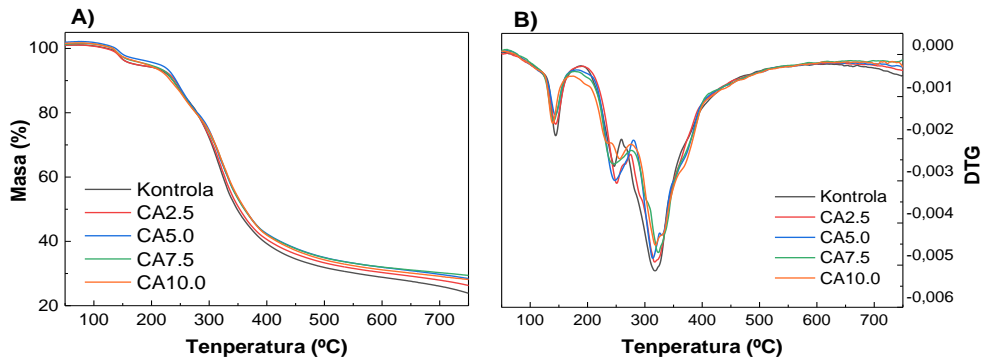
Lan honetan, behi kolagena, azido zitriko kantitate ezberdinekin tratatu eta konpresio bidez prestatutako laminen propietate funtzionalak ikertu ziren. FTIR analisi eta saiakuntza mekanikoek, kolagena natiboaren helize hirukoitzeko egituraren presentzia zeharkako modu batean adierazi zuten. FTIR emaitzetan ikus daitezkeen bezala, azido zitrikoak, kolagenaarekin lotura kobalenteen bidez erreakzionatu ez arren, kolagenaaren egitura egonkortsu hidrogeno zubien bitartez. Interakzio hauek propietate mekanikoak, hala nola, trakzio-erresistentzia eta haustura-elongazioa hobetu zituzten. Horretaz gain, azido zitrikoa gehitzean, ur-xurgapen gaitasuna handitu zen, SEM emaitzen bidez kolagenaaren barne-egituran ikusi ziren zenbait mikro-zuloen ondorioz.

3.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

3.2.1 Propietate termikoak

Azido zitriko eduki ezberdinetako kolagenaaren portaera termikoa aztertzeko helburuarekin, TGA burutu zen eta TGA eta DTG kurbak **3.1 Irudian** azaltzen dira. Nahaste guztiek antzeko portaera erakutsi zuten, hiru etapa nagusitan bereizirik. 150 °C azpiko temperatura, absorbatu-erresistentzia galerari dagokio, masa galera % 5 ingurukoa izan zelarik. Bigarren etapa, 240-250 °C-tan, glizerolaren lurrunketa (Leceta et al., 2015) eta azido zitrikoaren deskonposizioari (Guerrero et al., 2019) dagokio. Etapa honen temperatura maximoa, glizerol puruaren irakite temperatura (182 °C) eta azido zitrikoaren deskonposizio temperatura (175 °C) baino altuagoa izan zen; beraz, temperatura igoera honek, nahasteko osagaien arteko hidrogeno zubiak bezalako interakzioen existentzia iradoki zuen. Hirugarren etapa, 250 °C-tik gora, kolagenaaren degradazioari dagokio, behi kolagenaaren deskonposizioa 250-400 °C-ko temperatura tartean identifikatu zuten beste autore batzuekin bat eginez (Labastida-Pólito et al., 2009). Konkrétuki, 283 °C-ko balioa ikusi zen behi kolagena puruan eta 330 °C-ra igo zen kolagena konposatuetan, kolagena eta partikula inorganikoen arteko interakzioen

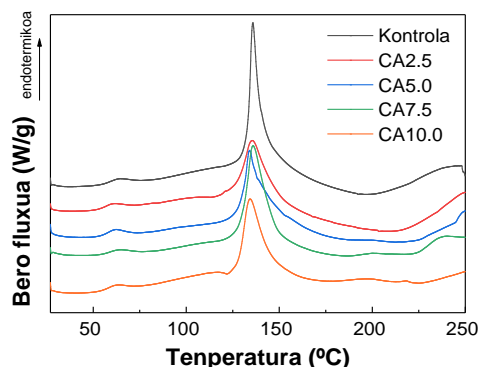
ondorioz (Wei et al., 2015). Lan honetan antzeko aurkikuntza ikusi zen, kolagenoaren degradazio termikoa 315 °C gainera gertatu baitzen, kolagenoa eta formulazioan inkorporaturiko gehigarrien arteko interakzioen presentzia adieraziz.



3.1 Irudia. Azido zitriko (AC) eduki ezberdinetako kolageno laminen a) TGA eta b) DTG termogramak.

DSC neurketeki dagokienez, lagin guztiek bi gailur endotermiko aurkeztu zuten,

3.2 Irudian ikus daitekeen bezala. 65-70 °C temperatura tarteko maximoa, ur aske edo lotura uraren askapena adierazi zuen. Zuntzeken barne urarekin erlazionatuta dagoen temperatura tarte hau, zuntz natiboetan ikusitako balioekin bat egiten du, eta azido zitrikoa gehitzean temperatura balio konstante mantendu zen, kolageno zuntzek ez zutela aldaketarik jasan adieraziz (Miles et al., 2005). Desnaturalizazio temperatura berriz, 125 °C gaineko gailur endotermikoarekin erlazionatzen da (Chakrapani et al., 2012). Aipatu beharra dago, azido zitrikoaren edukia gehitzean gailur honen altuera txikitu eta zabalera handitu egin zela, kolageno eta azido zitrikoaren arteko interakzioen presentzia adieraziz.

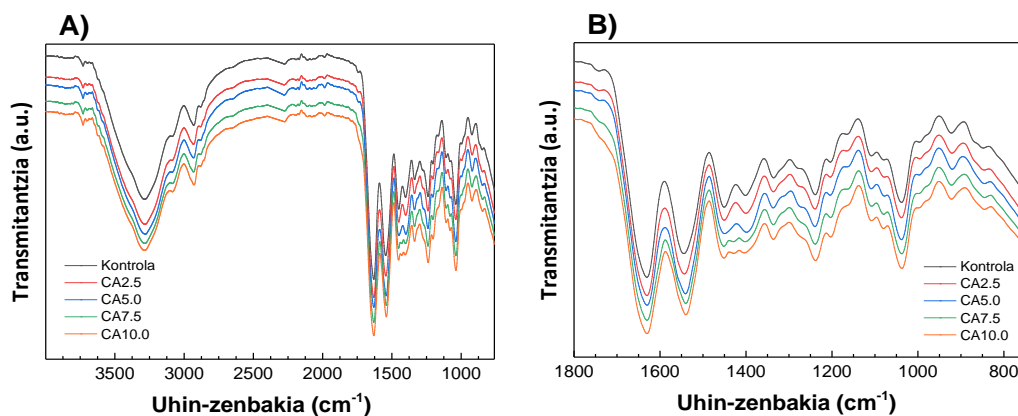


3.2 Irudia. Azido zitriko (CA) eduki ezberdineko kolageno laminen DSC termogramak.

3.2.2 Propietate fisiko-kimikoak

Osagaien arteko interakzioak determinatzeko, FTIR analisisia burutu zen eta FTIR espektroak **3.3 Irudian** adierazi dira. Espektro guztiek, kolagenoaren lotura peptidikoari dagokien absortzio banda karakteristikoak erakutsi zituzten. Konkretuki, A amida, amida I, amida II eta amida III normalean, 3400-3440, 1600-1700, 1540 eta 1239 cm^{-1} -ko uhin luzeratan aurkitzen dira, urrenez urren (Barth eta Zscherp, 2002; Riaz et al., 2018; Yu et al., 2014). Lagin hauen Amida A banda, N-H-ren luzatze bibrazioari dagokio eta 3287 cm^{-1} -tan aurkitu zen, uhin-luzera baxuagoetara mugitu zelarik. Kolagenoaren N-H taldeak hidrogeno zubien bitartez lotzen direnean, bandaren posizioa frekuentzia baxuagoetara mugitzen da, kolagenoaren helize hirukoitzeko egituraren egonkortasuna areagotuz (Duan et al., 2009; Li et al., 2004; Liao et al., 2018). Bestalde, azido zitrikoa gehitzean, banda 3277 cm^{-1} -tara mugitu zen (**3.3A Irudia**), kolagenoak glizerola eta azido zitrikoarekin eratutako hidrogeno zubiak berretsiz.

Amida I bandari dagokionez, proteinaren ardatzean zehar aurkitu den C=O taldearen luzatze bibrazioarekin erlazionatzen da, 1600-1700 cm^{-1} tartean (**3.3B Irudia**) absortzio sendoa azaltzen duelarik. Banda honen absortzioa 1630 cm^{-1} -tan neurtu zen, azido zitrikoaren edukia edozein zelarik (**3.1 Taula**). Azido zitrikoa inkorporatzean bere posizioa zein intentsitatea ez ziren aldatu eta beraz, emaitza hauek kolageno natiboaren helize hirukoitzeko egitura altuki ordenatua mantendu egin zela adierazten du (Campos, Vidal eta Mello, 2011), amida I bandaren intentsitatea proteina kateen konformazioaren menpekoa baita (Bryan et al., 2007). Analisi kuantitatibo bat burutzeko, amida I (ν_{I}) eta amida II (ν_{II}) banden arteko uhin luzera diferentzia kalkulatu zen eta datuak **3.1 Taulan** laburtu dira. Ikus daitekeen bezala, balioak 100 cm^{-1} baino baxuagoak dira, helize hirukoitzeko egitura mantendu zela berretsiz (Sizeland et al., 2018).



3.1 Irudia. Azido zitriko (CA) eduki ezberdinetako kolageno laminen FTIR espektoak A) 4000 cm^{-1} -tik 800 cm^{-1} -ra eta B) 1800 cm^{-1} -tik 800 cm^{-1} -ra.

Amida bandaren intentsitate aldaketa txiki hauek, erretikulazio fisikoen presentzia adierazi zuten, erretikulazio kimikoak aldaketa nabariagoak gauzatuko bailituzke, aurreko lanetan aurkeztu ziren bezala (Uranga et al., 2016; Wu et al., 2017). Horretaz gain, CH_2 taldearen flexio bibrazioari dagokion 1450 cm^{-1} -tako banda (Chakrapani et al., 2012; Plepis, Goissis eta Das-Gupta, 1996) eta $\text{C}=\text{O}$ taldearen luzatze bibrazioari dagokion 1400 cm^{-1} -tako bandaren arteko intentsitate erlatiboa aldatu egin zen (Wu et al., 2017). Honek, kolagenoaren egituran zehar hidrogeno zubiak zeudela berrets dezake. Konkretuki, CA2.5 eta CA5.0 laginen bi banda horien arteko intentsitate erlatibo diferentzia txikiagotu egin zen. Horretaz gain, CA7.5 eta CA10.0 laginetan bi banda horien artean hirugarren banda bat agertu zen, azido zitrikoak kolagenoarekin interakzio fisikoak sortu zituela adieraziz.

3.1 Taula. Amida I (ν_{I}) eta amida II (ν_{II}) banden uhin luzerak, zein bihen arteko uhin luzera diferentzia ($\nu_{\text{I}} - \nu_{\text{II}}$).

Laginak	ν_{I}	ν_{II}	$\nu_{\text{I}} - \nu_{\text{II}}$
Kontrola	1630,42	1544,26	86,16
CA2.5	1630,27	1543,12	87,15
CA5.0	1630,08	1540,89	89,19
CA7.5	1630,15	1540,17	89,98
CA10.0	1630,15	1539,92	90,23

Proteinen arteko interakzioek konformazio aldaketak eragiten dituztenez, amida I profil-analisiaren bidez kolagenoaren egitura sekundarioa aztertu zen. Amida I bandak hiru osagai nagusik osatzen dute: α -helizea/hausazko bobina konformazioari dagokion 1650 cm^{-1} -tako banda, β -xafla dagokion $1615\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ -tako banda eta β -bira dagokion $1660\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ -tako banda (Etxabide et al., 2016; Guerrero, Kerry eta de la Caba, 2014; Wu et al., 2017). **2.2 Taulan** ikusten den bezala, formulazioan azido zitrikoa gehitzean, α -helize/ β -xafla ratioa handitu egin zen. Hori dela eta, azido zitrikoaren inkorporazioak α -helizearen konformazioaren edukia handitu zuen, kolagenoa eta azido zitrikoaren arteko erretikulazio fisikoen eraginez proteinaren egitura aldatuz, amida banda intentsitatearen bidez ikusitako aldaketa txikikien bitartez ikusi zen bezala.

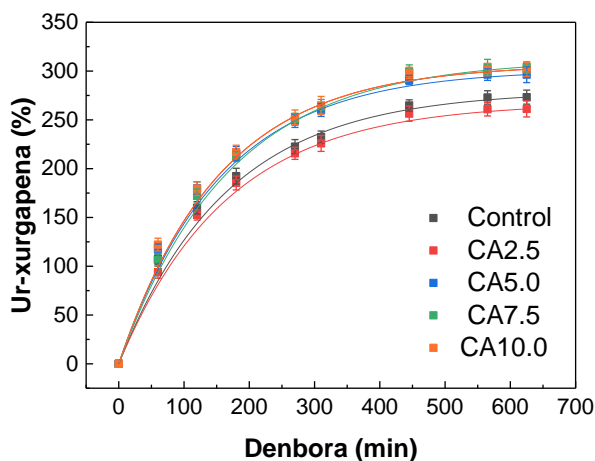
2.2 Taula. Azido zitriko edukiaren arabeko amida I bandaren kurba egokitzapenaren azalera (%) eta α -helize/ β -xafla ratioa.

Laginak	β -xafla (%)	α -helizea/aisazko bobina (%)	β -bira (%)	α -helizea/ β -xafla ratio
Kontrola	35,6	49,3	15,1	0,97
CA2.5	36,9	52,8	10,3	1,12
CA5.0	37,6	53,1	9,3	1,13
CA7.5	38,0	54,9	7,1	1,22
CA10.0	38,1	55,0	6,9	1,22

Horretaz gain, ur xurgapen azterketa burutu zen eta emaitzak **3.4 Irudian** adierazi dira. Esan beharra dago, laginek bere egitura osotasuna mantendu zutela 600 minututan murgilduta egon ondoren. Lehenengo 60 minututan, ur-xurgapena azkar igo zen % 100 gainera; horren ondoren, ur xurgapen erratioa txikitu zen 500 min-arte eta hemendik aurrera, ur xurgapen balioak konstante mantendu ziren, % 300 baino balio baxuagoetan. Ur xurgapenak oreka balioetara aldi berean iritsi ziren, azido zitriko edukia edozein delarik, baina CA5.0 eta CA10.0 laginen ur xurgapen balioak, kontrol eta CA2.5 laginen balioak baino pixka bat altuagoak izanik.

Jokaera hauek, kolageno eta azido zitrikoaren arteko interakzio fisikoen existentzia iradoki zuten FTIR emaitzekin bat egiten dute, erretikulazio kimikoak ur

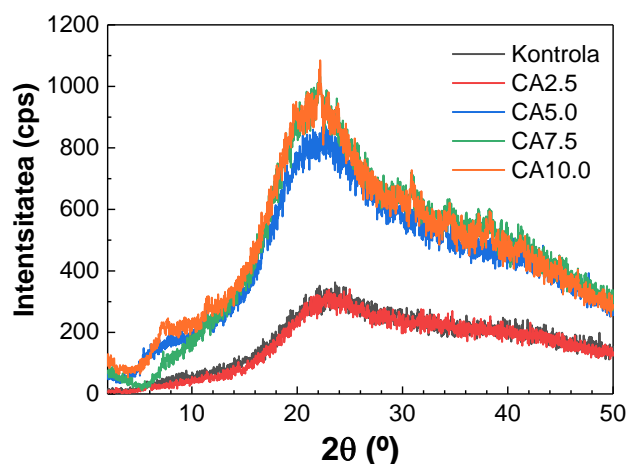
xurgapen balioen jaitiera gauzatuko bailuke. Uraren xurgapen gaitasuna materialaren araberakoa denez, hots, xaflen azido zitriko edukiaren funtzio gisa, laminen morfologia aztertu eta dagozkien propietate fisiko-kimikoekin erlazionatu zen.



3.4 Irudia. Azido zitriko (CA) eduki ezberdinetako kolageno laminen ur xurgapena.

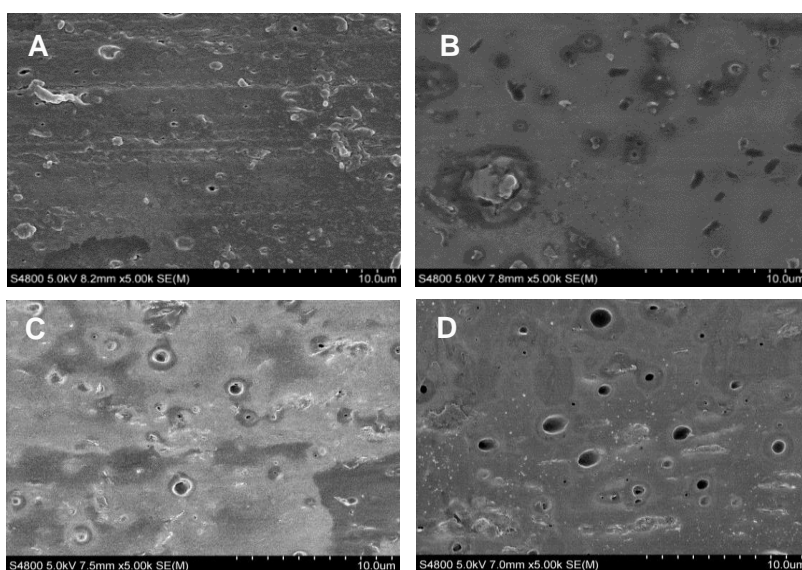
3.2.3. Propietate morfologiko eta mekanikoak

Laminen mikroegitura determinatu eta neurtutako propietateekin erlazionatzeko, XRD eta SEM analisiak burutu ziren. XRD analisiari dagokionez, 7^o inguruko gailur txikia kolageno kateen arteko paketatze lateralaren distantzia intermolekularrari zegokion, beraz maximo honen presentzia ezak, **3.5 Irudian** ikus daitekeen bezala, kateen arteko espazioaren handitze bezala kontsideratu zen, Valeria et al. (2019) lanean adierazi bezala. Egitate horrek, kolagenoak pairatutako tratamenduek, bere zuntz egitura txikiagotu zuela adierazi zuen. Gainera, **3.5 Irudian** ikusten den 20^o-ko banda zabala, kolageno zuntzen sakabanaketa hedatuari dagokio (Zou et al., 2017), eta kolagenoaren egitura amorfoa adierazten du. Kontrol eta CA2.5 xaflak, antzeko XRD patrioiak erakutsi zituzten, FTIR eta ur-xurgapen analisisien bitartez ikusi zen antzeko propietate fisiko-kimikoekin bat eginez. Horrela, kolagenoaren egituraren aldaketak eragiteko % 2,5eko azido zitriko edukia ez dela nahikoa ondorioztatu zen. Hala ere, azido zitriko eduki altuagoek xaflen egitura ordena handitu zuten.



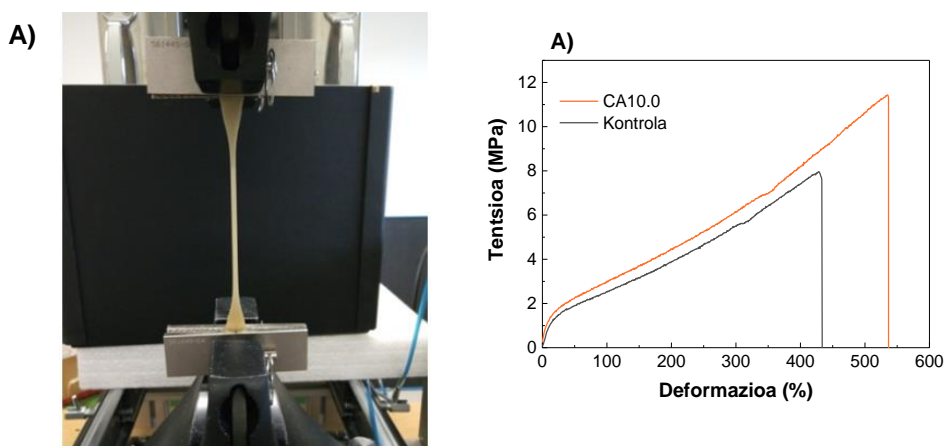
3.5 Irudia. Azido zitriko (CA) eduki ezberdinetako kolageno laminen XRD patrioiak.

Azido zitrikoak kolageno egitura duen efektua aztertzeko helburuarekin, SEM analisia burutu zen eta zeharkako sekzioaren mikrografiak **3.6 Irudian** azaldu dira. SEM mikrografiek, kontrol eta CA2.5 laminek egitura antzekoa zutela azaldu zuten, XRD eta analisi fisiko-kimikoaren bat eginez; bi xaflek egitura ximurtsua erakutsi zuten. Azido zitriko edukia % 5,0tik (**3.6C Irudia**) 20,0ra (**3.6D Irudia**) igotzean, zulo batzuk azaldu ziren eta zulo kopurua azido zitriko edukia igotzean handitu zen, ura edukitzeko gaitasun altuagoak ahalbidetuz eta beraz, ur-xurgapen azterketan ikusi den ur-xurgapen ahalmen handiagoak ahalbidetuz.



3.6 Irudia. Zeharkako azaleraren SEM irudiak A) kontrola, B) CA2.5, C) CA5.0, and D) CA10.0.

Azido zitrikodun kolageno xaflen egitura, propietate mekanikoekin ere erlaziona daiteke. Esan beharra dago xafla guztiak moldea errazak eta mekanikoki erresistenteak zirela, **3.7A Irudian** ikus daaitekeen bezala. Jokaera hau, kolagenoaren zuntz egiturarekin dago erlazionatua (Sherman et al., 2015). Trakzio-tentsioa aplikatu ahala, kolageno zuntzak trakzio-norabide horretan orientatzen joan ziren, haustura puntura arteko trakzio-erresistentzia handituz, **3.7B Irudian** ikus daitekeen bezala.



3.7 Irudia. A) Kontrol eta CA10.0 laminen tentsio-deformazio kurba eta B) entsio testa

Trakzio-erresistentzia eta haustura-elongazio balioak **3.3 Taulan** azaldu dira. Trakzio-erresistentzia nabarmen ($P < 0,05$) handitu zen azido zitrikoa gehitzean, edozein dela azido zitrikoaren edukia ($P > 0,05$), FTIR analisiaren bitartez ikusi ziren kolageno eta azido zitrikoaren arteko interakzioen eraginez. Horretaz gain, haustura-elongazioa nabarmen ($P < 0,05$) handitu zen azido zitrikoren edukiarekin batera. Formulazio guztietako glizerol edukia berdina izanenez, azido zitrikodun filmen luzapen balioen handitzea, azido zitriko askearen plastifikatzaile rolari egotzi zitzaien. Azido zitrikoren erretikulatzaile eta plastifikatzaile rol bikoitza literaturan aurki daiteke (Shi et al., 2008; Yoon, Chough eta Park, 2007). Hidroxilo talde bat eta hiru karboxilo taldeez osatua dagoen azido zitrikoa zuten xaflen ur-xurgapen ahalmen handia dela eta, kateen mugikortasuna handituz eta beraz, filmaren malgutasuna, ur molekulen eragina ere izan zitekeen.

3.3 Taula. Azido zitriko eduki ezberdinetako kolageno laminen trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB).

Laginak	TS (MPa)	EB (%)
Kontrola	8,0 ± 0,7 ^a	414 ± 17 ^a
CA2.5	11,7 ± 0,9 ^b	434 ± 18 ^{a,b}
CA5.0	12,3 ± 0,7 ^b	459 ± 19 ^b
CA7.5	12,4 ± 1,1 ^b	510 ± 25 ^c
CA10.0	10,7 ± 1,0 ^b	568 ± 7 ^d

^{a-d}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera. $N = 5$ erreproduzio kopuru minimoa.

Literaturan publikatuak izan diren lanetako, kolagenoaren tratamendu, prozesatze metodo eta baldintzek, zein laginen lodierak, kolageno xaflen trakzio-erresistentzia eta haustura-elongazioa balioen konparaketa zailtzen du. Azkenetariko lan baten, behien azaleko fibroblastoetatik lortutako kolageno xafletan (0,057-0,127 mm-ko lodiera), 8,7 eta 28,4 MPa tarteko TS eta % 0,1 eta 13,6 bitarteko EB balioak lortu ziren (Jakab et al., 2019). Beste lan batean, zilar nanopartikulak zituzten mineralizatutako filmak mekanikoki aztertu ziren eta 15 MPa-ko TS eta % 8,9ko EB balioak lortu ziren (Socrates et al., 2019). Aipatu beharra dago, 1 mm-ko lodierako larruaren TS eta EB balio minimoak 10 MPa eta % 30-80koak zirela (Jakab et al., 2019), lan honetan lortu ziren balio antzekoak, alegia.

3.3 ONDORIOAK

Kolageno laminak konpresio bidezko moldeaketaren bidez prestatu ziren, prozesaketa errazteko azido zitrikoarekin aurretratu ondoren. Lortutako xaflen analisi termikoez, kolageno eta azido zitrikoaren arteko interakzioak iradoki eta FTIR emaitzek konfirmatu zuten. Amida banden garrantzizko aldaka ezak, kolageno eta azido zitrikoaren artean erretikulazio kimikorik ez zela izan adierazi arren, FTIR banden intentsitate erlatiboek, erretikulazio fisikoaren presentzia frogatzen dute. Hala ere, amida I banden arteko uhin luzera diferentzia 100 cm^{-1} baino txikiagoa izanik, kolagenoaren

helize hirukoitzeko egitura mantendu zela suposa daiteke. Amida tartearen analisi sakonagoak, azido zitrikoa inkorporatzean kolagenoaren helize egituraren nagusitasuna mantendu zela adierazi zuen. Azido zitrikoak, kolageno xaflen propietate mekanikoak hobetu zituen eta emaitza hauek, azido zitriko eta konpresio bidezko moldeaketak kolagenoaren zuntz egituran ez zuela eragin adierazi zuten. Horretaz gain, kolagenoaren mikroegituran aurkituriko zuloek xaflen ur xurgatze gaitasuna handitu zuten, xafla horiek ontzi aktiboen edo farmakoen askapen sistemetakako baliagarriak izan zitezkeelarik.

4. kapitulua

ALOE VERADUN KOLAGENO FILMAK

Aplikazio biomedikoetarako potentziala duten konpresio bidez
moldeaturiko aloe vera/kolageno filmak

4.1. LABURPENA

Kolagena zerri-azalei aurretratu mekanikoak burutuz lortu zen, kolagena natiboaren helize hirukoitzeko egitura mantentzeko helburuarekin. Ekorketa DSC eta FTIR egitura hau mantendu zela zeharki berretsi zen. Gainera, kolagena oinarrituriko film-formulazioetan berezko propietate biologikoak dituen aloe vera (AV) gehitu, filmak konpresio bidezko moldeaketaren bidez filmak prestatu eta aplikazio biomedikoetarako duten potentziala aztertzeko karakterizatu ziren. SEM irudiek, AV gehitzean, kolagena zuntz egitura, zimurtsuago batera aldatu zela erakutsi zuten, XRD analisiaren bidez kolagena kateen paketatze lateralaren jaitzierarekin bat eginez. Emaitza horiek, kolagena eta AV-ren arteko interakzioak iradoki zituzten, FTIR espektroetan ikusi bezala. Kontuan izanik % 20tik gorako AV edukia ez zuela interakzio berririk sortzen, formulazio hori erabili zen saiakuntza biologikoak burutzeko, garaturiko AV/kolagena pelikulek aplikazio biomedikoetarako zuten egokitasuna berresteko.

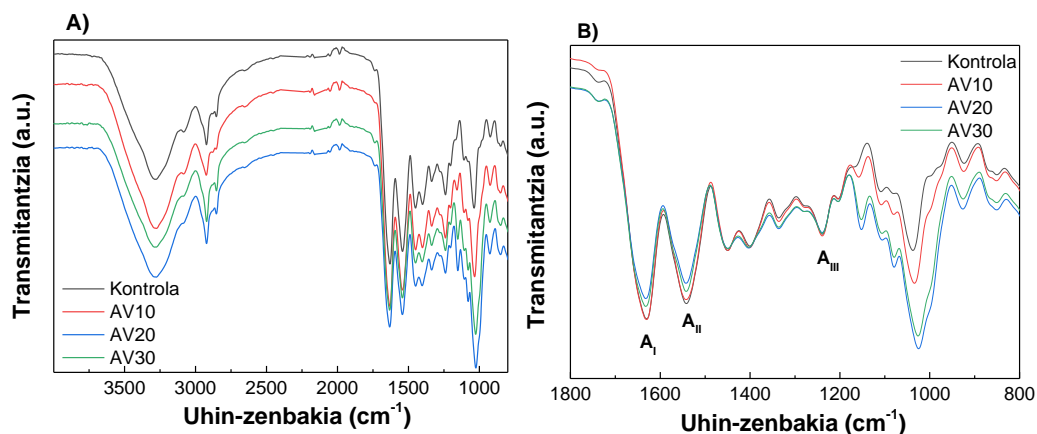
4.2. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

4.2.1 Propietate fisiko-kimikoak

Film formulazioko osagaien arteko interakzioak ezagutzeko helburuarekin FTIR analisia burutu eta lorturiko espektroak **4.1 Irudian** aurkezten dira. 3600-3000 cm^{-1} inguruko banda zabala (**4.1A Irudia**) azido uroniko, manosa eta azido galaktouronikoen hidroxilo taldeen luzatzeari egotzi zitzaion, bai aloe veran aurki daitezkeen antrakina talde fenolikoei zein kolagena amida A (N-H luzatzea) taldeari ere (Bajer, Janczak eta Bajer, 2020; Kapashi et al., 2019). Gainera, espektro guztiek kolagena lotura peptidikoei esleitutako banda bereizgarriak erakutsi zituzten (**4.1B Irudia**): 1630 cm^{-1} -tan amida I (C=O luzatzea), 1542 cm^{-1} -tan amida II (N-H flexioa) eta 1240 cm^{-1} -tan amida III (C-N luzatzea). 1630 cm^{-1} inguruko banda aloe verako karbonilo taldeen luzatze bibrazioei ere esleitzen zekiekeen (Bajer, Janczak eta Bajer, 2020) eta 1245 cm^{-1} -tan aurkitu zen sorbalda, azetilo taldeen C-O-C luzatzearen ondorioa izan liteke; horrek biltegitratze

4. ALOE VERA DUTEN KOLAGENO FILMAK

polisakarido bioaktiboen presentzia adieraziko zuen, hala nola azemanan eta glukamanan. 1200 cm^{-1} eta 900 cm^{-1} arteko espektro eremuan kolagenoaren C-O loturen luzapen bibrazio, glizeroleko hidroxilo talde eta aloe veran aurki daitezken polisakarido eta azukreei zegokien (Andonegi, de la Caba eta Guerrero, 2020). Eremu horretako banden arteko intentsitate erlatiboan gertatu ziren aldaketek, filmen formulazioko osagaien arteko interazioak, lotura fisikoak zirela iradoki zuten, hala nola, kolageno, glizerol eta aloe veran aurki daitezkeen karboxilo, amino eta hidroxilo taldeen artean. Zehazki, 992 cm^{-1} -eko banda, hemizelulosa, pektina eta ligninaren C-C loturen luzatzeari zegokion eta 1037 cm^{-1} -eko banda, kolagenoan dauden C-O bibrazioekin lotu zen. AV gehitzean, C-O loturei dagokion banda 1034 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} eta 1025 cm^{-1} -tara mugitu ziren 10AV, 20AV eta 30AV filmetan, hurrenez hurren. Ikus daitekeen bezala, AV-ren pisuaren % 20tik gorako edukiek ez zuten desplazamendu handiagorik eragin eta beraz, kolagenoa eta glizerolarekin ez zutela interakzio berririk eratu ondorioztatu zen.



4.1 Irudia. AV/kolageno filmen FTIR espektroak: A) $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ tartean eta B) $1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ tartean.

Filmn hezetazun-edukia (MC) eta masa-galera (ML) neurtu ziren eta lorturiko balioak **4.1 Taulan** bildu dira. Ikus daitekeen bezala, MC balioak kontrol filmn % 12,2tik AV30 filmn % 5,8ra jaitsi ziren, talde polarren interakzioen eraginez, urarekiko afinitatea eta beraz hezetazun edukia jaitsiz. Aitzitik, AV gehitutako filmetan, ML balioak handitu egin ziren. Zehazki, kontrol filmn masa galera % 20 ingurukoa izan zen, glizerolari

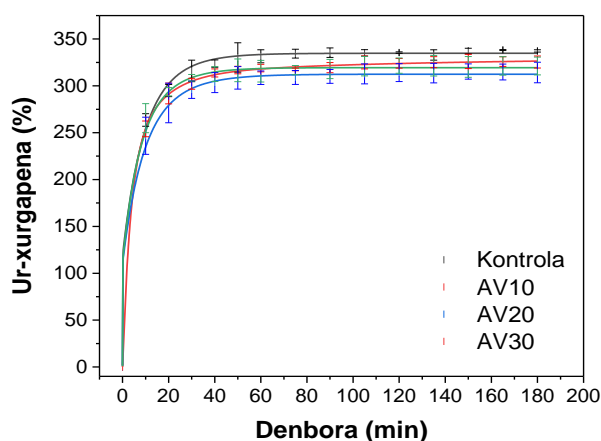
zegokiolarik eta AV zuten filmetan berriz, ML balio igoerak AV-ren disoluzioarekin erlazionatu zen (Ahlawat eta Khatkar, 2011).

4.1 Taula. Aloe vera (AV)/kolageno filmen hezetasun edukia (MC) eta masa galera (ML).

Laginak	MC (%)	ML (%)
Kontrola	12,2 ± 0,7 ^a	21,9 ± 0,7 ^a
AV10	9,8 ± 0,4 ^b	31,1 ± 0,8 ^b
AV20	7,3 ± 0,4 ^c	31,7 ± 0,5 ^b
AV30	5,8 ± 0,6 ^c	35,6 ± 0,8 ^c

^{a-c}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera.

Film horiek zauriak sendatzeko erabil zitezkeela kontuan hartuta, ur-xurgapen balioak neurtu ziren, filmek zaurien exudatuak xurgatzeko izango lukeen gaitasuna zehazteko. **4.2. Irudian** ikus daitekeenez, PBS-an (pH 7,4) murgildu eta lehen 20 minututan, film guztiek xurgapen azkarra aurkeztu zuten eta oreka balioetara 40 min pasatu ondoren iritsi ziren, % 300ko WU balioekin, AV edukia edozein zela ere. Emaitza hauen arabera, AV-ak ez zuen eraginik izan kolageno filmen ur xurgapen gaitasunean.



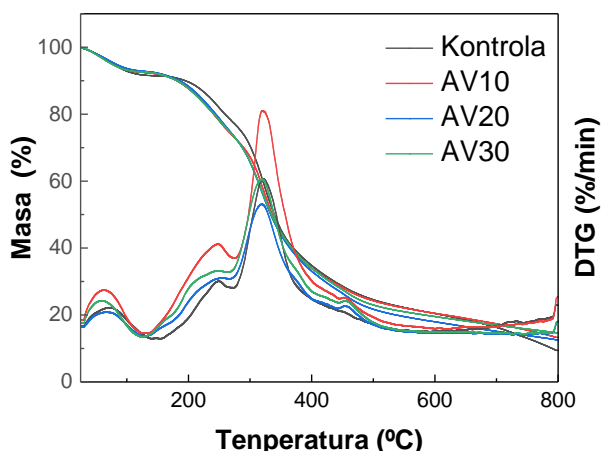
4.2 Irudia. AV/kolageno filmen ur-xurgapen (WU) ahalmena.

4.2.2 Propietate termikoak

Filmen portaera termikoa TGA eta DSC analisisien bitartez aztertu zen. Kolageno-filmek TGA eta DTG kurbak **4.3 Irudian** azaldu dira. Film guztiek antzeko portaera

4. ALOE VERA DUTEN KOLAGENO FILMAK

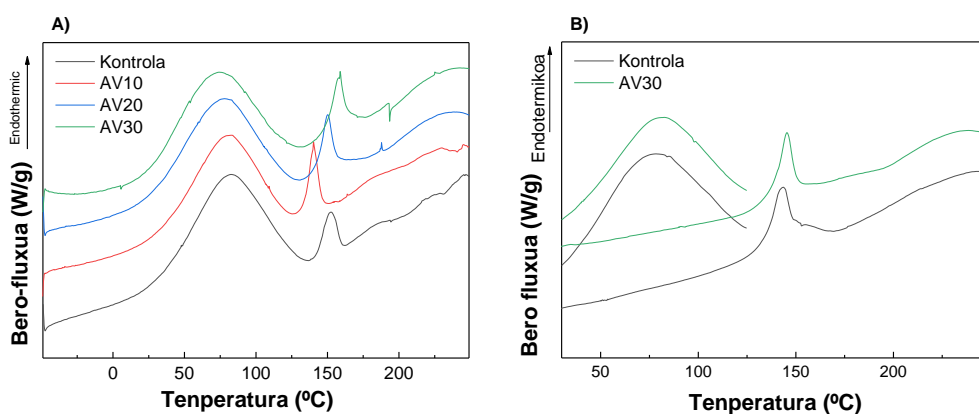
aurkeztu zuten, hiru etapa nagusirekin. 150 °C-tik beherako tenperaturetan, absorbatu- eta lotutako uraren galerari zegokion, % 10 inguruko masa galera hain zuzen ere. Bigarren etapa, 240-250 °C-tan, glizerolaren lurruntzeari esleitu zitzaion, zeina glizerolaren irakite-tenperatura (182 °C) baino altuagoa den, glizerolaren hidroxilo taldeek kolageno eta aloe veraren talde polarrekin interakzionatu zutela adieraziz, FTIR emaitzekin bat eginez. AV edukia handitu zenean, DTG gailurra handitu egin zen, eta bigarren etapa hori hemizelulosaren degradazioarekin eta AVn dauden azukreekin erlazionatu zen (El Azazazy et al., 2019; Rethinam et al., 2020). Hirugarren etapa, 270 °C-tik gorako tenperaturetan, kolageno (Ma et al., 2018) eta aloe veraren (El Azazazy et al., 2019) degradazio termikoari esleitu zitzaion. Azkenik, AV zuten filmen 453 °C-an pisu pixka bat galdu izana aloe veran aurki daitezkeen zelulosaren eta ligninaren degradazio termikoarekin erlazionatu zen (Shadangi eta Mohanty, 2014).



4.3 Irudia. Aloe vera/kolageno filmen TGA eta DTG kurbak.

Konpresio-tenperaturak eta AV gehitzeak kolagenoaren desnaturalizazioan duten eragina DSC analisiaren bidez aztertu zen eta emaitzak **4.4A Irudian** adierazi dira. Lagin guztiek bi gailur endotermiko aurkeztu zituzten: lehenengo gailurra, 80 °C ingurukoa, ur librearen askapenarekin lotu zen, eta bigarrena berriz, 150 °C ingurukoa, kolagenoaren helize hirukoitzaren desnaturalizazioarekin. Balio horiek behi azaleko kolagenoan lortutakoekin bat datoz (Shi et al., 2019). Aipatu beharra dago, AV zuten filmek ere, desnaturalizazio gailur hau aurkeztu zutela, eta horrek, AV gehitu eta

konpresio bidez moldeatu ondoren kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura mantentzen dela adierazi zuen. Horretaz gain, kolagenoaren desnaturalizazio gailurraren azterketa sakonago bat burutzeko helburuarekin, uraren lurrunketak eragin ditzaken interferentziak ekiditeko, entseatu aurretik beroketa-arrapala bat burutu zen hezetasuna kentzeko. **4.4B Irudian** ikus daitekeenez, AV-k ez zuen eraginik izan desnaturalizazio gailurrean, eta AV gehitu arren kolagenoaren helize hirukoitzaren lehentasuna berretsi zen.

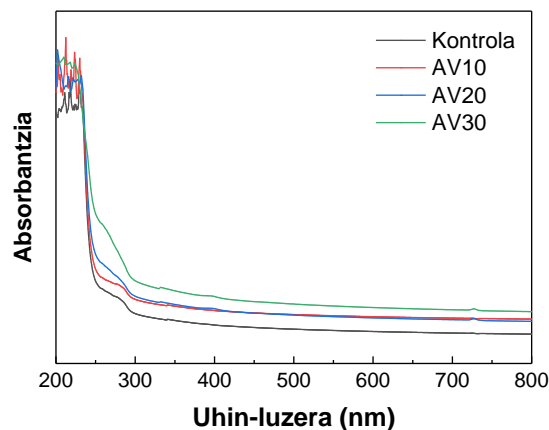


4.4 Irudia. Aloe vera/kolageno filmen DSC kurbak: A) ekorketa bakarra eta B) bi ekorketa.

4.2.3. Barrera eta propietate mekanikoak

Filmek argiarekiko hesi-propietateak aztertu ziren, eta UV-vis espektroak **4.5 Irudian** azaldu dira. Filmetan, 250-280 nm bitarteko absorbantzia-gailur txiki bat azaldu zen, kolagenoko aminoazido aromatikoaren hondakinekin lotua, hala nola fenilalanina eta tirosina, eta 200 eta 240 nm bitarteko absorbantzia-gailur maximo bat, kolagenoan dauden karbonilo taldeei lotua (Abdollet al., 2018; Duan et al., 2009). Antzeko balioak aurkitu ziren, 230 nm inguruan, I. motako arrainen kolagenoan (Chen et al., 2016). Aloe vera inkorporazioak, 250-290 nm-ko tarteko absorbantzia handitu zuen, AV-ko flabonoideei egotzia (Dey, Bera eta Chakrabarty, 2015). Beraz, kolageno-filmak zaurien apositu gisa duten erabilera kontuan hartuta, AV gehitzeak UV argiarekiko babes handiagoa eskaini dezake, zauria zainketan lagunduz.

4. ALOE VERA DUTEN KOLAGENO FILMAK



4.5 Irudia. AV/kolageno filmen UV-vis espektoak.

Gainera, filmaren izaera hidrofiloa uraren ukipen-angeluak neurtuz aztertu zen.

4.2 Taulan ikus daitekeenez, aloe vera gehitzean, WCA balioak 107° -tik 86° -ra nabarmen txikitu ziren ($P < 0,05$), gainazalaren hidrofilikotasuna handituz. Balio horiek bat datoz aplikazio birsortzaileetarako kolageno-filmaren WCA balioekin (Perumal et al., 2018). Filmaren izaera hidrofilikoa handitzeak zaurietako gehiegizko jariakinen xurgapen hobeagoa ahalbidetu lezake.

4.2 Taula. Aloe vera (AV)/kolageno filmen ur-ukipen angelua (WCA), Young-en modulua (YM), trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB).

Laginak	WCA (°)	YM (MPa)	TS (MPa)	EB (%)
Kontrola	107 ± 5^a	805 ± 25^a	$13,8 \pm 1,1^a$	$13,5 \pm 1,0^a$
AV10	106 ± 3^a	$840 \pm 11^{a,b}$	$11,5 \pm 0,8^b$	$11,5 \pm 1,2^b$
AV20	97 ± 3^b	$867 \pm 11^{a,b}$	$11,3 \pm 1,3^b$	$11,2 \pm 0,8^b$
AV30	86 ± 5^c	$879 \pm 52^{a,b}$	$10,2 \pm 0,7^b$	$8,6 \pm 0,8^c$

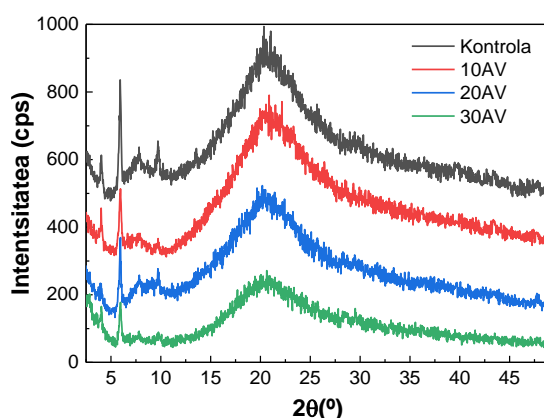
^{a-c}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera.

4.2 Taulan ageri den bezala, aloe veraren inkorporazioak propietate mekanikoetan ere eragina izan zuen. Trakzio-erresistentzia pixka bat jaitsi zen aloe vera gehitzean, AV kontzentrazioa edozein izanik ere. Era berean, AV kontzentrazioak ez zuen eragin handirik izan ($P < 0,05$) Young-en moduluan. Haustura-elongazioari

dagokionez, EB balioak jaitsi egin ziren, batez ere AV eduki handieneko filmetan, segur aski kolageno katearen mugikortasuna mugatu zuen AV egitura zurrunaren ondorioz.

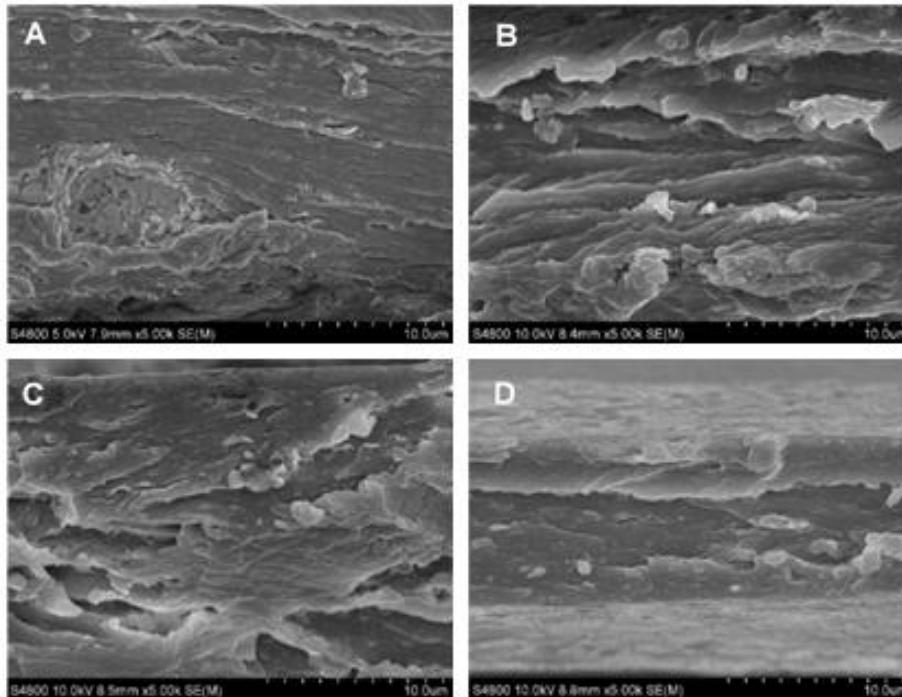
4.2.4. Propietate morfologikoak

Filmen egitura ikertu eta neurturiko propietateekin erlazionatzeko, XRD eta SEM analisiak burutu ziren. **4.6 Irudian** ikus daitekeen bezala, partzialki kristalinoak diren materialen XRD patroik karakteristikoak azaldu zuten. $2\theta = 7^\circ$ inguruan, kolageno kateen arteko paketatze lateralaren distantzia intermolekularra adierazten duen banda txiki bat aurkezten zuten eta $2\theta = 20^\circ$ inguruko banda zabalak berriz, kolageno-zuntzen sakabanaketa difusioari zegokion eta filmen egitura amorfoa adierazten du (Zou et al., 2017). Gailur hauek arrainaren azaleko kolagenoan ere aurkitu ziren (Liao et al., 2018). Aloe vera gehitzean, bi gailur horiek apur bat txikitzen ziren, egitura ordenaren jaitziera adieraziz.



4.6 Irudia. Aloe vera (AV)/ kolageno filmen XRD patroiak.

Aloe verak kolagenoaren egituren duen eragina ebaluatzeko, SEM analisia burutu zen eta zeharkako sekzioen irudiak **4.7 Irudian** ageri dira. Film guztiek egitura trinkoa eta homogeneoa erakutsi zuten. Kontrol-filmek zuntz-egitura dentsoa aurkeztu zuten, eta aloe vera gehitu zenean, egitura hori beste zimurtsuago batera aldatu zen, XRD analisiak behatutako paketatze lateralaren distantzia intermolekularraren murrizketaren bat eginez.

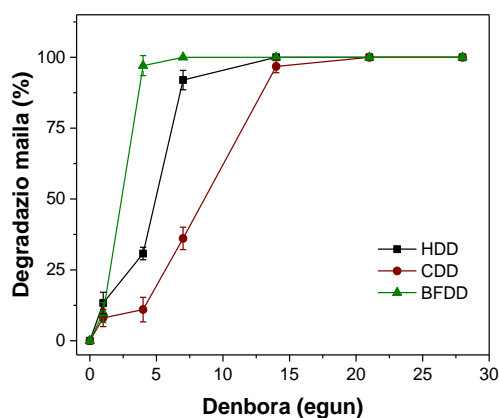


4.7 Irudia. A) Kontrol, B) AV10, C) AV20 eta D) AV30 filmen zeharkako sekzioaren irudiak.

4.2.5 Degradazio eta biobateragarritasuna

Degradazio-azterketak egin ziren PBS (pH 7,4), "gorputz-likido simulatu" eta zelula-esekiduraren eraginpean dauden biomaterialen portaera ebaluatzeko (**4.8 Irudia**). Degradazio hidrolitikoari (HDD) dagokionez, filmek % $13,29 \pm 0,86$ degradazioa izan zuten lehen egunean, eta, degradazio osoa 7. egunean lortu zen. Era berean, zelulen bidezko degradazioa (DDC), % $8,05 \pm 1,05$ eko DD batekin hasi zen 1. egunean, % $36,10 \pm 1,96$ ra igo zen 7. egunean eta maximora 14. egunean iritsi zen. Azkenik, "gorputz-jariakinen simulatzaile" (BFS) eraginpean jarritako filmek degradazio txiki bat jasan zuten (BFDD = % $9,90 \pm 1,30$) 24 ordu igaro ondoren eta, ondoren, 4. egunean degradazio handia jasan zuten. Emaidza horiek bat datoz literaturarekin, kolagenozko biomaterialak biodegradazio gaitasun handiagatik ezagutzen baitira (Shekhter et al., 2019).

Biobateragarritasunaren ebaluazioari dagokionez (**4.9 Irudia**), kolageno filmak inguru ezberdinen eraginpean jarri eta 24 orduara aska dezaketen eszipiente posibleen eraginagatik, zelulek portaera bat azaldu zuten (Hu et al., 2008). Kontrol positiboarekiko estatistikoki esanguratsua den hilkortasun iragankorra hauteman zen, bai zeharkako saiakuntzetan zein zuzeneko saiakuntzetan ($16,1 \pm 4,4$ eta $29,5 \pm 10,0$, hurrenez hurren). Jarduera metabolikoari dagokionez, zelulek balio optimoak erakutsi zituzten lehen egunetik, eta jarduera maximoa 2. egunean iritsi zen zeharkako esposizioaren kasuan, eta 4. egunean, zuzeneko esposizioaren kasuan ($102,6 \pm 5,8$ eta $94,6 \pm 13,6$, hurrenez hurren). 7. egunean, zelulen jarduera metaboliko murriztu egin zela ikusi zen ($64,7 \pm 10,9$ eta $73,7 \pm 15,6$, hurrenez hurren), eta kultiboen konfluentzia eta mantenugaien eskasiari eragotzi zitzaion (inguruneak ez ziren aldatu esperimentuan zehar).



4.8 Irudia. AV20 filmen degradazio hidrolitikoa (HDD), zelulen mendeko degradazioa (CDD) eta "gorputz-jariakinen simulatzaile" bidezko degradazioa (BFDD).

Laburbilduz, txerri-kolagenoz eta aloe veraz osatutako filma aztertutako zelulentzat biobateragarritzat har daiteke. ISO 10993-5: 2009 arauaren arabera, biomateriala % 70eko bideragarritasunera iritsi zen zeharkako eta zuzeneko probetan, azterketa-aldi guztietan (7. egunean zeharkako esposizioan izan ezik), eta ez zuen hilkortasun-daturik kultiboa ezarri ondoren. Emaitza horiek espero ziren, kolagenoaren biobateragarritasuna oso azertua baitago (Shekhter et al., 2019).

4.3 ONDORIOAK

Aloe vera/kolageno filmak konpresio bidezko moldaketaren bidez prestatu ziren, aplikazio biomedikoetarako propietate funtzionalak hobetzeko helburuarekin. AV gehitzean, gainazalaren izaera hidrofilikoa handitu zen, zaurien sendatze prozesuan fibroblastoen itsaspen hobetzailea ahalbidetu eta beraz, ehunen birsortzea bultzatuz. Gainera, ur-xurgapen balioak ez ziren aldatu, eta urperatu ondoren filmaren osotasuna mantendu zen. Portaera hori XRD eta SEM emaitzen bidez azaldu zen. Emaitza horiek kolagenoaren helize hirukoitzeko egituraren natiboaren prebalentzia erakutsi zuten, AV gehitzearekin egitura-ordena apur bat gutxituz. Gainera, manipula errazak ziren eta propietate mekaniko onak erakutsi zituzten; nahiz eta XRD analisisian azaldutako egitura-ordenaren gutxitzearen ondorioz, trakzioarekiko erresistentzia pixka bat jaitsi zen filmen AV edukia handitzean. FTIR analisiak % 20 baino AV eduki handiagoek, kolageno aloe veran arteko interakzio fisikoetan eraginik ez zuela erakutsi zuen; eta, beraz, hori izan zen aloe veradun kolageno-filmak aplikazio biomedikoetarako egokiak zirela baieztatzeko aukeratutako konposizioa.

5. kapitulua

KITOSANO-KOLAGENO FILMAK

Aplikazio biomedikoetarako potentziala duten konpresio bidez
moldeaturiko kitosano-kolageno filmak

5.1 LABURPENA

Kitosano-kolageno filmak prestatu eta karakterizatu ziren aplikazio biomedikoetarako izan lezaketen baliagarritasuna aztertzeko helburuarekin. Horretarako, propietate fisiko-kimikoak, termikoak, mekanikoak eta hesi-propietateak aztertu eta filmaren egiturarekin erlazionatu ziren. Emaitzek, kitosanoa gehitzean, kolageno natiboaren helize hirukoitzeko egituraren nagusitasuna mantendu zela adierazi zuten; kolageno zuntzen diametroak, $3,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$ -koa izanik kontrol filmetan eta $1,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ -koa LMW duten filmetan. Horretaz gain, FTIR analisisien bitartez, kolageno eta kitosano molekulen arteko interakzioen presentzia ikusi zen. Gainera, filmek zaurien sendatzea bezalako aplikazio biomedikoetarako hesi-propietate egokiak aurkeztu zituzten, $1174 \text{ g m}^{-2} \text{ egun}^{-1}$ -ko ur lurrun transmisio indizea, hain zuzen ere. Azkenik, test biologikoen bitartez, kitosano-kolageno filmek aplikazio biomedikoetarako zuten baliagarritasuna egiaztatu zen.

5.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

5.2.1 Propietate fisiko-kimikoak

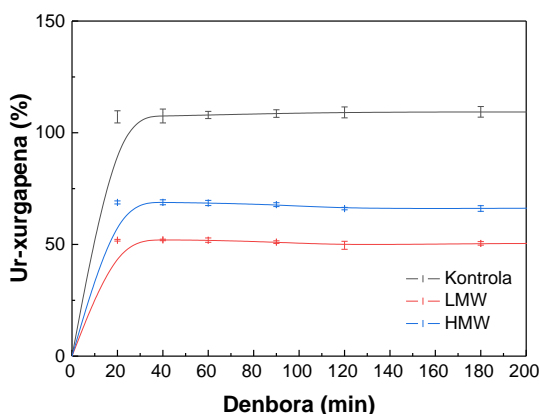
Filmen hezetasun edukia (MC) eta masa galera (ML) neurtu ziren eta balioak **5.1 Taulan** irudikatu dira. MC emaitzei dagokienez, film guztiek antzeko batez besteko balioak erakutsi zituzten, % 12 ingurukoak, beste kolageno-polisakarido film batzuetarako % 20ko hezetasun balioak baino baxuagoak izanik (Ma et al., 2020). Horretaz gain, ML emaitzek ez zuten aldaketa nabarmenik ($P < 0,05$) jasan, eta % 15 inguruko balioak glizerolaren disoluzioarekin lotu zen, kitosanoa pH 7,4-ean ez baita disolbatzen. Lan honetan aurkitutako ML balioak, % 50 alginato eta % 50 karboximetilzelulosa edukiak zituzten kolageno filmenak baino askoz baxuagoak izan ziren (Ma et al., 2020).

5.1 Taula. Kitosano-kolageno filmen hezetasun edukia (MC) eta masa galera (ML).

Laginak	MC (%)	ML (%)
Kontrola	12,12 ± 0,04 ^a	15,41 ± 0,73 ^a
LMW	11,97 ± 0,51 ^a	15,50 ± 0,58 ^a
HMW	11,53 ± 0,50 ^a	14,31 ± 0,58 ^a

^aZutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera. N= 3 erreproduzio kopuru minimoa.

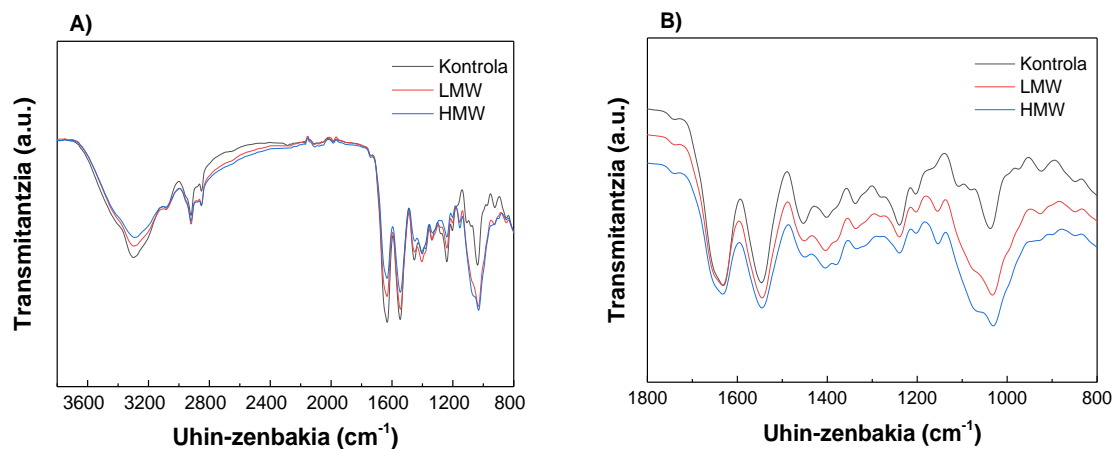
Bestalde, ur-xurgapen azterketa burutu zen eta emaitzak **5.1 Irudian** erakutsi dira. Laginak murgildu eta lehen 20 minututan, filmen ur xurgapena azkarra izan zen eta 60 min ondoren, % 110, % 65 eta % 50eko oreka balioak neurtu ziren kontrol, HMW eta LMW filmetan, hurrenez hurren. Kontrol filmen eta kitosanoa duten filmen arteko ur xurgapen balioen ezberdintasunak, kitosanoak kolageno eta glizerolaren talde polarrekin interakzioak sustatu zituela aditzera ematen zuen. Azpimarratzekoa da, halaber, LMW filmetan, HMW filmetan baino ur xurgatze balio txikiagoak lortu zirela; horrek, LMW filmetan, hidrogeno zubi gehiago adierazi zuen.



5.1 Irudia. Kitosano-kolageno ur xurgapena.

Kolageno eta kitosanoaren arteko interakzioak aztertzeko, FTIR analisia burutu zen eta FTIR espektroak **5.2A** eta **B Irudian** azaldu dira. Espektro guztiek, kolagenoaren lotura peptidikoei dagozkien absortzio banda karakteristikoak erakutsi zituzten: amida A (N-H luzapena) 3300 cm^{-1} -tan, amida I (C=O luzapena) 1630 cm^{-1} -tan, amida II (N-H flexioa) 1545 cm^{-1} -tan, eta amida III (C-N luzapena) 1238 cm^{-1} -tan (Deepthi et al., 2018;

Riaz et al., 2018). Aipatzekoa da, amida I eta amida II banden arteko intentsitate erlatiboa aldatu egiten zela kitosanoa gehitzean. Konkretuki, kontrol filmetan, amida I bandaren intentsitatea amida II bandarena baino zertxobait handiagoa zen; kitosanoa gehitzean ordea, amida I bandaren intentsitatea amida II bandarena baino txikiagoa bihurtu zen. Tendentzia bera ikusi zen CH_2 flexio bibrazioari dagokion 1450 cm^{-1} -tako banda (Chakrapani et al., 2012; Plepis, Goissis eta Das-Gupta, 1996) eta $\text{C}=\text{O}$ luzatze bibrazioari dagokion 1400 cm^{-1} -tako (Wu et al., 2017) banden arteko intentsitate erlatiboen kasuan. Amida III bandari dagokionez, uhin-luzera altuagoetara mugitu zen kitosanoa gehitzearen ondorioz. FTIR banden intentsitate erlatiboen ezberdintasun horiek, filmen osagaien karboxilo, amino eta hidroxilo taldeen artean hidrogeno zubiak aurkitzen zirela adierazi zuten. Gainera, alderantziz kargaturik dauden taldeen artean interakzio ionikoak aurkitu ziren, kitosanoan protonatuak zeuden amino eta kolagenoko anioi taldeen artean, konkretuki.



5.2 Irudia. Kitosano-kolageno filmen FTIR espektroak: A) 4000 eta 800 cm^{-1} artean eta B) 1800 eta 800 cm^{-1} artean.

Kitosanoak kolagenoaren egonkortasunean duen eragina ezagutzeko, amida I-aren profilaren bidez kolagenoaren egitura sekundarioa aztertu zen. Absortzio banda honek, hiru osagarri nagusi ditu: α -helize konformazioa 1650 cm^{-1} -tan, eta β -lamina konformazioa $1615\text{--}1630\text{ cm}^{-1}$ eta $1680\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ -tan (Wu et al., 2017). **5.2 Taulan** ikusten denez, α -helizea izan zen kitosanoarekin egindako filmen konformazio nagusia; kitosanoak, kolagenoaren jatorrizko bigarren mailako egitura babesten lagundu zuela

adieraziz. Kolagenoaren helize hirukoitzeko egituraren mantentzea bi metodoen bidez berretsi zen. Alde batetik, amida III eta 1452 cm^{-1} -tako banden arteko absortzio ratioa (A_{III}/A_{1452}) kalkulatu zen (Shi et al., 2019). **5.2 Taulan** ikus daitekeenez, A_{III}/A_{1452} erlazioa 1 baino handiagoa izan zen lagin guztietan. Beste aldetik, amida I (ν_I) eta amida II (ν_{II}) banden arteko uhin-luzera diferentzia kalkulatu zen (Sizeland et al., 2018). **5.2 Taulan** ikus daitekeen bezala, diferentzia hau 100 cm^{-1} baino txikiagokoa zen. Beraz, bi metodoen bidez lortutako emaitzen arabera, kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura mantendu egin zen. Gainera, balio horiek handitu egin ziren kitosanoa gehitzean, kitosanoak kolagenoaren egitura natiboa babesten lagundu zuela baieztatuz.

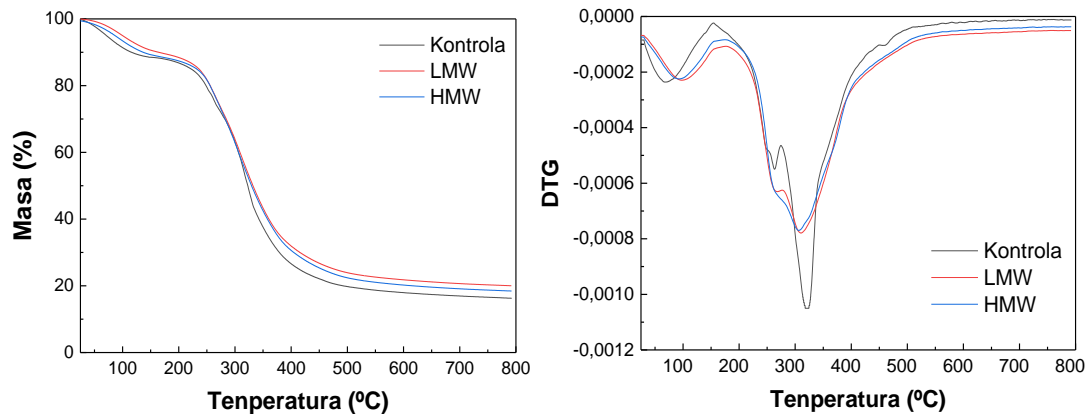
5.2 Taula. Kitosano-kolageno filmen amida I bandaren kurba egokitzapenaren azalera (%), amida III eta 1452 cm^{-1} -ko banden arteko absortzio ratioa (A_{III}/A_{1452}), eta amida I (ν_I) eta amida II (ν_{II}) banden arteko uhin-luzera diferentzia ($\nu_I - \nu_{II}$).

Laginak	β -lamina ($1615\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$)	α -helizea (1650 cm^{-1})	β -lamina ($1680\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$)	A_{III} / A_{1453}	$\nu_I - \nu_{II}$
Kontrola	35,6	49,3	15,1	1,1	85,0
LMW	36,9	52,8	10,3	1,7	88,2
HMW	38,1	55,0	6,9	1,7	87,5

5.2.2 Propietate termikoak

Kitosano-kolageno filmen portaera termikoa aztertzeko, TGA eta DSC saiakuntzak burutu ziren. TGA-ri dagokionez, TGA eta DSC kurbak **5.3 Irudian** aurkezten dira. Ikus daitekeen bezala hiru pisu galera nagusi bereiz daitezke. Lehenengoa, $100\text{ }^\circ\text{C}$ inguruan aurkeztu zen eta uraren lurrunketari esleitu zitzaion, % 12 inguruko balioak azaldu zituen, **5.1 Taulan** azaltzen diren MC balioekin bat eginez. Gailur honi dagokion tenperatura maximoa, tenperatura altuagoetan azaldu zen kitosanoa zuten filmetan, kitosano eta uraren arteko interakzioak adieraziz. $250\text{ }^\circ\text{C}$ inguruan azaldu zen bigarren pisu galera, glizerolaren lurrunketari zegokion (Andonegi et al., 2020). Azkenik, $310\text{-}320\text{ }^\circ\text{C}$ -tan azaldu zen pisu galera, kolageno (Andonegi et al., 2020) eta kitosanoaren (Leceta et al., 2013) degradazio prozesuei zegokien. Kitosanoa

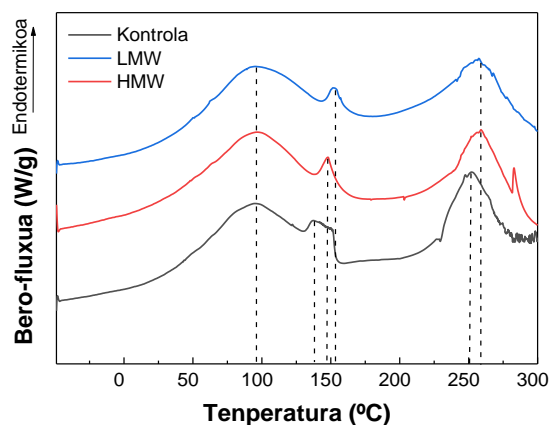
gehitzean, bigarren eta hirugarren gailur hauek aldatu egin ziren. Aldaketa hau, aurrez FTIR emaitzetan azaldu bezala, eraturiko sare-egitura ezberdinekin erlazionatu zen, kolageno eta kitosanoaren arteko interakzioen presentzia berretsiz. Kolageno filmak fukoidana bezalako polisakarikoekin eraldatuak izan diren beste lan batzuetan ere, interakzio hauek presentzia ondorioztatu zen (Perumal et al., 2018).



5.3 Irudia. Kitosano/kolageno filmen TGA eta DTG termogramak.

DSC neurketetan berriz, film guztiek hiru gailur endotermiko erakutsi zituzten, **5.4 Irudian** ikus daitekeen bezala. 90 °C inguruko gailurra ur aske eta lotura urarekin erlazionatu zen (Kaczmarek, Sionkowska eta Skopinska-Wisniewska, 2018). Desnaturalizazio tenperatura, 150 °C inguruko gailur endotermikoak errepresentatu zuten (Chakrapani et al., 2012). Kitosanoa gehitzean gailur hau tenperatura altuagoetan azaldu zen, balio altuena LMW filmetan aurkitu zelarik. Emaitza honen bitartez, kitosanoa pisu molekular baxuagokoa izateak, kolageno-kitosano interakzioak errazten dituztela konfirmatu zuen, aurrez ur-xurgapen balioek adierazi bezala. Azkenik, 210 eta 250 °C artean azaldu zen hirugarren gailur endotermikoa, helize hirukoitzeko egituratik ausazko bobina konformaziora jasandako aldaketarekin erlazionatu zen (Bozec eta Odlyha, 2011). FTIR analisiaren bitartez ikusitako kolageno-kitosano interakzioek, gailur hau tenperatura altuagoetarako desplazatu zuten. Konkretuki, DSC-ak kontrol filmen kolageno-kolageno eta kolageno-ur interakzio karakteristikoak azaltzen ditu. Kitosanoa duten filmetan, interakzio hauek kolageno-kitosano interakzioekin partzialki ordezkatu

ziren, kolageno-kitosano hidrogeno zubiek, kolageno kateen arteko hidrogeno zubiekin lehiatu zutela adieraziz. Kolageno-fukoidan filmetan antzeko emaitzak aurkitu ziren, kolagenoaren egonkortasun termikoaren igoera ikusi zelarik formulazioan polisakaridoak gehitzean (Perumal et al., 2018).

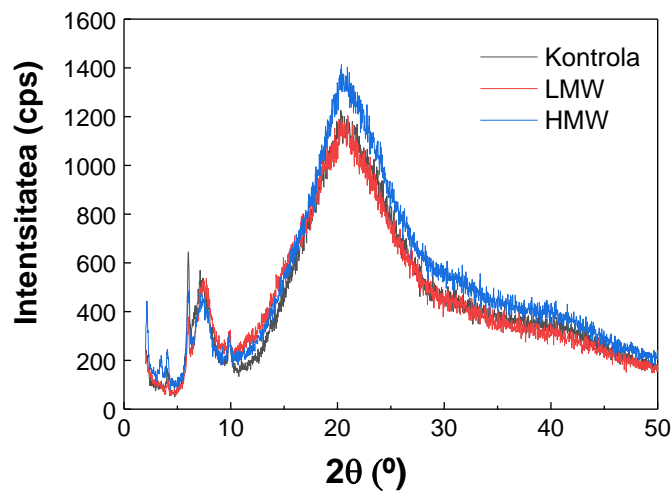


5.4 Irudia. Kitosano-kolageno filmen DSC termogramak.

5.2.3 Propietate morfologikoak

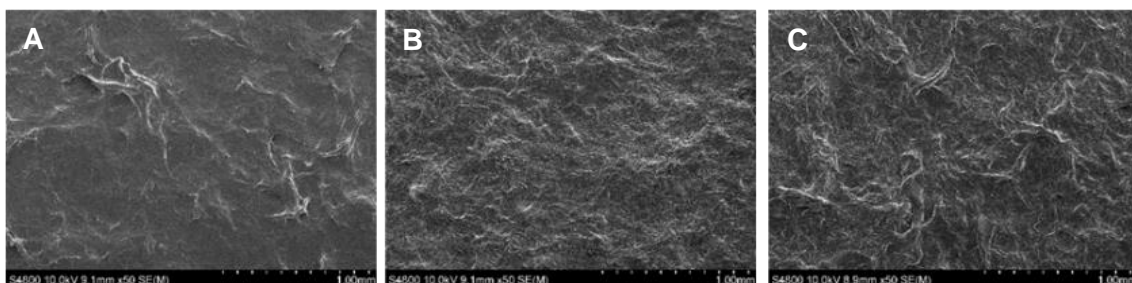
Aurrez ikusitako aldaketek, kitosano-kolageno filmen egituraren informazioa eskatzen zuten, beraz, XRD eta SEM analisiak burutu ziren. Film guztiek material amorfoen XRD patroiak erakutsi zituzten (**5.5 Irudia**). 10° -tan aurkituriko gailur txikia kitosanoaren kristal formari zegokion (Leceta et al., 2015) eta 7° ingurutako gailurra berriz, kolagenoaren helize hirukoitzeko egiturarekin erlazionatu zen (Valencia et al., 2019). Orokorrean, kolageno molekulak zeharkako lotura intermolekularren bitartez zuntzekatan biltzen dira eta hauek berriz, zuntzetan, kolagenoaren egitura hierarkiko elkargurutzatu karakteristikoa emanez. XRD emaitzek ez zuten aldaketa esanguratsurik erakutsi kitosanoa gehitzean, kolagenoaren egitura helikoidalak ez zela aldatu adieraziz eta beraz, FTIR emaitzekin bat eginez. Horretaz gain, kolageno zuntzen dispersio difusoarekin erlazionatzen den banda zabal bat aurkitu zen 20° inguruan, filmen egitura amorfoa adieraziz (Zou et al., 2017). Ikus daitezkeen bezala, film guztiek XRD patroia antzekoak erakutsi zuten, HMW kitosanoa duen filmetan 20° -tako bandan intentsitate

erlatiboaren igoera txiki batekin, egituraren ordena handitzen denaren adierazgarri zelarrik.



5.5 Irudia. Kitosano-kolageno filmen XRD patrioiak.

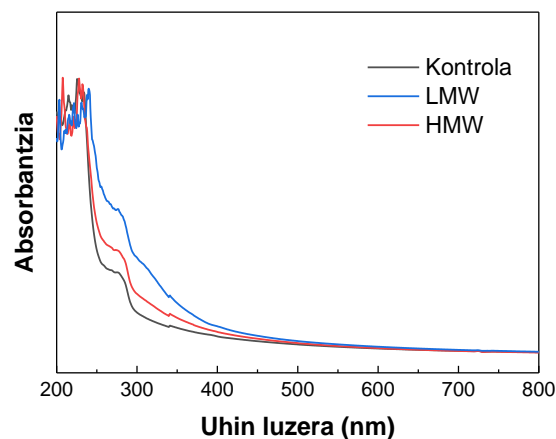
Kitosanoaren inkorporazioak kolageno filmetan izandako aldaketa sakonagoa aztertzeko SEM analisisa burutu zen eta filmen gainazaleko irudiak **5.5A, B** eta **C Irudian** azaldu dira. Film guztien SEM mikrografiek, kolagenoaren zuntz egitura adierazi zuten, kolageno natiboari dagokion aldizkakotasuna erakutsiz (Socrates et al., 2019). Kitosanoa duten laginek gainazal zimurragoa aurkeztu zuten eta zuntz gehiago ikus zitezkeen, bereziki HMW filmetan. Horretaz gain, kolageno zuntzen diametroaren txikitze esanguratsua ($P < 0,05$) ikusi zen, kontrol filmen $3,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$ -tik, LMW eta HMW filmen $1,8 \pm 0,6 \mu\text{m}$ eta $1,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$ -etara, hurrenez hurren.



5.6 Irudia. Kitosano-kolageno filmen gainazalaren SEM irudiak: A) Kontrol, B) LMW eta C) HMW.

5.2.4. Hesi-propietate eta propietate mekanikoak

Kitosano-kolageno filmen argiarekiko hesi-propietateak aztertu ziren eta UV-vis espektroak **5.7 Irudian** adierazi dira. Ikus daitekeen bezala, kolageno filmek, UV argiarekiko hesi balio maximoa 200 eta 250 nm artean aurkeztu zuten, kolagenoaren karbonil, karboxil eta kate polipeptidikoen amida taldeei esker (Pal, Nidheesh eta Suresh, 2015; Veeruraj, Arumugam eta Balasubramanian, 2013) eta 250-280 nm-tan, kolagenoaren tirosina eta fenilalanina amino azido hondarrei dagozkien absortzio gailur txiki bat azaldu zuten (Duan et al., 2009; Huang et al., 2011). Kitosanoa gehitzean UV babes ahalmen handia ikusi zen, kitosanoaren hidroxilo auxokromo taldeei esker, 250-280 nm tarteko absorbantzia handituz (Uranga et al., 2019).



5.7 Irudia. Kitosano-kolageno filmen UV-vis espektroak

Zaurientzako apositu bezala erabiltzen diren biomaterialek, zauriaren hezetasun-galera ratio optimoa mantendu behar dute, eta beraz, lurruntzea erraztu eta gehiegizko likidoaren xurgapena inhibitu behar dute (Singh, Gupta eta Gupta, 2018). Hau kontuan hartuta, ur-lurrunaren transmisio-tasa neurtu zen. Larruazal normaletan, berezko ur lurrunaren transmisio ratioa $204 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{egun}^{-1}$ -koa da gutxi gora behera, zauritu eta erretako larruazalean berriz, 279 eta $5138 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{egun}^{-1}$ -koak dira, hurrenez hurren (Lamke, Nilsson eta Reithner, 1977). **5.3 Taulan** ikus daitekeen bezala, kitosanoa gehitzean, filmen WVTR balioen artean ez zen desberdintasun esanguratsurik ($P > 0,05$) aurkitu eta lagin guztiek izaera oklusibo handia erakutsi zuten, aplikazio

biomedikoetarako egokia izanik, hala nola zaurien sendatzean. Gainera, filmen izaera hidrofila determinatzeko WCA balioak neurtu ziren, jakina baita biomateriala eta ehunen arteko interakzioetan eragin nabaria duela. **5.3 Taulan** ikus daitekeen bezala, WCA balioak nabarmen jaitsi ziren kitosanoa gehitzean, zaurien sendatzean zehar fibroblasto eta zelula endotelialen adhesioa erraztuz. Kolageno-fukoidan filmetan ere, WCA balioen jaitsiera nabarmena ($P < 0,05$) aurkeztu zen (Perumal et al., 2018).

5.3 Taula. Kitosano-kolageno filmen ur baporearen iragazkortasun indizea (WVTR), ur-ukipen angelua (WCA), eta film hidratatu eta lehorren trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB).

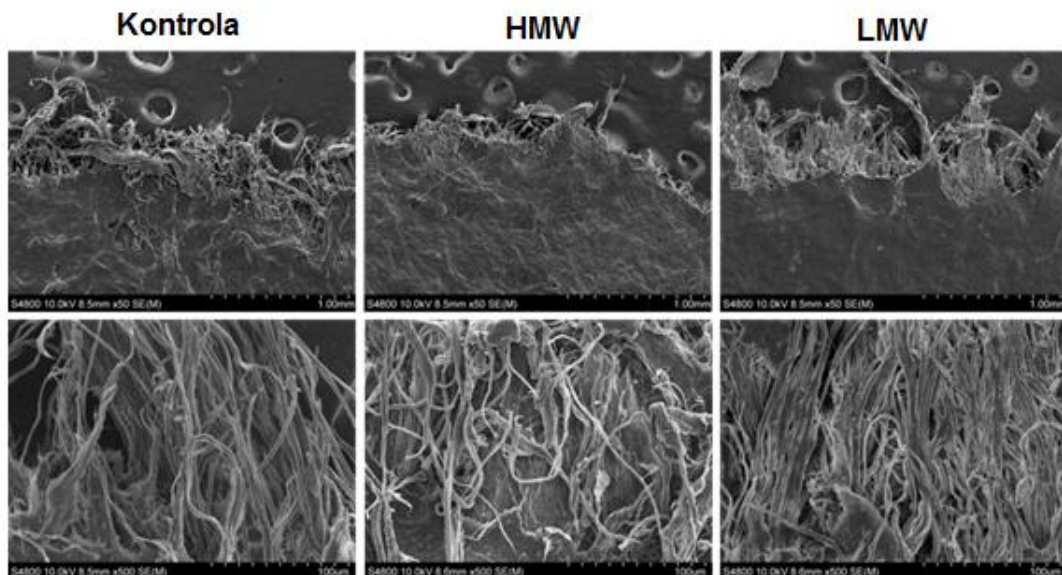
Laginak	WVTR ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{day}^{-1}$)	WCA ($^{\circ}$)	TS _{lehorra} (MPa)	EB _{lehorra} (%)	TS _{hidratatua} (MPa)	EB _{hidratatua} (%)
Kontrola	1172 ^a	103 \pm 7 ^c	7,7 \pm 0,6 ^a	13,2 \pm 0,5 ^a	2,0 \pm 0,1 ^a	50,6 \pm 1,9 ^a
LMW	1176 ^a	90 \pm 7 ^a	12,4 \pm 0,8 ^b	24,1 \pm 0,8 ^b	2,8 \pm 0,1 ^b	34,0 \pm 0,4 ^b
HMW	1174 ^a	93 \pm 7 ^b	13,0 \pm 0,6 ^b	21,9 \pm 0,7 ^c	2,3 \pm 0,1 ^c	39,3 \pm 1,1 ^c

^{a-c}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera. N= 5 erreproduktzio kopuru minimoa.

Filmek propietate mekanikoak, sareko interakzio intermolekular eta intramolekularren distribuzio eta dentsitatearekin altuki lotua dago. Beraz, kitosanoek propietate mekanikoetan duten eragina **5.3 Taulan** ageri da. Film lehorretan, FTIR analisiaren bitartez aurkitu ziren kolageno-kitosano interakzioen eraginez, TS eta EB nabarmen igo ziren ($P < 0,05$) kitosanoa gehitzean. Lehenago **5.2 Taulan** azaldu bezala, kolagenoa, hidrogeno zubi intentsu eta Van der Waals indarren bitartez lotutako α -helix kateen bidez dago osatua. Kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura dela eta, kolagenoak trakzio-erresistentzia egokia aurkezten du baina kateen arteko interakzio intentsuek elongazioa ekidin dezakete. Bestalde, film hezeetan, urak kolageno kateen arteko interakzio horiek ahuldu ditzake, eta horrela, luzapena erraztuz eta filmei malgutasun handiagoa emanez. Hala ere, efektu hori ez zen hain nabarmena izan kitosanoa duten filmetan, kolageno eta kitosanoaren arteko interakzio gehigarriak zirela eta; LMW filmetan, kitosano molekula txikiagoak izateak interakzioak erraztu baitzituen.

5. KITOSANO-KOLAGENO FILMAK

Honek, **5.1 Irudian** azaldutako ur-xurgapen ahalmenarekin bat egin zuen, non ur-xurgapena balio altuenak kontrol filmetan aurkitu ziren, HMW filmak jarraituz eta azkenik, LMW filmek erakutsi zituzten ur-xurgapen balio baxuenak. Nabarmendu beharra da, saiakera mekanikoen ondoren, film guztiek haustura-gainazalean zuntz egitura erakutsi zutela **5.8 Irudian** ikusi daitekeen bezala.

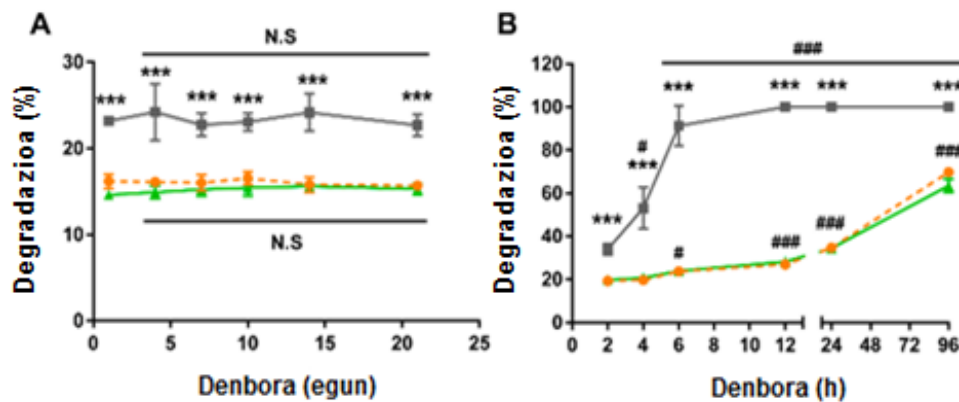


5.8 Irudia. Analisi mekanikoen ondoren haustura zonako gainazalaren SEM irudiak: A) kontrol, B) LMW eta C) HMW filmak.

5.2.5 Biodegradazioa eta zیتotoxikotasun ebaluazioa

Alde batetik, degradazio hidrolitikoaren azterketek, 21 egunetan buruturiko akzio hidrolitikoaren ondoren, kitosano-kolageno filmek ez zutela pisu jaitiera jarraiturik jasan azaldu zuten. Hasierako galera, % 15koa kitosanoa duten filmetan eta % 23koa kontrol filmetan (**5.9A Irudia**), glizerolaren disoluzioarengatik izan zitekeen. Emaiza hauek, kitosanoa gehitzeak disolbaturiko glizerol kantitatea jaitsi zela ere iradoki zuten, kitosanoa zuten filmek degradazio balio baxuagoa erakutsi baitituzten azterketa osoan zehar; eta LMW eta HMW filmen artean ez zen desberdintasunik antzeman edozein denbora puntuetan. Filmek hidrolisiarekiko erresistentzia hau, kolagenoak uretan zuten izaera disolbaezinaren bitartez azaldu zen. Propietate hau kitosanoa gehitzean hobetu

egin zen, zeinak hidrogeno zubiak eratu zituen kolageno molekulekin, aurrez FTIR analisiak erakutsi bezala.

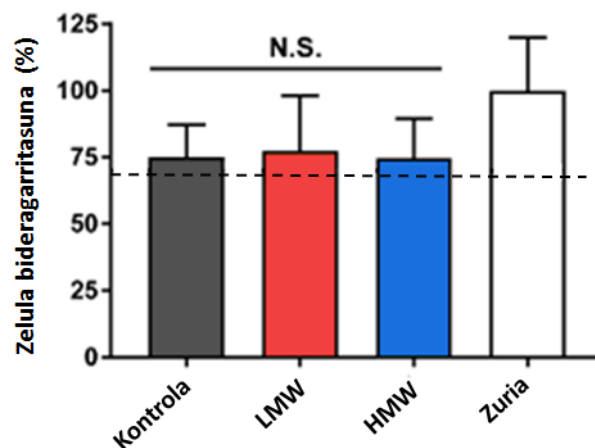


5.9 Irudia. Degradazio ebaluazioa: A) degradazio hidrolitikoa, *** bidez kontrol vs LMW eta HMW laginetan adieraziz $P < 0,001$; eta lagin bakoitzaren une bakoitzean eta lehen egunean izango dituen alde ez-esanguratsuak N.S bidez adieraziz. B) degradazio entzimatikoa, *** bidez kontrol vs LMW eta HMW laginetan adieraziz $P < 0,001$, # bidez $P < 0,05$ eta ### bidez une bakoitzean eta 2 ordutan laginen arteko $P < 0,001$ adieraziz.

Beste aldetik, degradazio entzimatico azterketek, 12 ordu baino gutxiagotan kontrol filmen degradazio osoa erakutsi zuten; kitosanoa zuten filmetan ordea, pisua galera soilik, % 27-28koa izan zen. Balio hauek, Perumal et al. (2018) autoreek aurkitutakoekin bat egin zuten, zeinak 12 ordu ondoren, kontrol filmen % 27 eta fukoidana duten filmetan % 40ko degradazioak azaldu zutelarik 96 ordu igaro ondoren, hasierako pisuaren % 70 inguru galdu zuten, LMW eta HMW kitosanoa zuten filmen artean aldaketa nabarmenik ikusi gabe. Kitosanoa zuten filmetan degradatu gabe geldu zen % 30 hori, kitosanoari dagokio, ez baitzuen entzimen eraginik jasan. Beraz, kitosanoak, kolagenoak kolagenasaren aurrean duen erresistentzia handitu zuela frogatu zen. Emaitza hauek degradazio entzimatikoa, polimeroko segmentazio zonen kantitateen eta aldamioren ingurunean eskuragarri zeuden entzima kontzentrazioaren arabera gertatzen denaren bidez azaldu zen (Drury eta Mooney, 2003). Zentzu honetan, kitosanoa gehitzean, entzimek kolagenoaren segmentazio zonara zuen sarbidea oztopatzen zuen, kolagenasaren bidezko degradazioa murriztuz. Lehenago esan bezala (Etxabide et al., 2017), horrelako ezaugarriak dituzten filmak hazkuntza faktorearekin

5. KITOSANO-KOLAGENO FILMAK

kargatuak izan daitezke, hala nola epidermikoaren hazkuntza faktorea (EGF). Degradazio profil motelak, bioaktiboen askapen kontrolatua ahalbidetzen du eta beraz, zauri kronikoak bezalako gaixotasunetan inflamatorioetan gertatzen den metaloproteasen jarduera igoerak eragindako mikroingurune gogorretik babesten dute (Barrientos et al., 2014).



5.10 Irudia. Zitotoxikotasun saiakuntza, zuriarekiko diferentzia ez-esanguratusak NS-rekin adierariz, eta % 70 bideragarritasun zelularra lerro etenaz adieraziz.

Aplikazio biomedikoetarako filmek biobateragarritasuna bezalako baldintza gehigarria bete behar dituztenez, zitotoxikotasun saiakuntza burutu zen, gailu biomedikoen ebaluazio biologikorako ISO 10993-5:2009 jarraibideetatik egokitutako protokolo bat jarraituz. **5.10 Irudian** ikus daitekeen bezala, 48 orduz filmekin kontaktu zuzenean eduki ondoren, film guztiek % 70 baino zelulen bideragarritasun handiagoa erakutsi zuten. Eraitza horiek, filmen formulazioko osagai bakoitzaren biobateragarritasunaren bat etorri ziren. Aurkikuntza horiek kontuan hartuta, kitosano-kolageno filmek ISO 10993-5:2009 bete zutela esan daiteke eta beraz, biomaterial ez-zitotoxikotzat hartu zen.

5.3 ONDORIOAK

Zaurien sendaketa bezalako aplikazio biomedikoetarako, propietate funtzional hobetuak zituzten kitosano-kolageno filmek prestatu ziren. Kitosanoa gehitzean, kolageno filmen ur-xurgatze ahalmena murriztu zen eta honek, zaurien sendaketan

interesgarriak izan daitezken hazkuntza faktore epidermikoaren askapen kontrolatua ahalbidetu lezake. Jokaera hau, kolageno-kitosano interakzioen bitartez azaldu zen, FTIR analisiaren bidez ikusi zen bezala, non kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura natiboaren nagusitasuna ere erakutsi zuten, XRD emaitzekin bat eginez. Propietate funtzional gehienetan ez ziren desberdintasun esanguratsurik aurkitu kitosanoaren pisu molekularren funtzio, lagin hidratatuen erresistentzia mekanikoa barne. % 70 baino zelulen bideragarritasun altuagoa lortu zen aztertutako film guztietan.

6. kapitulua

KITOSANO-KOLAGENO ALDAMIOAK

Liofilizazio bidez prozesaturiko kitosano-kolageno aldamioren ingurumen-ebaluazioa eta ebaluazio fisiko-kimikoa

6.1 LABURPENA

Lan honetan, kolageno natiboaren aldamiok prestatu eta material zein ingurumen ikuspegiak kontsideratu ziren biomaterial iraunkorrakoak lortzeko estrategia globala eskaintzeko helburuarekin. Ingurumen perspektibatik, kolagenoaren estrakzioan tratamendu azido eta entzimatiakoak ekidin zirela aipatu behar da, kimikoak, energia eta denbora bezalako errekurtsoen murrizketa ahalbidetuz eta urrats horren ingurumen-karga txikia ekarriz aztergai dauden inpaktu-kategoria guztietan. Aldamioen osagaien formulazioan kitosanoa gehitzean, kolageno eta kitosanoaren artean interakzio fisikoak eratu ziren baina kolageno natiboaren estruktura mantendu zen, FTIR eta XRD analisisien bidez ikusi zen bezala. Kitosanoa gehitzean, mikroegitura porotsu homogeneousagoak, eta aldamiok lehor zein hidrataturiko aldamioren modulu elastiko eta konpresio erresistentzia handiagoak ere lortu ziren. Horretaz gain, hidrataturiko aldamiok konpresio ziklo batzuk jasan ondoren bere dimentsioak mantendu zituzten.

6.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

6.2.1 Ingurumen azterketa

Kolagenoa hainbat animalia-azpiproduktuetatik lor daiteke eta eskala komertzialean, zerri- eta behi-larrua eta oilasko-hezurak dira bere iturri nagusiak (Abdollahi et al., 2018; Ma et al., 2003). Lan horretan, kolagenoa larruazal banatze eta zatiketarik (Andonegi, Caba eta Guerrero, 2020) eratorritako azpiproduktuetatik lortu zen. Kolagenoaren erauzketari dagokionez, aipatu beharra da zenbait metodo aurki daitezkeela, besteak beste, lehengaiak substantzia kimikoekin tratatzen dira, hala nola sodio hidroxidoa, alkohol butiliko eta azidoak, eta/edo entzimekin, pepsina eta tripsina, adibidez (Vidal et al., 2020). Aitzitik, lan honetan sodio hidroxidoa eta aurretratamendu mekanikoak bakarrik erabili ziren, produktu kimikoen erabilera murriztuz eta ingurumen- eta ekonomia-onurak ekarriz, tratamendu azidoak eta entzimatiakoak erabiltzen dituzten prozesuekin alderatuta, baliabide gutxiago erabili baitziren (materialak, energia,

6. KITOSANO-KOLAGENO ALDAMIOAK

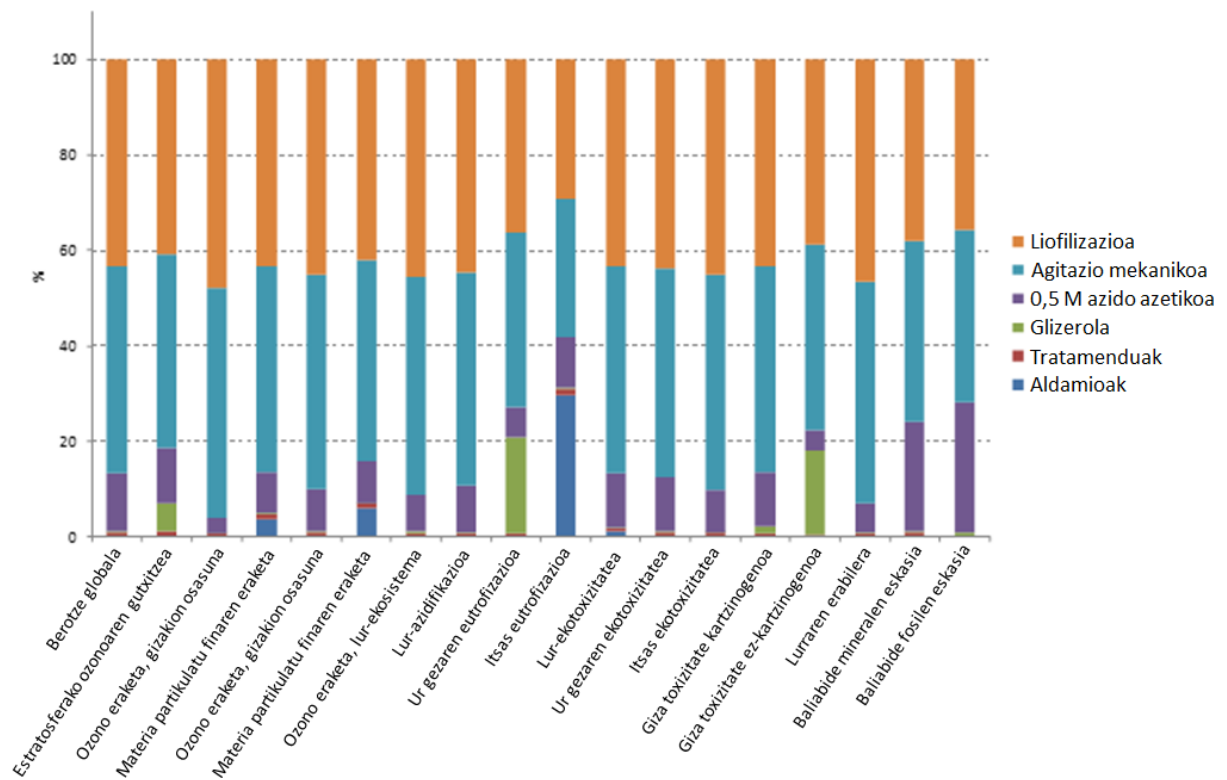
denbora) (Ortiz et al., 2015; Noorzai et al., 2020). Analisisian, aldamiokak prestatzeko prozesuan 1:20 (p/v) proportzioan erabilitako azido azetikoa (0,5 M) eta ur destilatua ekoizteko prozedura ere hartu ziren kontuan. Aurrekoa kontuan hartuta, kolageno-aldamiokak ekoizteko ebaluatutako inpaktu-kategoria guztietarako ingurumen-eragintza globalak **6.1 Taulan** azaltzen dira. Esan beharra dago, aurretratatamendu-etapak aldamioren prestaketarekin alderatuta izan zuten inpaktua oso txikia izan zenez (**6.1 Irudia**), bi prozesuen inpaktu-balioak **6.1 Taulan** batera adierazi zirela.

6.1 Taula. Kolageno aldamioren inpaktu-kategoria balioak.

Inpaktu kategoria	Unitatea	Totala
Berotze globala	kg CO ₂ baliokide	0,7730
Estratosferako ozonoaren gutxitzea	kg CFC11 baliokide	4,09·10 ⁻⁷
Erradiazio ionizatzailea	kBq Co-60 baliokide	0,4080
Ozono eraketa, gizakion osasuna	kg NO _x baliokide	0,0026
Material partikulatu finaren eraketa	kg PM _{2.5} baliokide	0,0019
Ozono eraketa, lur-ekosistema	kg NO _x baliokide	0,0027
Lur-azidifikazioa	kg SO ₂ baliokide	0,0048
Ur gezaren eutrofizazioa	kg P baliokide	0,0003
Itsas eutrofizazioa	kg N baliokide	3,32·10 ⁻⁵
Lur-ekotoxizitatea	kg 1,4-DCB	0,8840
Ur gezaren ekotoxizitatea	kg 1,4-DCB	0,0105
Itsas ekotoxizitatea	kg 1,4-DCB	0,0146
Giza toxizitate kartzinogenoa	kg 1,4-DCB	0,0233
Giza toxizitate ez-kartzinogenoa	kg 1,4-DCB	0,3050
Lurraren erabilera	m ² a uzta baliokide	0,0211
Baliabide mineralen eskasia	kg Cu baliokide	0,0007
Baliabide fosilen eskasia	kg olio baliokide	0,2350
Ur kontsumoa	m ³	0,0086

Emaitzek erakutsi zutenek, lurraren ekotoxikotasunak, berotze globalak eta erradiazio ionizatzaileek kolagenoaren ekoizpen-prozesuan ingurumen-inpaktu txikiak eragin zituzten; gainerako kategoriek, berriz, minimoki eragin zuten ingurumen-karga globalean. Horrez gain, inpaktu-kategoria bakoitzaren ingurumen-eragintzak **6.1 Irudian** ageri dira, ehunekotan banakatuta. Horrela, etapa bakoitzak azken produktuan egiten duen ekarpena ebaluatu daiteke. Kasu horretan, bizi-ziklo osoan parte hartu zuten prozesu eta jardueren ekarpenak eragintza globalen arabera zehaztu ziren. Ikus daitekeenez, irabiatze mekanikoa eta lehorketa urratsak izan ziren inpaktu-kategoriaren balioen eragile nagusiak, inpaktu osoaren % 80 ingurukoa izanik. Ingurumen

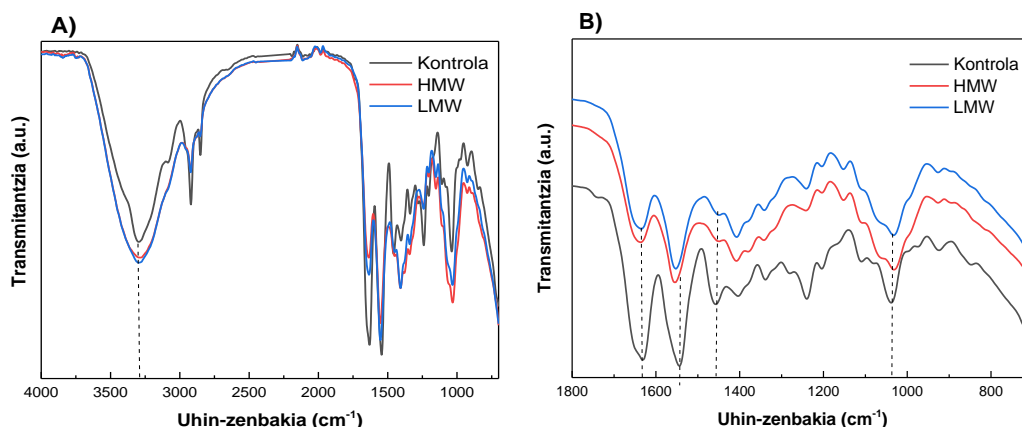
ebaluazioak bi prozesu hauek identifikatu zituen adierazlerik garrantzitsuenak bezala, hau da, etorkizuneko lanetan hobekuntza erabakiak hartzeko potentzial handiena luketenak. Zehazki, inpaktu-kategoria edozein izanda ere, prozesu horietan erabilitako energiak, bereziki elektrizitate-kontsumoak, eragin kritikoa izan zuen. Beraz, azterketa honek, kolageno-aldamioen garapenari lotutako ingurumen-karga murrizteko, prozesu horiek hobetu eta optimizatu egin behar direla adierazi zuen. Kolageno aldamiok laborategian garatu zirenez, eskalatze prozesuaren bidez lehen aipatutako ingurumen-inpaktuak murrizteko helburua lortuko litzateke.



6.1 Irudia. Kolageno-aldamioen bizi-ziklo osoan parte hartzen duten prozesu garrantzitsueni dagozkien kontribuzio erlatiboak inpaktu-kategoria bakoitzean. Ingurumen-eraketa bereizgarriak ehunekotan adierazten dira faktore eragile garrantzitsuetarako: aurretratamenduak, irabiatze mekanikoa, azido azetikoaren disoluzioa (0,5 M), glizerola eta lehortzea.

6.2.2 Fourierren transformatu bidezko espektroskopia infragorria (FTIR)

FTIR espektroek (6.2 Irudia) kolagenoan lotura peptidoi esleitutako xurgatze-bandak erakutsi zituzten (Riaz et al., 2018): amida A 3298 cm^{-1} -tan (N-H eta O-H taldeen luzatze-bibrazioak), amida I 1631 cm^{-1} -tan (C=O luzatzea), amida II 1544 cm^{-1} -tan (N-H flexioa) eta amida III berriz, 1239 cm^{-1} -tan (C-N luzatzea). 6.2A Irudian ikus daitekeenez, 3298 cm^{-1} -eko banda intentsitatea pixka bat handitu zen kitosanoa aldamioren formulazioan gehitu zenean, kolagenoaren eta kitosanoaren arteko interakzioak adieraziz, bai LMW eta baita HMW kitosanoarekin. Emaitza hauek bat datoz, talde alifatikoen CH_2 flexio-bibrazioei egozten zaien 1456 cm^{-1} -tako bandaren intentsitate erlatiboaren aldatzearekin; intentsitatea txikiagoak izanik kitosanoa gehitzean. Amida I eta II banden arteko intentsitate erlatiboan ere aldaketa bat hauteman zen.



6.2. Irudia. Kontrol aldamio eta HMW eta LMW kitosanoak dituzten aldamioren FTIR espektroak A) $4000\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ eta B) $1800\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ tartean.

Horrez gain, kitosanoa gehitzean amida II taldearen banda uhin luzera altuagoetara mugitu zen eta amida I banda, kolagenoaren helize hirukoitzarekin zerkusia duena, posizio berean mantendu zen, eta kitosanoa gehitzean kolagenoaren helize hirukoitza mantendu zela eta kolagenoaren eta kitosanoaren arteko interakzioak hidrogeno zubiak zirela ondorioztatu zen. Gainera, amida I (I) eta amida II (II) (Sizeland et al., 2018) banden arteko diferentzia 100 cm^{-1} baino txikiagoa izan zen, eta horrek kolageno-helize hirukoitzaren egiturak bere horretan iraun zuela adierazten du (Sizeland

et al., 2018). **6.2 Taulan** ikus daitekeenez, balio horiek murriztu egin ziren kitosanoa gehitzean, eta honela, kitosanoak kolagenoaren jatorrizko egitura babesten lagundu zuela baieztatu zen.

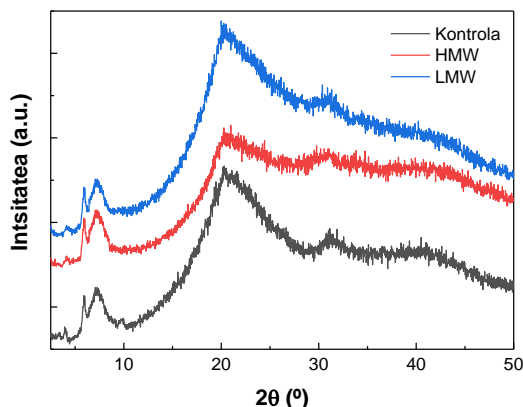
6.2. Taula. Kontrol aldamiu eta HMW eta LMW kitosanoak duten kolageno aldamiuen amida I (ν_I) eta amida II (ν_{II}) bandak, eta hauen arteko uhin luzera diferentzia ($\nu_I - \nu_{II}$).

Laginak	Amida I (ν_I)	Amida I (ν_{II})	$\nu_I - \nu_{II}$
Kontrola	1631	1544	87
HMW	1636	1555	81
LMW	1635	1552	83

FTIR banden arteko intentsitate erlatiboan ezberdintasuna eta banda-aldaketak kolagenoaren eta kitosanoaren arteko interakzio fisikoak iradoki zituzten, seguru asko, aldamiuen formulazioko osagaietan aurkitzen diren karboxilo, amino eta hidroxilo taldeen arteko hidrogeno zubiengatik.

6.2.3 X-izpien difrakzioa

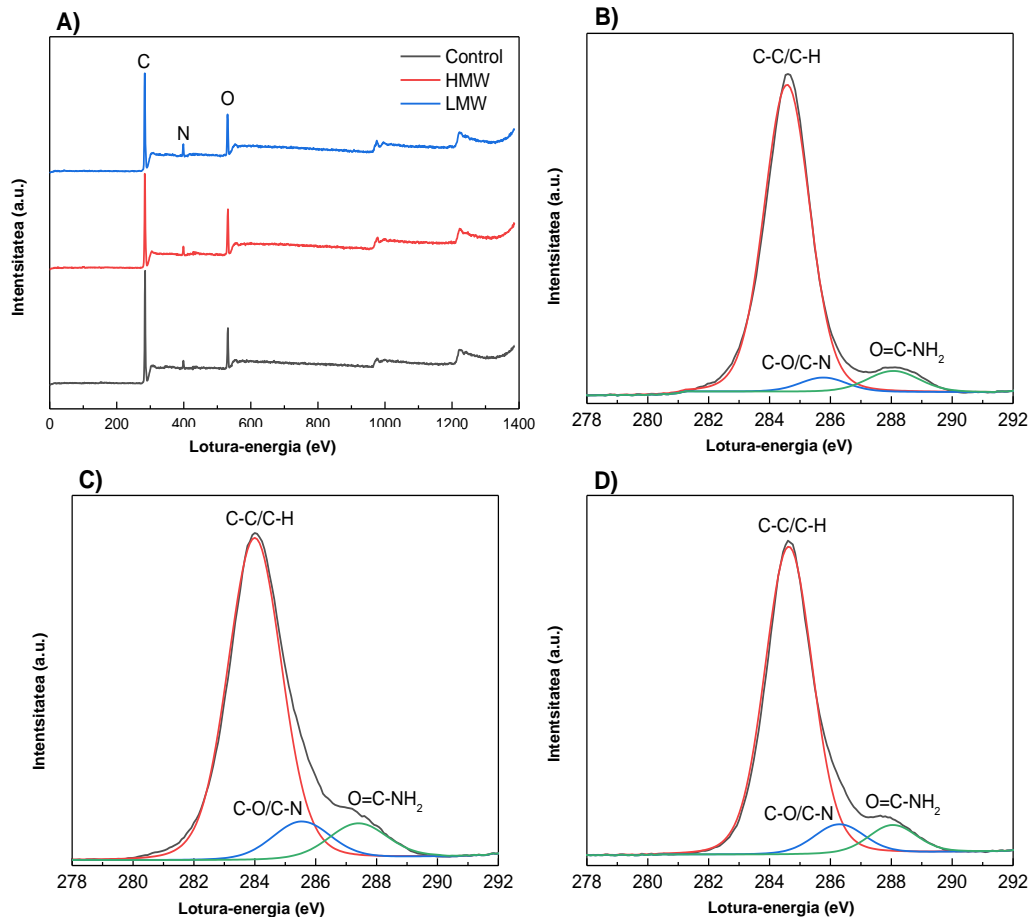
LMW eta HMW kitosanoa duten kolagenoaren egitura X-izpien difrakzioa (XRD) bidez aztertu zen. **6.3 Irudian** ikus daitekeenez, 7° inguruko gailurrak kolageno kateen arteko paketatze lateralaren distantzia intermolekularra adierazi zuen; izan ere, kolageno-molekulak, eskuarki, Schmitten ereduaren bidez kolageno zuntzaketan kitosanoan barnean biltzen dira, eta jarraian molekulen arteko erretikulazioaren bidez kolageno-zuntzak eratzen dituzte (Hu et al., 2013). Bigarren gailur zabal bat, 20° inguruan aurkeztua, kolageno-zuntzen sakabanatze lausoaren ondorioa izan zen, eta hirugarrena berriz, 32° inguru, hondakin-distantziaren ondoriozko handitze helikoidalaren ondorioa da, kolagenoaren konformazio osotasunarekin zerikusia duena (Hu et al., 2013). Kitosanoa erantsi zenean, laginek gailur-patroi bera erakutsi zuten, eta kolagenoaren egitura osotasuna mantendu zela adieraziz, FTIR-aren emaitzekin bat eginez.



6.3 Irudia. Kontrol aldamioren eta HMW eta LMW kitosanoa duten kolageno aldamioren XRD patrioiak.

6.2.4 X-izpien bidezko espektroskopia fotoelektrikoa (XPS)

XPS burutu zen oinarriko konposizioaren ikuspegi zehatza lortzeko. **6.4A Irudian** ikus daitekeenez, C 1s (284,6 eV), N 1s (399,7 eV) eta O 1s (531,9 eV) (Gao et al., 2020) izan ziren gailur nagusiak. Gainera, C 1s espektroak hiru gailur nagusitan bana daitezke: 284,6 eV, 288,1 eV eta 285,9 eV. Oro har, 284,6 eV-eko gailura karbono alifatikoei esleitu zitzaizen nagusiki (C-H eta C-C), 285,9 eV-eko gailurra oxigeno- edo nitrogeno-atomoiei (C-O, C-N) lotutako karbonoei, eta 288,1 eV-eko gailurra peptidokateen karbonoei esleitu zitzaizen (C=O) (Wu et al., 2011). HMW (**6.4C Irudia**) eta LMW (**6.4D Irudia**) aldamioren C1s espektroen gailur erlatiboko hiru eremu horiek kontrol-aldamioetatik (**6.4B Irudia**) desberdindu ziren. Zehazki, 284,6 eV-tako gailurraren azalera erlatiboa jaitsi egin zen, eta 285,9 eta 288,1 eV-etako gailurrenak berriz, igo C-H/C-C loturei dagokien gailurren azalera erlatiboa murrizteak, azalerraren izaera hidrofobikoa murriztu egin zela adierazi zuen, eta C-O, C-N eta O=C-NH₂ taldeei lotutako gailur azalaren handitzeak, berriz, gainazalean zehar talde polarren presentzia handitu egin zela iradoki zuen. Gertaera horiek gainazalaren izaera hidrofilikoa handitu zela, eta ondorioz gainazalaren lotura gaitasuna hobetu zela adierazi zuten.



6.4 Irudia. A) lagin guztien XPS espektoak eta B) kontrol aldamiok C) HMW kitosanoa eta D) LMW kitosanoa duten kolageno aldamioren C 1s elementuen XPS espektoak.

6.3 Taulan ikus daitekeenez, C-O eta C-N-ri dagokion gailurra % 3,59tik % 6,93ra igo zen LMW laginetan, eta % 8,18ra HMW laginetan; hau kolageno eta kitosanoa hidroxilo eta aminoazidoen arteko interakzioei egotzi zitzaion. Gainera, lotura peptidikoiei dagokien gailurraren azalera erlatiboa % 5,89tik % 6,21era igo zen LMW aldamiok eta % 7,51ra HMW aldamiok, segur aski kolagenoaren eta kitosanoaren talde polarren arteko hidrogeno zubien ondorioz. Gainera, O 1s eta N 1s-ren azalera erlatiboak ebaluatu ziren. Gainera, O 1s espektoak 531,9 eV-etako gailur batera doitu ziren, O=C=O/O=C-N-ri egotzia. Seinale hau % 12,73koa izan zen kontrol aldamiok eta % 13,79 eta % 15,84-ra handitu zen LMW eta HMW laginetan, hurrenez hurren. Ehuneko hori oso garrantzitsua da, oxigenoak ingurune biologikoen egonkortasunean eragina baitu (Wang et al., 2016).

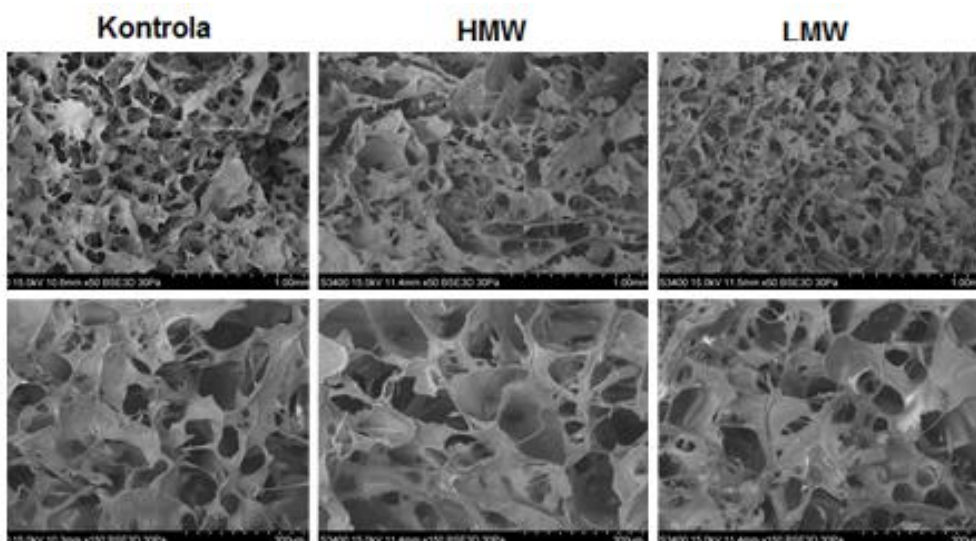
6.3 Taula. Kontrol-aldamio eta HMW eta LMW kitosanoa duten kolageno-aldamioen XPS espektro-gailurren azalera (%).

Laginak	C-C/C-H 284,6 (eV)	C-O/C-N 285,9 (eV)	O=C-NH ₂ 288,1 (eV)	C=N/C-N 399,7 (eV)	O-C=O/O=C-N 531,9 (eV)
Kontrola	75,98	3,59	5,89	1,81	12,73
HMW	69,11	6,93	6,21	3,96	13,79
LMW	64,93	8,18	7,51	3,54	15,84

6.2.5 Ekorketa elektroik mikroskopia (SEM)

Mikroporositate homogeneoa ehun-ingeniaritzako aplikazioetako aldamioetarako funtsezko ezaugarria denez, SEM analisia burutu zen aldamioen morfologia aztertzeko.

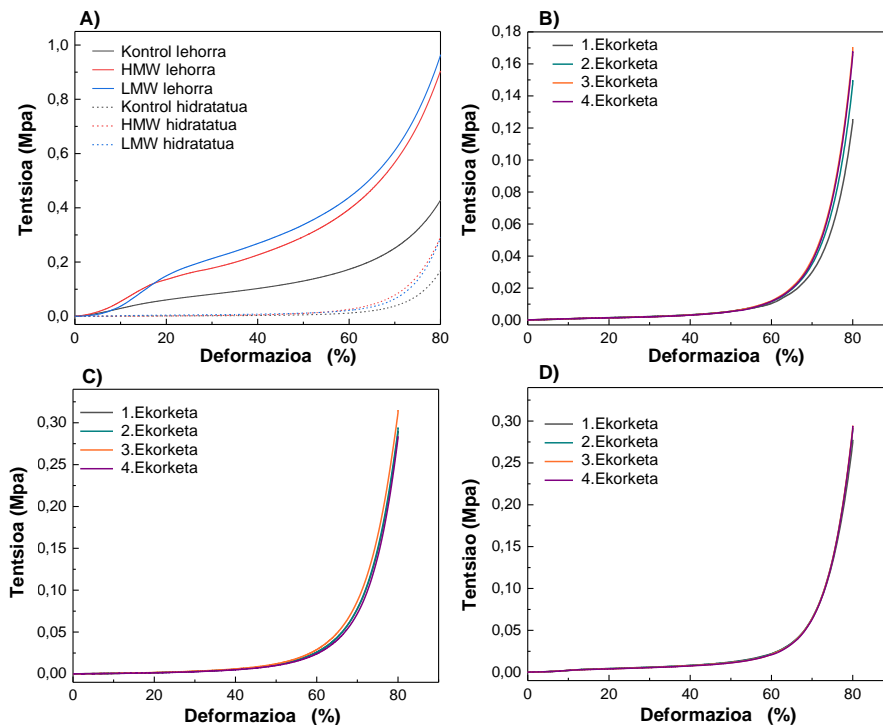
6.5 Irudian ikus daitekeen bezala, kolageno aldamioek era uniformean banatutako hiru dimentsiotako poro erretikulatuzko egitura aurkeztu zuten. LMW aldamioak HMW aldamioak baino banaketa homogeneoagoa eta poro-tamaina erregularragoa zuten. Emaitza horiek, pisu molekular txikiagoak kitosanoaren eta kolageno-kateen arteko interakzioak erraztu zituen, eta honen ondorioz, poro txikiagoak sortu ziren. Emaitza hauek, kitosano-kolageno aldamioek ehun-ingeniaritzako aplikazioetan zelulak hazteko poroen distribuzio ideala eta dentsitate uniforme dutela iradoki zuten (Las Heras et al., 2020).



6.5 Irudia. Kontrol aldamio eta HMW eta LMW kitosanoa duten kolageno-aldamioen SEM irudiak, x50 (goikoa) eta x150 (behekoa).

6.2.6 Konpresio-saiakuntza

Aldamioek elongazio-gaitasuna, malgutasuna eta trakzio-erresistentzia bezalako propietate mekanikoak behar dituzte, jatorrizko ehunak imita dezakeen 3D hazkuntza-norabideko egitura ezin hobea izateko. Aldamioak *in vivo* giroan hidratatuak egoten direnez, baliteke konpresio-propietateak egoera hidratatuan garrantzitsuagoak izatea, eta, beraz, aldamio hidratatuen erresistentzia- eta modulu-balioak ere neurtu ziren. **6.6A Irudian** ikus daitekeenez, estres-deformazio kurbak konpresio-kurba tipikoekin bat zatozen, eta eskualde elastikoak eta plastikoak aurkeztu zituzten. Zehazki, aldamio lehor eta hidratatuen esfortzu-kurbak hiru etapatan eman ziren: fase elastiko lineala (deformazioa < % 5), kolapso konstanteko meseta-fasea (% 15 < deformazioa < % 50) eta dentsitate handitze nabarmeneko fasea (deformazioa > % 55). Aplikazio biomedikoetan, interes handieneko tentsio-deformazio eremua deformazioaren % 0-10 bitartekoa da, eta, beraz, sekzio hori aukeratu zen modulu elastikoa zehazteko.



6.6 Irudia. A) Aldamio lehor, B) aldamio hidratatuak, C) HMW kitosanoa duten kolageno aldamio hidratatu, eta D) LWM kitosanoa duten kolageno aldamioen konpresio bidezko tentsio-deformazio kurbak.

Espero bezala, alde nabarmena ikusi zen aldamio lehor eta hidratatuen konpresio-moduluen balioen artean, baina bi kasuetan moduluak handitu egin ziren kitosanoa gehitzean, **6.4 Taulan** ikus daitekeen bezala. Era berean, konpresio-erresistentzia nabarmen handitu zen kitosanoa aldamioren formulazioan sartu zenean. Alde horretatik, azpimarratu behar da aldamio lehorrak ez zutela tamaina berreskuratu konpresio-probaren ondoren; aldamio hidratatuek, berriz, bai. Gainera, kitosanoa zuten aldamiok ez zuten alderik erakutsi egindako lau ekorketen artean (**6.6C** eta **D Irudiak**); kontrol-aldamiok, berriz, konpresio-erresistentzia balioa handitu zuten ekorketa bakoitzaren ondoren (**6.6B Irudia**). Kitosanoa zuten kolageno-aldamioren konpresio bidezko portaera mekaniko hori bi biopolimeroen arteko interakzioen bidez azaldu zen, FTIR-en emaitzek erakusten duten moduan.

6.4 Taula. Kontrol aldamioren eta HMW eta LMW kitosanoa duten aldamioren modulu elastikoa eta konpresio deformazioa.

Laginak	E (MPa)		σ (MPa)	
	Lehorra	Hidratatua	Lehorra	Hidratatua
Kontrola	0,122 ± 0,002	0,006 ± 0,001	0,430 ± 0,03	0,170 ± 0,021
HMW	0,563 ± 0,011	0,013 ± 0,003	0,951 ± 0,041	0,294 ± 0,012
LMW	0,423 ± 0,013	0,018 ± 0,004	0,965 ± 0,049	0,291 ± 0,008

6.2.7 Degradazio azterketa

PBS eta kolagenasa-soluzioaren eraginpean biomaterialak duen portaera ebaluatzeko degradazio-azterketak egin ziren (**6.5 Taula**). Degradazio hidrolitikoari dagokionez, kontrol-aldamioak ez ziren degradatu. Hala ere, kitosano-kolageno aldamiok, masa totalaren % 10 baino gehiago degradatu ziren 4 egunez murgilduta eduki ondoren. LMW kitosanoa duten kolageno-aldamiok aurkezten zuten HDD balio altuena, lagin horien hidrofilia handienarekin lotuta egon daiteke, XPS analisiak erakusten duen bezala.

6.5. Taula. Lau egun pasa ondoren, kontrol aldamiok eta HMW eta LMW kitosanoak duten aldamioren degradazio hidrolitiko (HDD) eta enzimatikoa (EDD) maila.

Laginak	HDD (%)	EDD (%)
Kontrola	0	100
HMW	10,6 ± 1,8	55,8 ± 1,6
LMW	15,1 ± 0,4	44,4 ± 4,4

Kolagenasaren eraginpean, kontrol-aldamioek erabateko degradazioa izan zuten; kolageno-kitosano aldamiok, berriz, % 50 inguruko degradazioa izan zuten, 4 egunez murgilduta eduki ondoren. Izan ere, kolagenasak kolageno natiboa degradatu egiten du molekularren eremu polarrean (Gly-Pro-Y)_n sekuentzia itu izanik; kitosanoa, berriz, glukosamina-glukosamina, glukosamina-N-azetil-glukosamina eta N-azetil-glukosamina-N-azetil-glukosamina loturak hidrolizatzen dituen entzimek soilik degradatu dezakete, hala nola kitinasa eta lisozimak (Kean eta Thanou, 2010). Beraz, kitosanoak kolagenasaren bidezko degradazioari aurre egiteko kolagenoaren gaitasuna hobetu zuen, entzimaren ekintza eragotziz (Ma et al., 2019). LMW kitosanoa zuten kolageno-aldamioren EDD balio txikiak kolagenoaren eta kitosanoaren arteko erretikulazioarekin lotuta egon liteke. Oro har, pisu molekular txikiagoa izateak kolagenoaren eta kitosanoaren arteko interakzioak erraztu, eta horrek erretikulazio-maila handiagoa eta poro-tamaina txikiagoa izatea eragin zuen, SEM irudietan ikusten den bezala, eta horrek entzimen degradazioa zailduz. Azterketa honek, aldamioren formulazioan kitosanoa sartzearen abantailak erakutsi zituen, aldamioren bioegonkortasuna hobetu, biodegradazioa luzatu eta aplikazio biomedikoetan erabil zitekeela berretsiz.

6.3 ONDORIOAK

Kolageno-aldamioren garapenean parte hartzen duten prozesu nagusien ingurumen-inpaktua ebaluatzeko helburuarekin egindako ingurumen-ebaluazioak, ingurumen-karga handiena irabiatze mekanikoko eta lehortze-prozesuek zutela erakutsi zuen. Kolagenozko biomaterialen ekoizpenaren eskala handitzeak eragin horiek

nabarmen murriztu lituzkeen arren, ikerketa gehiago beharko liritezke erabilitako baldintzak optimizatu eta prozesu horietan kontsumitutako energia murrizteko. Aldamioen propietate fisiko-kimikoei dagokienez, FTIRaren emaitzek, kolagenoaren eta kitosanoaren arteko interakzioak hidrogeno zubien bidezko interakzio fisikoak izan zirela erakutsi zuten; eta horrek, kolageno natiboaren helize hirukoitzeko egitura egonkortzen lagundu zuen. Gainera, aldamio gainazalaren izaera hidrofilikoa indartu zen, biomaterialetan zelulen atxikimendua eta ugaritzea sustatzeko propietate onuragarria izanik. Era berean, LMW kitosanoa zuten aldamioen morfologiak poro txiki eta distribuzio homogeenagoak aurkeztu zituen. Aldamio horiek degradazio-tasa kontrolatuagoa erakutsi zuten kolagenasaren eraginpean, bioegonkortasuna hobetuz.

7. kapitulua

TETRAHIDROKURKUMINADUN KOLAGENO ALDAMIOAK

3D inprimaturiko kolageno aldamio muki-itsasgarriak
tetrahidrokurkuminaren askapen lokalizatuko sistema gisa

7.1 LABURPENA

Kolageno natibo oreak, xiringadun 3D estrusio-inprimaketaren bidez prozesatu ziren, kolagenozko aldamiok lortzeko. Prozesatu aurretik, kolageno oreen propietate erreologikoak aztertu ziren, 3D inprimaketaren baldintza hoberenak zehazteko. Laginek portaera pseudoplastiko handia erakutsi zuten, eta hori onuragarria izan zen 3D inprimatze-prozesuan. Horretaz gain, tetrahidrokurkumina (THC) sartu zen ore formulazioan, eta kolagenoaren egitura duen eragina ebaluatu zen, bai eta aldamiok zaurien sendatze aplikazioetarako egokiak diren ere. DSC analisiaren bidez hauteman ziren desnaturalizazio-gailurrek zein SEM irudiek, kolagenoaren zuntz egitura mantendu zela erakutsi zuten. Emaiza horiek, XRD emaitzekin korrelazionatu ziren. Kolageno kateen albo-trinkotzearen handitzea azaldu zuten THC-a edukia % 4koa izan arte, eta eduki handiagoek nabarmen gutxitu zuten kolagenoaren egitura-ordena. Gainera, FTIR analisisien bidez, kolageno eta THC molekulen arteko interakzio fisikoak hauteman ziren. Horretaz gain, lagin guztiek ur-xurgapen ahalmena eta THC-aren askapen kontrolatua erakutsi zuten. Emaiza horiek kolagenoaren propietate muki-itsaskorrekin batera, kolageno-aldamiok THC-ren askapeneko sistema sostengatu gisa erabil zitezkeela iradoki zuten.

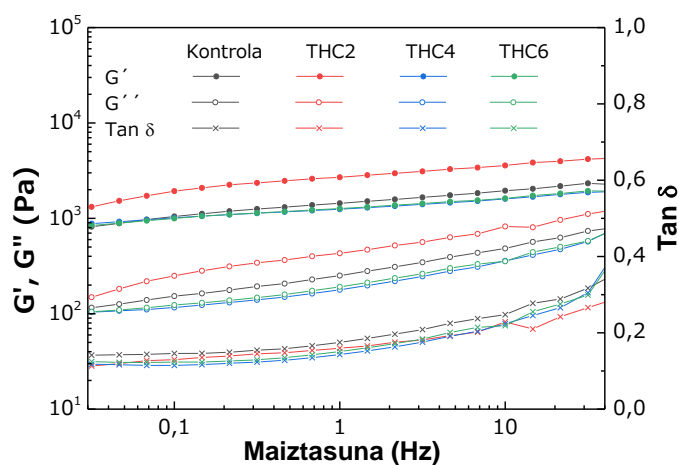
7.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

7.2.1 Propietate erreologikoak

3D inprimatze-prozesua aztertu eta diseinatzeko, propietate erreologikoak ezagutu eta kontrolatzea oso garrantzitsua da (Corker et al., 2019). Hala, esfortzu-ekorketa, maiztasun-ekorketa eta fluxu-probak egin ziren propietate erreologikoak 3D inprimaketaren aurretik aztertzeko. Lehenik eta behin, esfortzu-probak egin ziren THC-kolagenoaren biskoelastikotasun linearraren (LVR) tartea zehazteko eta, ondoren, maiztasun-ekorketa probak LVRren barruan egin ziren. Emaizak **7.1 Irudian** ageri dira. Lagin guztietan izaera elastikoa nagusitu zen, aztertutako tartean biltegitarte-modulua

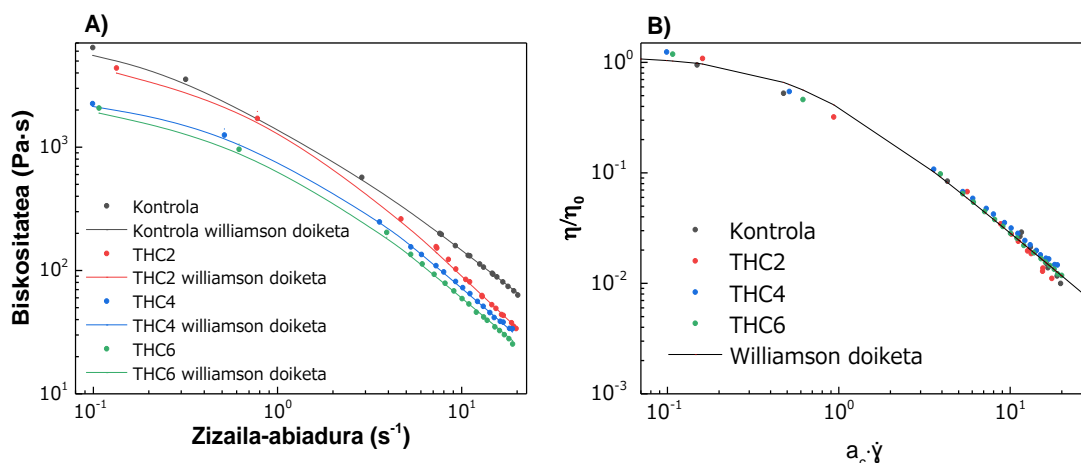
7. TETRAHIDROKURKUMINADUN KOLAGENO ALDAMIOAK

(G') galera-modulua (G) baino handiagoa izan baitzen (Zuidem et al., 2013). Gainera, galera-moduluan maiztasunarekiko mendekotasun txiki bat hauteman zen; biltegitratze-modulua, berriz, ia konstante mantendu zen, eta sistemaren egonkortasuna frogatuz. Esan beharra dago kolageno-sarearen egitura ez zela kolapsatu, ez baitzen G' eta G'' arteko bidegurutze-punturik ikusi. Izaera hau bat dator proteinetan oinarritutako hidrogelei buruzko hainbat azterketatan ikusitako ohiko erantzunarekin (Machado, Martins eta Plepis 2002; Yang et al., 2018). Horretaz gain, hidrogelak ez zuen izaeran alde nabarmenik erakutsi THC gehitzean, formulazio guztietan $\tan \delta$ (G''/G') balio antzekoak lortu baitziren. Halaber, masaren inprimagarritasuna, beharrezko gutxieneko presioaren arabera ebaluatu eta galera-tangentea erabiliz modeliza daiteke. Azterketa honetan aurkitutako galera-tangente balioak 0,15 eta 0,40 bitartekoak izan ziren, inprimagarritasun ona iradoki zuten beste azterketa batzuen 0,25 eta 0,45 arteko galera-tangente balioen antzeko emaitzak lortuz (Lee et al., 2021).



7.1 Irudia. Laginen maiztasun-ekorketa testaren bidez lorturiko biltegitratze-modulua (G'), galera-modulua (G''), eta galera-tangentea ($\tan \delta$).

3D inprimaketarako biskositatea, pitan zehar estrusio erraza ahalbidetzeko bezain txikia eta aurretik metaturiko geruzarekin kohesioa izan eta forma mantentzeko adinakoa izan behar du (Lille et al., 2018). Beraz, THC–kolageno laginen fluxu-portaera aztertu zen, eta zizaila-abiadurarekiko itxurazko biskositateen mendekotasuna **7.2A Irudian** azaltzen da.



7.2 Irudia. A) Williamson eredura doitutako THC kopolimeroaren fluxu-kurbak. B) Williamson eredura doitutako kolageno-oreen fluxu-kurba nagusia, THC edukiaren mendeko aldaketa bat egin ondoren (η_0 , a_c), kontrol-lagina erreferentzia gisa erabiliz.

Lagin guztiek antzeko biskositate-patroia (η) erakutsi zuten fluido ez-newtondarren egoeran, zizailaduragatik fintzen diren portaerarekin eta zizaila-abiadura baxuetan eskualde newtondarra lortzeko joerarekin (meseta newtondarraren eremua); beraz, zizailadura zero deneko biskositatea kalkulatu zen (η_0) (Wu, Gray eta Chen, 2018). Zizailadura zero deneko biskositatea, materiala atsedenean dagoenean duen biskositateari deritzo. Balio mugatzaile hori ezin da zuzenean neurtu, eta estrapolazioaren bidez zenbatetsi behar da, datuak eredu batetara egokituz. Lortutako fluxu datu esperimentalak Williamson-en eredura (**2.5 sekzioa**) egoki doitu ziren ($R^2 > 0,996$), eta lortutako doikuntza-parametroak **7.1 Taulan** jaso dira. Zizailaduragatik fintze izaerak, fluxu abiadura handitzean geruzen arteko zizailadura-tentsioak kolageno kateetan eragin eta, hala, haien arteko indarra murriztu dela adierazten du (Peralta, Meza eta Zorrilla, 2017). Portaera hau, solido jokaera duen materialen 3D inprimatze-prozesurako onuragarria izan zen, pitan zeharreko estrusioa errazten baitu (Alproli-Castillo et al., 2021; Guo, Zhang eta Devahastin, 2020). **7.1 Taulan** ikus daitekeenez, lagin guztiek fluxu-indizearen balio nahiko txikiak erakutsi zituzten ($n < 0,42$), eta laginen zizailadura bidezko fintze izaera berretsi zuten (Moreira, Chenlo eta Torres, 2012). Gainera, THC edukia handitu zeneko η_0 jaitsierak, kolagenoaren eta THC molekulen arteko lotura gutxiagoren existentzia azalerazen du (Torres, Hallmark eta Wilson, 2014).

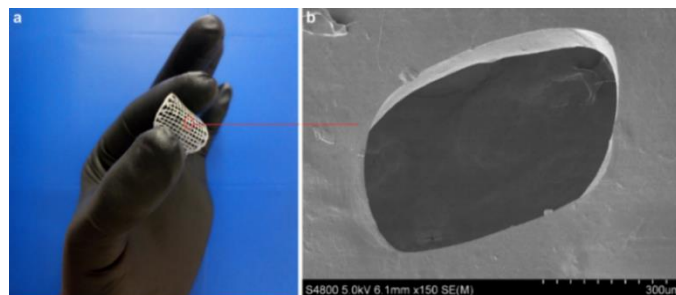
7. TETRAHIDROKURKUMINADUN KOLAGENO ALDAMIOAK

Lagin guztiek zizailadura bidezko fintze jokaera antzekoa erakutsi zuten, kurba bakar batera egokitu zen (**7.2B Irudia**). Aldaketa-faktorea (a_c) kalkulatu eta **7.1 Taulan** sartu zen, non $a_c = 1$ kontrol-laginari esleitu zitzaion. THC4 eta THC6 oreen a_c balioa 1etik 0,67ra murrizteak, THC edukia handitzean orearen trinkotasuna ere igo egiten zela adierazi zuen (Alvarez-Castillo et al., 2021). Zizaila abiadura altuetan behatutako $\tan \delta$ eta biskositate txikiek THC-kolageno oreak erraz xiringa bidez erraz estrusatuko lirartekeela adierazi zuten (Yang et al., 2019).

7.1 Taula. Williamson-en ereduaren parametroak, kurba nagusiaren aldaketa-faktoreak eta kolageno-oreen zizailadura-abiadura balioak.

Laginak	η_0 (Pa·s ⁻¹)	k (s ⁻¹)	n	R ²	a_c	γ_w
Kontrola	6764	2,71	0,15	0,996	1	69,05
THC2	4402	1,51	0,42	0,989	0,80	38,43
THC4	2298	1,37	0,31	0,996	0,67	44,47
THC6	2083	1,57	0,28	0,997	0,67	46,94

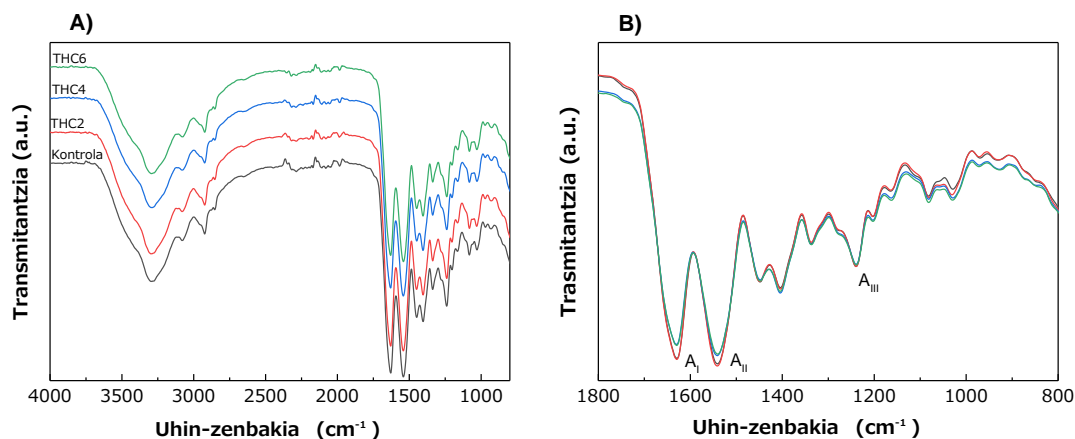
Kolageno oreen fluxuaren portaeraren ebaluazio zehatzagoa egiteko, pita puntako zizaila-abiadura (**2.5 sekzioa**) kalkulatu zen, eta **7.1 Taulan** bildu dira. Oreen zizailadura bidezko fintze jokaera aztertu ondoren, zizaila-abiaduraren balio handiak hautatu ziren; izan ere, kondizio horietan, materialak erresistentzia txikiagoa (biskositate txikiagoa) du eta hobeto jariatzen da. Kurba nagusiaren fluxu-indizea (n) lortu zenez, inprimatze-abiadura Weissenberg-Rabinowitsch-en ekuazioa erabiliz lortu ahal izan zen (**2.5 sekzioa**). 3D inprimatutako aldamiok **7.3 Irudian** ageri dira.



7.3 Irudia. 3D inprimaturiko aldamiok eta gainazalaren SEM irudia.

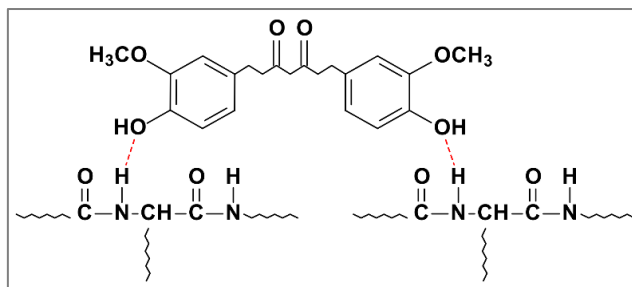
7.2.2 Propietate fisiko-kimiko eta termikoak

Aldamio formulazioko osagaien arteko interakzioak aztertzeko FTIR analisia burutu eta espektroak **7.4 Irudian** azaltzen dira.



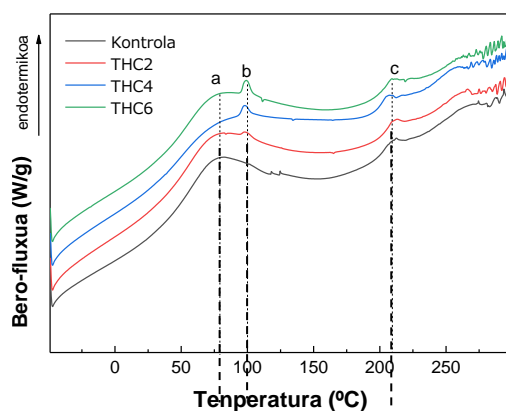
7.4 Irudia. 3D inprimaturiko kolageno aldamioren FTIR espektroak: A) 4000 eta 800 cm^{-1} bitartean eta B) 1800 eta 800 cm^{-1} bitartean.

Espektro guztiek kolagenoak lotura peptidikoari esleitutako xurgatze-banda nagusiak erakutsi zituzten: A amidaren N–H luzatze-bibrazioa, 3287 cm^{-1} -tan; I amidaren C=O luzatzea, 1630 cm^{-1} -tan; II amidaren N-H flexio-bibrazioa; eta III amidaren C-N luzapena, 1540 cm^{-1} . A amidaren banda 3400–3440 cm^{-1} -ko uhin luzera tartean ikusten da normalean, baina bandaren kokapena maiztasun txikiagora mugitzen denean, kolagenoko N–H taldeak hidrogeno zubien bidez lotuta daudela (**7.5 Irudia**) adierazten du, eta horrek kolagenoaren egitura egonkortzen du (Liao et al., 2018). Gainera, THC-a gehitzean amida banden intentsitatea aldatu egin zen, erretikulazioen presentzia adieraziz. Ez zen aldaketa nabarmenagorik hauteman FTIR espektroetan; nahastea prestaketa zein ondorengoko 3D inprimatze-prozesuaren ondoren ere kolagenoak bigarren mailako egituraren nagusitasuna mantendu zuela adieraziz (Campos Vidal eta Mello, 2011).



7.5 Irudia. Kolageno eta THC-aren arteko hidrogeno zubien bidezko interakzioen diagrama eskematikoa.

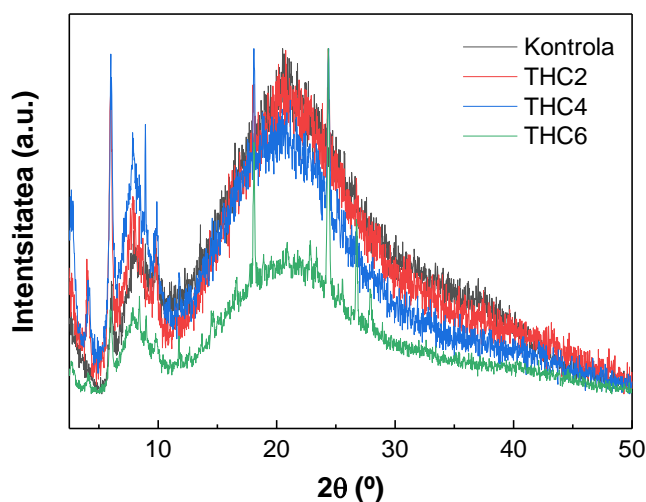
Kolageno-aldamioen portaera termikoa DSC analisiaren bidez aztertu zen. **7.6 Irudian** ikus daitekeenez, lagin guztiek bi gailur endotermiko erakutsi zituzten: lehenengoa, 82 °C ingurukoa, ur libre eta lotura-uraren askapenarekin erlazionatua (Kaczmarek, Sionkowska eta Skopiska-Wisniewska, 2018); eta bigarrena, 210 °C ingurukoa, kolagenoaren desnaturalizazio termikoaren letu zen. Trantsizio honek, helize hirukoitzeko egitura ausazko bobinara bihurtzeko kolagenoak kasandako konformazio-aldaketak adierazi zituen eta egitura-ura askatu zen (Wlodarczyk et al., 2017; Schroepfer eta Meyer, 2017; Shi et al., 2019). Beraz, balio hauek THC gehitu eta 3D inprimatu ondoren kolagenoaren helize hirukoitzeko egiturak zuen lehentasuna berretsi zuten, FTIR azterketan ikusi zen bezala. Gainera, THC zuten laginek THC-ren fusioarekin lotutako gailur txiki bat erakutsi zuten 95 °C inguruan (Kakkar et al., 2018), eta entalpia-balioa handitu egin zen THC edukiarekin.



7.6 Irudia. Kolageno aldamioren DSC termogramak: a) ur libre eta lotura uraren askapena, b) THC-ren fusioa eta c) kolagenoaren desnaturalizazioa.

7.2.3 Propietate morfologiko eta barrera propietateak

THC gehitzeak kolagenoaren egituraren duen eragina zehatzago aztertzeko, XRD eta SEM analisiak egin ziren. XRD analisiari dagokionez (**7.7 Irudia**), lagin guztiek materialen ia guztiz amorfoen XRD ereduak erakutsi zituzten. 7° inguruko gailurra, kolagenoaren helize hirukoitzeko egiturarekin lotua, kolageno kateen arteko paketatze lateralaren distantzia intermolekularra adierazi zuen (Valencia et al., 2019) eta 20° inguruko gailur zabalak, kolageno-zuntzen sakabanatze difusoarekin lotua, kolagenoaren egitura amorfoari zegokion (Zou et al., 2017). THC zuten laginek berriz, THC gailur bereizgarriak erakutsi zituzten 18° eta 24° -an (Rramaswamy et al., 2018). Ikus daitekeenez, lagin guztiek antzeko XRD ereduak erakutsi zituzten, kolagenoaren egitura-ordenaren prebalentzia adieraziz. THC eduki handiagoa gehitu zenean (THC 6), 7° eta 20° -ko intentsitate maximoa txikitu egin ziren, eta horrek kolageno-aldamioen egitura-ordena murriztea egin zela adierazi zuen.

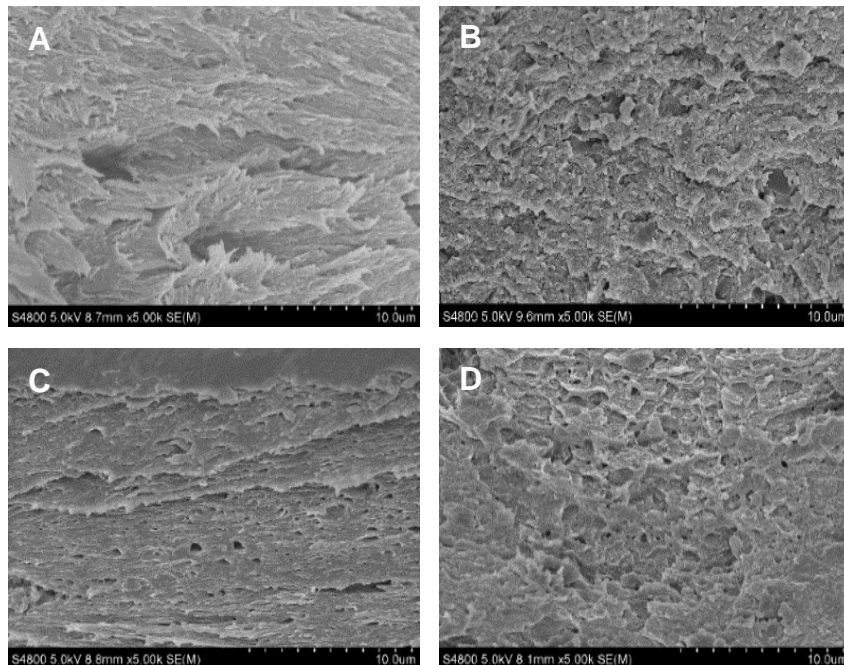


7.7 Irudia. Kolageno aldamioren XRD patroiak.

3D inprimatutako aldamioren morfologia ebaluatzeko eta aldamioren mikroegitura ondo ulertu zela bermatzeko, SEM azterketa egin zen, eta zeharkako sekzioen mikrografiak **7.8 Irudian** azaldu dira. SEM irudiek lagin guztiek antzeko egitura amorfo trinkoa zutela erakutsi zuten. THC edukia pisuaren % 4tik % 6ra igo zenean,

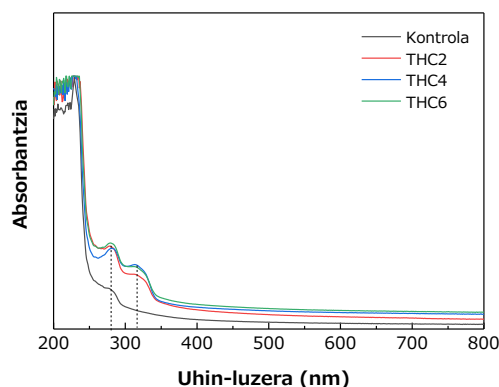
7. TETRAHIDROKURKUMINADUN KOLAGENO ALDAMIOAK

egitura ez hain antolatu bat ikusi zen, XRD emaitzekin bat eginez. Nabarmentzekoa da 3D inprimatutako geruzak ezin direla bereizi eta beraz, laginek geruzen arteko adhesio ona aurkeztu zuten.



7.8 Irudia. A) kontrol, B) THC2, C) THC4 eta D) THC6 filmen zeharkako sekzioaren irudiak.

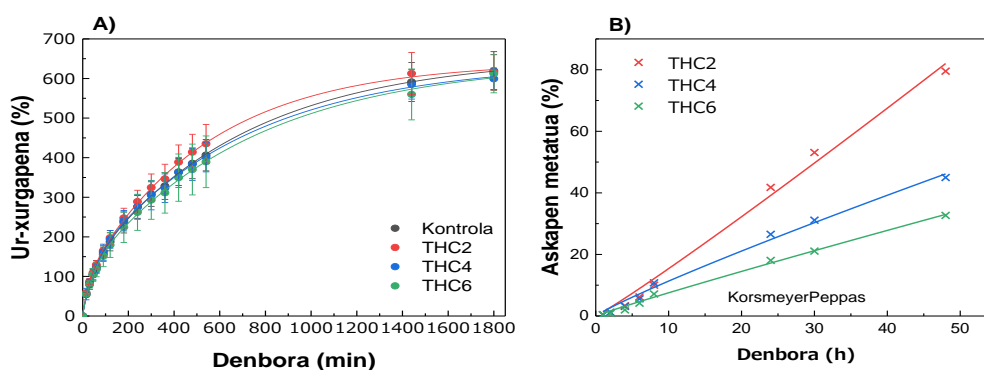
Zaurien apositu gisa izan dezakeen aplikazioa kontutan hartuta, UV-vis espektroskopia burutu zen. **7.9 Irudian** ikus daitekeen bezala, kontrol-laginek kolagenoaren argi-hesi bereizgarria, karbonilo, karboxilo eta amida taldeei lotutako 200 nm-tik 250 nm-ra bitarteko gehienezko absorbantzia zuelarik, eta tirosina eta fenilalanina aminoazidoen kromoforo-taldeekin lotutako 250 eta 280 nm arteko mutur txiki bat erakutsi zuten (Kezwón et al., 2016; Trivedi et al., 2017). THC gehitzean absorbantzia balio zertxobait altuagoak erakutsi zuten argi ikusgaiaren tartean (400–800 nm), eta UV tartean berriz, balioak asko handitu ziren (200–400 nm), 280 nm inguruko THC absorbantzia-gailurra eta bere 310 nm-ko besoa zela eta (Adriani, Rahayu eta Saeahln, 2020). Gainera, 210 nm inguruko absorbantziaren igoera, THC fotooxidatuekin lotuta egon zitekeen (Castellan et al., 2007). Hala ere, ez zen alde nabarmenik hauteman THC gehitzean.



7.9 Irudia. Kolageno aldamioren UV-vis espektroak.

7.2.4 Ur-xurgapen (WU) ahalmena eta THC askapena

Ur-xurgapen ahalmen neurketak egin ziren, THCa aldamioren ura xurgatzeko ahalmenean duen eragina zehazteko. WUren emaitzek kolageno-aldamioek ur-molekula kopuru handi bati eusteko ahalmena zutela erakutsi zuten. **7.10A Irudian** ikus daitekeen bezala, THC kontzentrazioak ez zuen WUren ahalmenean eragin nabarmenik izan, balioak % 600 ingurukoa izanik. WU balioen etengabeko hazkuntza 1880 minutura arte gertatu zen, oreka baliora iritsi zen arte, hain zuzen ere. Azpimarratzekoa da, aldamioak egonkorak izan zirela eta osotasuna mantendu zutela azterketak iraun zuen bitartean.



7.10 Irudia. THC-kolageno aldamioren ur xurgapen ahalmena eta THC-ren askapena.

Kolageno-aldamioetatik THC askapena ebaluatu zen, garraiatze dinamika zehazteko. **7.10B** Irudian ikus daitekeenez, lagin guztiek sendagaien askapen sostengatua erakutsi zuten, eta THC2, THC4 eta THC6tik % 82, % 45 eta % 33 THC askatu ziren, hurrenez hurren. Esan beharra dago ez zela sendagaien askapenaren

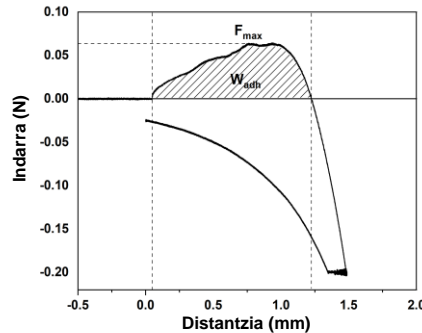
hasierako leherketarik ikusi, segur aski FTIR analisiak iradokitako kolageno eta THC-aren arteko hidrogeno zubien bidezko interakzioen ondorioz (**7.5 Irudia**), eta SEM mikrografietan ikusitako egitura trinkotasuna dela eta. Askatze iraunkorragoa lortzeko, egokiena THC6 aldamia izan zitekeen.

Askatze-mekanismoa hobeto ulertzeko, THC-ren askapen-datu esperimentalak Korsmeyer–Peppas eredura doitu ziren eta zenbatetsitako parametro zinetikoak **7.2 Taulan** jaso dira. Ikus daitekeenez, askatze-datuak Korsmeyer-peppa ereduraondo egokitu ziren, R^2 -ren balioak 0,9900 baino handiagoak baitziren. n -ren balioak konposatu aktiboa matrizezik nola askatzen den adierazten du. Azterketa horretan, n -ren balioak 0,89tik gorakoak izan ziren, eta horrek THCren askapena kontrolatzen duen askapen-mekanismoak II. kasukoa dela adierazten du (Abubakr, Lin eta Chin, 2009). Emaitza horiek bereziki interesgarriak dira; izan ere, II. kasuko askapena kolageno-kateen erlaxazio bidezko polimero sistema kristalino hidrofiliakoaren xurgapenaren bidez guztiz kontrolatuta dago, eta horrek botikak garraiatzeko mekanismoa denborarekiko independentea zela adierazten zuen (Supramaniam et al., 2018; Vigata et al., 2020).

7.2.5 Muki-itsasgarritasun propietateak

Kolageno-aldamio horiek zauriak tratatzeko erabil daitezkeela kontuan hartuta, itsasgarritasun ona funtsezkoa da aldamia geldik mantentzeko, hau da, sendagai-askapen gailua, gune jakin bateko ardazturiko askapena eta sendagaien garraio optimoa emateko. Muki-itsasgarritasuna polimeroaren eta mukiaren arteko atxikidurari esaten zaio, eta horretarako, haien arteko kontaktu intimoa beharrezkoa da (Boddupalli et al., 2010). Azterketa horretan, kolageno aldamio hezeak txerri-urdaileko II. motako muzinarekin kontaktuan jarri eta bere muki-itsaskortasun propietateak neurtu ziren. **7.11 Irudian** ikusi daitekeen bezala, kurben gailurrak zunda eta muzina bereizteko behar den indar maximoa (F_{max}) da; zunda muzinatik bereizte prozesuan parte hartzen duten indarren kopuru osoa, berriz, atxikitze-lana da (W_{adh}) eta indarra versus distantzia-

kurbaren azpiko azalera kalkulatuaz neurtzen da (Thirawong et al., 2007). Azterketa honetan neurturiko aldamioguztiek itsasgarritasun-indar positiboak erakutsi zituzten eta, beraz, mukiaren eta kolagenoaren artean atxikitze-moduren bat gertatu zen. **7.11 Irudian** THC duten kolageno-aldamioen karga versus deformazio-kurba adierazgarriak. Muki-itsasgarritasun saiakera guztiek antzeko emaitzak aurkeztu zituzten.



7.11 Irudia. Aztertutako kolageno-aldamioen karga versus deformazio kurba karakteristikoa. THC 2 aldamiola.

Lagin guztietan hautemandako muki-itsaskorren propietate onak, muzinaren eta kolagenoaren arteko elkarreragin fisikoen ondorio ziren, hala nola hidrogeno zubi eta Van der Waals erakarpen indarrak. Indar horiek, kolagenoko aminoazido-hondarrekin lotura dute, hidrogeno zubiak eratzen baitituzte muzinaren glikoproteinekin (Soe et al., 2020). Kolagenoaren eta mukiaren arteko interakzion ahulen ondorioz, bereizketa erresistentziak neurrizkoak izan ziren. Sortutako indarrak, nagusiki, mukiak kolagenoaren inguratzearengatik edo mukiak kolageno-arrakaletatik sartzeari mekanikoki sartzeari ondorioz sortu ziren. Bereizketa gertatu zenean, kolagenoa ia muki-geruzatik irten zen, muzina kolagenoarekin bat egingo ez balu bezala.

7.3 Taulan ikus daitekeenez, F_{max} eta W_{adh} -en antzeko balioak ($P > 0,05$) aurkitu ziren. THC edukiak ez ziren kolageno-aldamioen F_{max} eta W_{adh} balioei eragin. Nabarmentzekoa da erabilitako analisi-motaren eta proba-baldintzen arabera erantzun desberdinak lor daitezkeela. Gainera, kolageno puruaren muki-itsasgarritasuna ez da oso aztertua izan, eta, beraz, ez da konparazio-daturik aurkitu (Bassi da Silva et al.,

2018). Beraz, txosten honen emaitzek hautagai bioitsaskor hauen propietateei buruzko gogoeta-bide berriak ireki beharko lituzke, nahiz eta lan gehiago behar den hauek zauriak sendaketan izan dezaketen aplikazioa sustatzeko.

7.3 Taula. Kolageno-aldamioen muki-itsasgarritasun ezaugarriak, bereizketa-indarraren (F_{max}) eta atxikitze-lanaren (W_{adh}) arabera.

Laginak	F_{max} (N)	W_{adh} (N·mm)
Kontrola	0,0652 ± 0,0035 ^a	0,0492 ± 0,00304 ^a
THC2	0,0672 ± 0,0020 ^a	0,0475 ± 0,00203 ^a
THC4	0,0681 ± 0,0020 ^a	0,0494 ± 0,00303 ^a
THC6	0,0699 ± 0,0030 ^a	0,0485 ± 0,00233 ^a

^{a-d}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ezberdinak Turkey-ren frogaren arabera ($P > 0,05$).

7.3 ONDORIOAK

3D inprimaketaren bidez, zaurien sendatze lokalizaturako potentziala duten THC-aren askapen kontrolatuko kolageno-aldamioak garatu ziren. Laginak, kolageno-kontzentrazio handiarekin (200 mg/mL) prestatu ziren eta analisi erreologikoak 3D inprimaketarako fluxu-portaera egokia erakutsi zuen. SEM eta XRD analisisetan ikusten den bezala, THC-aren inkorporazio eta 3D inprimaketa-baldintzek ez zuten kolageno natiboaren helize hirukoitzeko egituraren eragin, nahiz eta FTIR analisiak, kolagenoaren eta THCaren arteko interakzio fisikoak iradoki. Ur-xurgapen ahalmen handi, THC-ren askapen sostengatu eta propietate mukoitsaskorrek, THC-a duten kolageno-aldamioak zaurien sendatze aplikazioetarako hautagai potentziala bihurtzen dute. Alde horretatik, % 6ko THC edukia duen lagina hobetsi daiteke bioaktiboaren askapen sostengatuago batetarako. Etorkizuneko lanetan, aldamioaren egonkortasuna ebaluatzeko *in vitro* saiakuntzak egingo dira zelula-hazkuntzako baldintzetan, baita zelulen bideragarritasuna, atxikidura eta hedapena ere. Gainera, aldamio horien eragin terapeutikoa eta zaurien sendatze prozesuen sustapenean duten potentziala erakusteko, *in vivo* probak egingo dira.

8. kapitulua

ZnO NANOPARTIKULADUN KOLAGENO FILMAK

Disoluzio metodoaren bidez prestatutako propietate elektro-eroaleak dituzten ZnO nanopartikuladun kolageno filmak

8.1 LABURPENA

Behi larruzaletik lortutako kolagenoa mekanikoki tratatu zen kolageno natiboaren estruktura hirukoitza mantentzeko helburuarekin. Horretaz gain, filmaren eratze formulazioan ZnO nanopartikulak gehitu ziren, aplikazio biomedikoetarako duten berezko propietate biologikoak direla eta. DMA kurbetan ikus daitekeen bezala, film guztiek propietate mekaniko onak erakutsi zituzten, portaera elastikoa nagusi zelarik eta manipula errazak ziren, bai egoera lehor zein hezean. Nabarmendu beharra dago, kimikoki trataturiko kolagenoekin alderatuz, film hauek egitura osotasuna mantendu zutela inongo erretikulatzaile kimikorik erabili gabe, ez baitute desnaturalizaziorik pairatzen. FTIR analisiaren bitartez, kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura mantentzen zela ikusi zen, nahiz eta ZnO NP edukia gehitzean balio jaitsiera txikia ikusi; honek, ur-xurgapen gaitasunaren oreka puntuko balioa handitu eta DSC analisisan, 200 °C gainera kolagenoaren desnaturalizazio gailurrean zenbait aldaketa eragin zituelarik. Horretaz gain, kolageno filmek hesi-propietate onak aurkeztu zituzten, argi ultramorearekiko babesa eta zaurien sendatzea bezalako erabilera biomedikoetarako ur lurrunarekiko iragazkortasuna (WVP) balio optimoak (okluzibitatea) erakutsiz, neurtutako WVP balioek exudatuaren absortzioa ahalbidetzen baitute. Propietate elektrikoei dagokienez, kolageno filmek erdieroale portaera eta memoria propietateak erakutsi zituzten, beraz film hauek biosensore bezala erabili daitezke.

8.2. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

8.2.1 Aminoazido konposizioa

Behi larruazaleko kolageno natibo eta trataturiko kolagenoaren aminoazido konposizioa identifikatzeko, analisi elementala burutu zen eta **8.1 Taulan** azaldu dira aminoazido hondarren bakoitzaren kantitateak. Glizina izan zen bi kolagenoetako aminoazido ugariena, prolina eta alaninak jarraituz. Prolina eta hidroxiprolina edukia, % 22,1ekoa zen kolageno natiboan eta % 22,6koa tratatutako kolagenotan. Horretaz gain,

8. ZnO NANOPARTIKULADUN KOLAGENO FILMAK

bi kolagenoetan, histidina, lisina eta hidroxilisina hondarrak % 3,7koak ziren eta ez zen zisteinarik aurkitu, kolagenoan triol talderik ez zela aurkezten adieraziz.

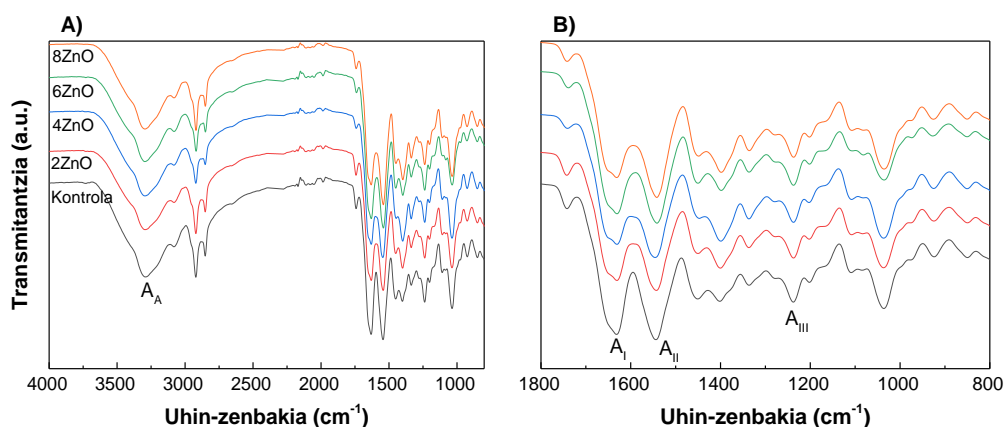
Amino azido analisiaren arabera, glizina da filmen aminoazido hondarrik ugariena, kolageno natiboan zein trataturiko kolagenoan. Glizina denez aminoazidorik txikiena, proteinaren sekuentzian zehar duen errepikapenak kateen paketatze estua ahalbidetzen du (Piez, 1984). Izatez, prolina eta hidroxiprolina kantitate handiek, kolagenoaren integritatean rol garrantzitsua jokatzen dute, kolagenoaren α -kateen artean hidrogeno zubiak osatuz eta errotazioa ekidinez (Ramachandran, 1988). Gainera, prolina eta hidroxiprolinak, pirrolidina eraztuna dute, kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura indartuz (Minh et al., 2014; Pal eta Suresh, 2017). Hau horrela, aminoazido analisiak, buruturiko tratamenduaren ondoren helize hirukoitzeko egituraren egonkortasuna ia bere osotasunean mantendu zela adierazi zuen. Izan ere, jakina da hidrogeno zubiek proteinen bigarren mailako egitura eratze eta egonkortasunean eginkizun garrantzitsua duela.

8.1 Taula. Behi larruazaleko kolageno natiboa eta tratatutako kolagenoaren aminoazido konposizioa (hondarrak/1000 hondarrak bezala adierazia).

Amino azidoa	Kolageno natiboa	Kolageno tratatua
Az. aspartikoa	45,3	44,8
Treonina	16,1	15,9
Serina	37,0	36,8
Az. glutamikoa	72,5	73,0
Glizina	330,9	331,2
Alanina	109,7	108,9
Balina	18,7	17,8
Metionina	6,0	6,2
Isoleucina	10,3	9,8
Leuzina	28,8	33,8
Tirosina	5,7	6,5
Fenilalanina	15,6	15,9
Hidroxilisina	6,7	6,8
Lisina	25,7	26,4
Histidina	4,5	4,3
Arginina	45,4	45,4
Hidroxiprolina	98,1	93,6
Prolina	122,9	122,8

8.2.2 Propietate fisiko-kimikoak

Filmetako osagaien arteko interakzioak eta kolagenoaren egitura integritatea FTIR analisiaren bidez ebaluatu ziren eta espektroak **8.1 Irudian** ikus daitezke. Espektro guztiek, kolagenoaren lotura peptidikoari esleitutako absortzio-banda bereizgarriak erakutsi zituzten. Konkretuki, amida A, amida I, amida II eta amida III bandak, 3300, 1634, 1544 eta 1238 cm^{-1} -tan aurkitu ziren, hurrenez hurren (Riaz et al., 2018). O-H eta N-H loturen bibrazioari dagokien amida A banda, zeina kolagenoan 3400 cm^{-1} -tan aurkitzen den, 3300 cm^{-1} -tara mugitu zen, kolagenoa, ZnO eta glizerolaren arteko hidrogeno zubien presentzia adieraziz (Duan et al., 2009; Liao et al., 2018).



8.1 Irudia. ZnO NP kantitate ezberdinetako kolageno laginen FTIR espektroak: a) 4000-tik 800 cm^{-1} -ra eta b) 1800-tik 800 cm^{-1} -ra.

Konkretuki, hidrogeno zubi interpeptidikoek, α -helizea eta β -lamina konformazioak bezalako egitura sekundarioak egonkortzen dituzte; eta amida I-ren profila aztertu zen ZnO NPek kolagenoaren egitura sekundarioan duten eragina aztertzeko helburuarekin. Amida I banda, 3 osagai nagusitan bereiz daiteke: 1650 cm^{-1} -tan α -helizea/ausazko bobina eta β -lamina konformazioari dagokion bi banda, 1615-1630 cm^{-1} eta 1680-1700 cm^{-1} -tan (Etxabide et al., 2016). **8.2 Taulan** ikus daitekeen bezala, ZnO NP-en gehitzeak α -helize konformazio edukia gutxitu zuen. Horretaz gain, kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura-osotasun, amida III eta 1452 cm^{-1} banden arteko absortzio ratioaren (A_{III}/A_{1452}) bidez estimatu zen (Shi et al., 2019). **8.2 Taulan**

8. ZnO NANOPARTIKULADUN KOLAGENO FILMAK

ikusten den bezala, A_{III}/A_{1452} ratioa pixka bat txikitu zen, ZnO NP-ek kolagenoaren helize hirukoitzeko estruktura apur bat aldatu zuela berretsiz.

8.2 Taula. Kolageno-ZnO NP filmen amida I bandaren kurba egokitzapenaren azalera (%) eta amida III eta 1452 cm^{-1} -ko banden absortzio ratioa (A_{III}/A_{1452}).

Laginak	β -lamina (%)	α - helizea/ausazko bobina (%)	A_{III}/A_{1452}
Kontrola	36,28	63,72	1,00
2ZnO	36,38	63,62	0,99
4ZnO	38,63	61,37	0,97
6ZnO	40,84	59,16	0,95
8ZnO	42,94	57,06	0,93

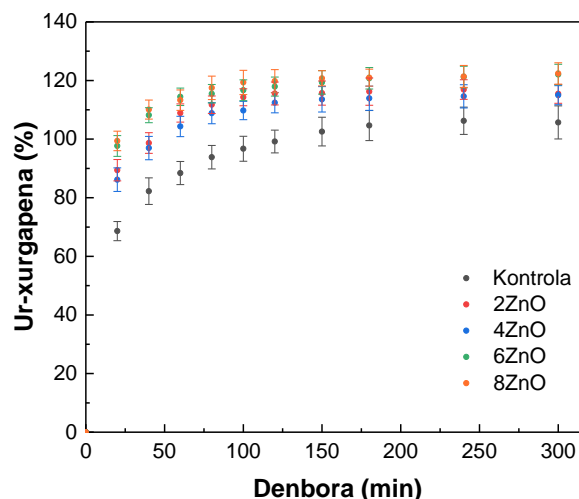
Filmek hezetasun edukia (MC) eta masa galera (ML) ere analizatu ziren eta balioak **8.3.Taulan** daude adieraziak. Alde batetik, film guztiek MC balio baxuak erakutsi zituzten eta ZnO NP edukia % 2,0tik % 0,6ra igotzean, MC balioak jaitsi ($P < 0,05$) egin ziren. Hezetasun edukiaren bariazio txiki hau, ZnO NP-en izaera hidrofobikoarekin lotuta egon zitekeen (Ni et al., 2018). Beste aldetik, masa galera dagokionez, kontrol filmek % 12,9tik 8ZnO filmek % 22,8ra handitu ($P < 0,05$) zen. Kontrol-laginen masa galera glizerolaren disoluzio partzialari egotzi zitzaion. Gainera, masa galera handitzeak, A_{III}/A_{1450} ratioak (**8.2.taula**) erakutsi zuen helize hirukoitz egituraren gutxitzearekin lotu zen, eta horrek glizerola PBS-an errazago askatzea ahalbidetuko luke.

8.3.Taula. Kolageno-ZnO NP filmek, hezetasun edukia (MC) eta masa galera (ML).

Laginak	MC (%)	ML (%)
Kontrola	2,0 \pm 0,3 ^a	12,9 \pm 1,8 ^a
2ZnO	1,0 \pm 0,1 ^b	16,7 \pm 1,1 ^b
4ZnO	0,9 \pm 0,1 ^{bc}	17,3 \pm 1,3 ^b
6ZnO	0,7 \pm 0,1 ^{bc}	22,4 \pm 0,9 ^c
8ZnO	0,6 \pm 0,2 ^c	22,8 \pm 0,8 ^c

^{a-c}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera.

Kontsideratuz kolagenoak zaurien apositu gisa izan dezaketen aplikazioa, ur-xurgapen gaitasunaren testak burutu ziren eta emaitzak **8.2 Irudian** daude adierazirik. Esan beharra dago, lagin guztiek beraien egitura-osotasuna mantendu zutela PBS soluzioan murgildu ondoren. Ur-xurgapena azkar handitu zen lehenengo 30 minututan eta oreka, PBS soluzioan 150 min-tuz murgildua egon ondoren lortu ziren, % 100 ingurukoa izanik kontrol laginetan eta % 130 ingurukoa ZnO NP dituzten laginetan. Ur xurgapen gaitasunak ZnO NP eta kolagenoaren arteko interakzio fisikoak iradoki zituen, FTIR eta ML emaitzekin bat eginez; horrek kolageno kateen arteko tartea handituko luke filmaren xurgatzeko gaitasuna erraztuz. Kolageno filmek hidrogelen propietate bereizgarriak erakutsi zituzten, konposatu bioaktiboak sisteman modu eraginkorrean sartzea ahalbidetuz.

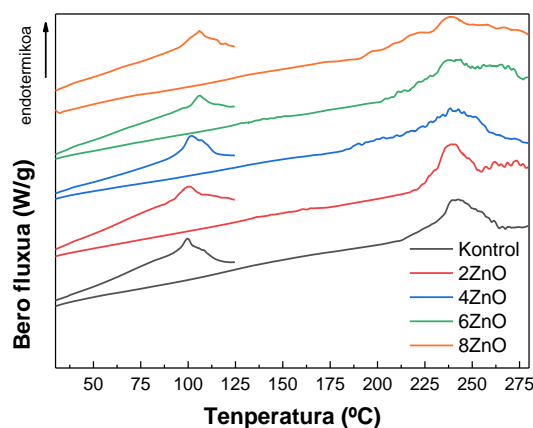


8.2. Irudia. ZnO NP eduki ezberdina duten kolageno filmen uraren xurgapen gaitasuna.

8.2.3 Propietate termikoak

Kolagenoaren desnaturalizazio termikoak kolagenoaren egituraren aldaketak eragiten ditu, zeinak DSC bidez jarrai daitezkeen. Lagin guztiek bi gailur endotermiko azaldu zituzten, **8.3 Irudian** ikus daitezkeen bezala. Lehenengo gailurra, 100 °C inguruan kokatua, ur librearen askapenari dagokio (Miles eta Gelashvili, 1999). Gailur hau temperatura altuagoetan azaldu zen ZnO NP edukia gehitzean, hezetasunaren kantitatea jaitsieraren ondorioz (Rochdi, Foucat eta Renou, 1999), **8.3 Taulan** ikus daitezkeen

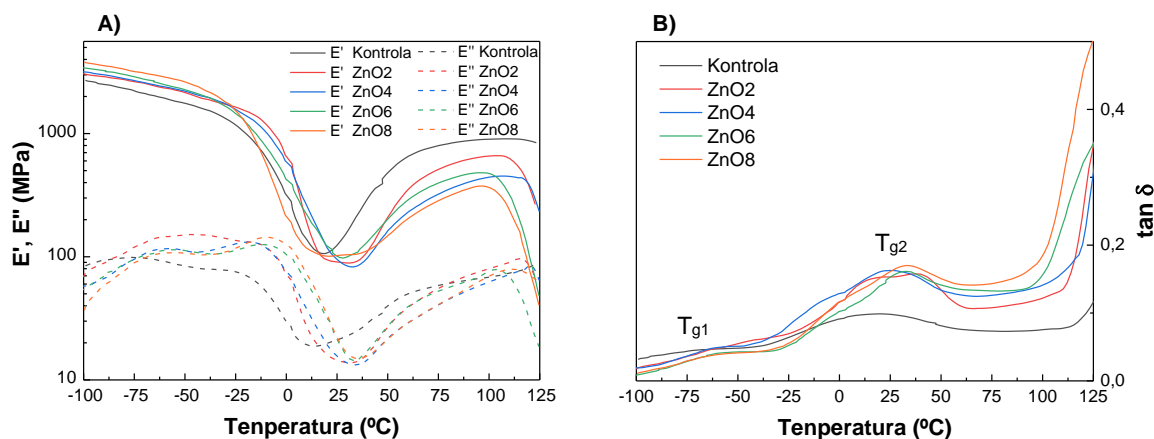
bezala. Bigarren gailur endotermikoa 210 °C eta 250 °C artean agertu zen eta kolagenoaren desnaturalizazioari zegokion (Bozec eta Odlyha, 2011). ZnO NPK gehitzean, desnaturalizazio gailur honen altuera txikitu eta zabalera handitu zen, FTIR analisiaren bidez ikusi zen helize hirukoitzeko egituratik ausazko bobina egiturara gauzatutako konformazio aldaketarekin lotuta zegoelarik.



8.3 Irudia. ZnO NP eduki ezberdineko kolageno filmen DSC termograma.

Kolageno filmen propietate biskoelastikoetan ZnO NPen eragina aztertzeko, DMA analisia burutu zen eta kolageno filmen biltegitratze modulu (E') eta galera moduluaren (E'') temperaturarekiko dependentzia **8.4 Irudian** adierazi da. Orokorrean, biltegitratze modulua (E') gordetako energiarekin dago erlazionatuta, materialaren jokaera elastikoa adieraziz eta galera modulua (E'') berriz, bero moduan disipatzen den energia irudikatzeko erabiltzen da (Guerrero et al., 2019). Filmek, E'' baino E' balio handiagoak erakutsi zituzten temperatura tarte guztian eta beraz, filmen izaera elastikoaren nagusitasuna adierazi xuen. Temperatura igo ahala, laginen modulua jaisten joan zen. Jaitsiera hau geldoa izan zen-10 °C-arte eta ondoren, nabarmena 20 °C arte kontrol laginean, eta 30 °C arte ZnO NP-dun laginetan. Biltegitratze moduluaren murrizketa azkar hau, beira-egoeratik kautxu-egoerako trantsizioari zegokion (Guerrero et al, 2019). Ondoren, 80 °C arte, kolagenoaren helize hirukoitzeko egiturarekin erlazionatuta dagoen moduluaren igoera bat ikusi zen. ZnO NPak gehitzean, biltegitratze- eta galera-moduluaren balio minimoen temperatura igoera horrek, FTIR eta

DSC analisisien (**8.2 Taula**) bidez hautemandako kolageno-ZnO NP interakzioen presentzia berretsiz. Gainera, balio minimoa lortu ondoren, biltegitratze- eta galera-moduluen igoera moteldu zen 6ZnO eta 8ZnO motako filmetan, FTIR analisisiek erakutsitako helize hirukoitzeko egituraren murrizketaren ondorioz.



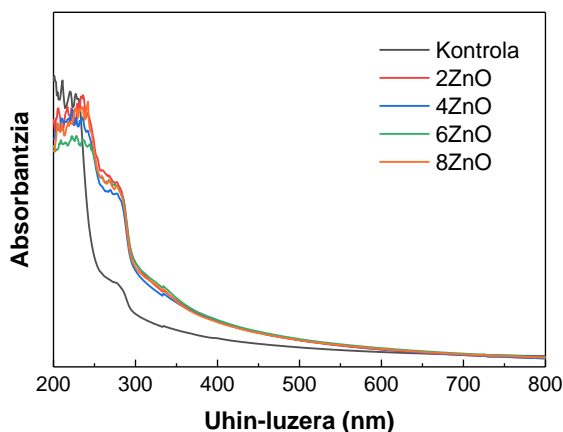
8.4 Irudia. ZnO NP eduki ezberdineko kolageno filmen A) biltegitratze modulua (E'), galera modulua (E'') eta B) galera faktorea ($\tan \delta$) kurbak.

Galera faktorea ($\tan \delta$), galera modulua eta biltegitratze moduluaren arteko ratioa ($\tan \delta = E''/E'$) bezala definitua, **8.4B Irudian** dago irudikatua. Galera faktorea maximoa deneko tenperatura, beira-trantsizio tenperatura (T_g) bezala dago definitua. Lehenengo beira-trantsizioa (T_{g1}) $-60\text{ }^\circ\text{C}$ inguruan aurkitu zen eta glizerolari dagokio. Bigarren beira-trantsizioa (T_{g2}) berriz, $20\text{ }^\circ\text{C}$ inguruan aurkitu zen kontrol filmetan eta $30\text{ }^\circ\text{C}$ -tan kolageno-ZnO NP filmetan eta kolagenoari dagokio. T_{g2} honen igoera filmen hezetasun edukiaren (**8.3 Taula**) gutxitzearekin erlaziona zen (Rochdi, Foucat eta Renou, 1999).

8.2.4. Propietate mekaniko, elektriko eta hesi-propietateak

Argiarekiko hesi-propietateak aztertu eta UV-vis espektroa **8.5 Irudian** azaldu ziren. Ikus daitekeen bezala, filmek $200\text{-}240\text{ nm}$ bitartean kolageno kateen C=O, COOH, CONH₂ taldeei dagokien absorbantzia gailur maximoa erakutsi zuten (Pal, Nidheesh eta Suresh, 2015; Veeruraj, Arumugam eta Balasubramanian, 2013) eta baita tirocina eta fenilalanina aminoazido hondarrei dagokien absorzio gailur txiki bat ere, $250\text{-}280\text{ nm}$ bitartean (Duan et al., 2009; Huang et al., 2011). ZnO NP edukia gehitzean, filmen UV-

vis absorbantzia eragin zuen, igoera txikiarekin argi ikusgarriaren tartean (400-800 nm) eta gogorki UV tartean, konkretuki 250-280 nm tartean. Horretaz gain, ez zen ZnO NPen 360 nm-tako absortzio gailur karakteristikoa azaldu, filmetan uhin luzera ikusgarria baino tamaina handiagoko nanopartikularik ez zeudela iradokituz (Ni et al., 2018).



8.5 Irudia. ZnO NP eduki ezberdinetako kolageno filmen UV-vis espektoak.

Kolageno filmek zaurientzako apositu gisa aplikatzean, zauriaren hezetasun maila onargarria mantentzen ote duten ebaluatzeko, pelikulen oklusibitatea aztertu zen ur-lurrunaren iragazkortasuna neurtuz. Prozesu hau, bi pausotan gertatzen da: ur lurrunaren sortzioa eta ur lurrunaren difusioa (Uranga et al., 2019) eta kolagenoaren egitura, organizazio eta filmean kolageno molekulen interakzioan araberakoa da (Ma et al., 2018). **8.4 Taulan** ikus daitekeen bezala, ez zen desberdintasunik ($P > 0,05$) antzeman ZnO NPK gehitzean eta lagin guztiek oklusibotasun izaera handia erakutsi zuten eta lorturiko WVP balioak zaurientzako apositu komertzialen balio tartean aurkitzen dira. Horrela, hezetasunaren kontrol egokia aurkeztu zuten, exudatuak lurruntzea ahalbidetuz, zauriak beharrezkoa duen hezetasuna mantenduz, ehunen deshidratazioa ekidinez eta birepitolizazioan lagunduz.

Hesi-propietateez gain, propietate mekanikoak garrantzi handia dute filmak maneia errazak direla ziurtatzeko. Kolageno filmen portaera mekanikoa ebaluatzeko, modulu elastikoa (EM), trakzio-erresistentzia (TS) haustura-elongazioa (EB) neurtu

ziren. **8.4 Taulan** erakusten den bezala, ZnO NPak kolagenoaren formulazioan gehitzean, EM eta TS handitu ($P < 0,05$) egin ziren; hala ere, balio horiek ez ziren aldatu ZnO NP edukia handitzean, EB balioetan ere antzeman daitekeen bezala.

8.4 Taula. ZnO NP eduki ezberdineko kolageno filmen ur lurrunaren iragazkortasuna (WVP), modulu elastikoa (EM), trakzio-erresistentzia (TS), haustura-elongazioa (EB).

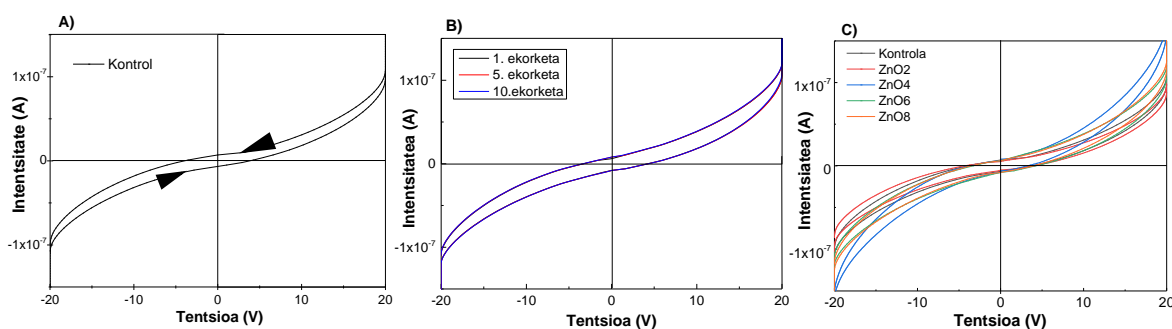
Laginak	WVP 10 ¹² (g·cm ⁻¹ ·s ⁻¹ ·Pa ⁻¹)	EM (MPa)	TS (MPa)	EB (%)
Kontrola	4,9 ± 0,3 ^a	382,8 ± 19,8 ^a	15,9 ± 1,7 ^a	14,4 ± 0,8 ^a
2ZnO	5,6 ± 0,2 ^b	430,7 ± 19,3 ^b	17,7 ± 1,6 ^{ab}	13,7 ± 0,7 ^{ab}
4ZnO	5,8 ± 0,4 ^b	445,8 ± 12,3 ^b	18,3 ± 0,7 ^b	13,2 ± 0,2 ^b
6ZnO	5,9 ± 0,4 ^b	452,4 ± 12,1 ^b	18,9 ± 0,4 ^b	13,1 ± 0,5 ^b
8ZnO	5,9 ± 0,6 ^b	455,8 ± 7,2 ^b	19,6 ± 1,3 ^b	12,9 ± 0,6 ^b

^{a-b}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera. N= 5 erreproduzio kopuru minimoa.

Ehunen ingeniari-tza aplikazioetan material biobateragarri elektro-eroaleek eskuratutako arreta berezia kontuan hartuta, pelikulen propietate elektrikoak aztertu eta intentsitate-tentsio (I-V) kurbak **8.6 Irudian** aurkeztu dira. Ezaguna da, absorbatutako ur edukia handitzean, proteinen eroankortasun elektrikoa izugarri handitzen dela, baina bai proteina heze zein lehorrek eroankortasuna ia puruki elektronikoa erakutsi zuten. Absorbatutako urak, erdieroaleen aktibazioa energia gutxitu zuen, 3,0 eV baino baxuagokoa delarik, baina ez zuen karga mugikorra askatzeko libre dauden egoeren kopurua edo karga garraiatzeen mugikortasuna aldatu (Rosenberg, 1962).

8.6A Irudian ikus daitekeen bezala, kolageno filmek eroankortasun elektrikoa erakutsi zuten, tentsio negatibotik positibora zein tentsio positibotik negatibora. Filmean zehar korrante positiboa pasa arazi zenean eta goiko eskuineko kuadrantean lan egitean, kurba gradualki handitu zen korrante eta tentsio oso txikietan. Hasteko, tentsio ekorketa -20 V-tik +20 V-ra burutu zen eta jarraian alderantziz, hau da, +20 V-tik -20 V-ra. Tentsio zuzenak filmaren hesi tentsioa den 20 V gainditzen duenean, korrante zuzenak igoera azkarra jasan zuen tentsio igoera txikiaren “knee” puntua deritzon kurba

ez lineala eratuz. Era berean, korrante negatiboa garraio araztean eta kurbaren beheko ezkerreko kuadrantean aurkitzean, filmaren erresistentzia elektrikoaren jaitziera gradual txiki bat ikusi zen alderantzizko tentsioa, bere haustura tentsioa puntua baino handiagoa izan arte. Puntu honetatik aurrera, alderantzizko tentsioaren bat-bateko igoera gauzatu zen, nahiko zuzena bihurtzen den behearanzko kurban amaituz. Prozedura hau zenbait aldiz burutu zen eta **8.6B Irudian** ekorketa jarraituak adierazi dira. Korrante-ekorketa bat burutzerakoan kolageno filmen jokaera elektrikoa irudikatu zen eta erdi-eroaleen jokaera elektrikoaren errepikagarritasuna erakutsi zuten. Ikus daitekeen bezala, nahiz eta hasieran histeresia korrante altuagoetara mugitu ondorengo ekorketetan, kurben forma mantendu zen, memristoreen beste propietate bat erakutsiz: memoria. **8.6C Irudian** ikus daitekeen bezala, kolageno film guztiek erdi-eroaleen jokaera elektroko karakteristikoa erakutsi zuten eta nahiz eta ZnO NP-en edukia desberdina izan, guztiek erresistentzia balio antzekoak aurkeztu zuten.

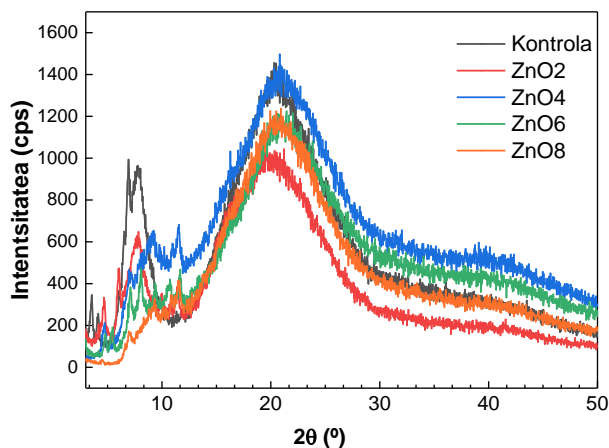


8.6. Irudia. ZnO NP eduki ezberdinetako kolageno filmen intentsitate-tentsio kurbak.

8.2.5 Propietate morfologikoak

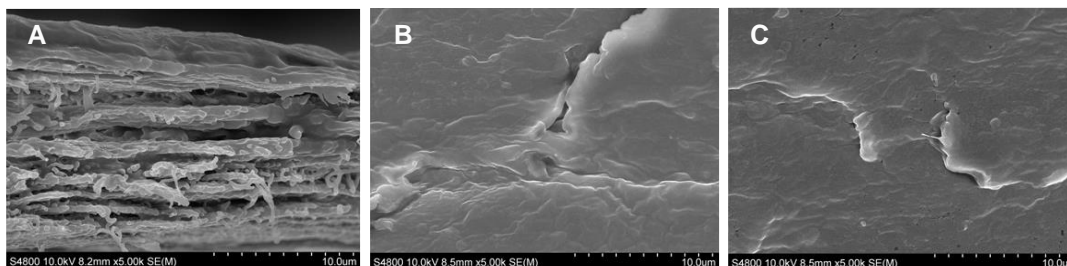
Filmek mikroegitura determinatzeko eta neurtzeko beste propietateekin erlazionatzeko, XRD eta SEM analisiak burutu ziren. Film guztiek, material amorfoko XRD patroia erakutsi zuten (**8.7 Irudia**). 7° inguruan agertu zen gailurra, kolageno kateen arteko paketatze lateralaren distantzia intermolekularrari zegokion (Valencia et al., 2019), zeina kolagenoaren helize hirukoitzeko egiturarekin erlazionatua dagoen eta bere presentziak beraz, ZnO NPak gehitu arren, kolagenoaren estruktura mantendu zela adierazi zuen. 20° -tan zentratu zen banda zabala, kolageno zuntzen sakabanatze

lausoari zegokion, filmen egitura amorfoa zela adieraziz. Aipatu beharra dago, ez zirela zink oxidoaren $\sim 31,5^\circ$, $\sim 34,4^\circ$ eta $\sim 36,2^\circ$ -tako gailurrak karakteristikoak azaldu, FTIR analisiaren bidez ikusitako kolageno eta ZnO NPen arteko interakzioak direla eta.



8.7 Irudia. ZnO NP eduki ezberdinetako kolageno filmen XRD patroiak.

Kolageno filmetan, ZnO NP edukiak eragindako aldaketak gehiago aztertzeko, SEM analisia burutu zen eta sekzioen morfologiak **8.8 Irudian** aurkeztu dira. SEM mikrografiek kontrol filmen zuntzezko sare trinkoa erakutsi zuten (**8.8A Irudia**). ZnO NPak gehitzean (**8.8B eta 8.8C Irudiak**), ez ziren kolageno zuntzik aurkitu, kolagenoaren egitura sare trinkoago batetara aldatu zela adieraziz eta XRD analisiaren bidez ikusi zen kolageno kateen albo paketatzearen murrizketa gradualarekin bat eginez. Beraz, FTIR emaitzetan ikusi zen kolagenoaren helize hirukoitzaren mantentzea kontuan hartuta (**8.2 Taula**), diferentzia hau, kateen arteko paketatze lateralaren txikitzeari egotz dakioke (**8.7. Irudia**).



8.8 Irudia. Zeharkako azalaren SEM irudia: A) kontrola, B) 4ZnO, and C) 8ZnO filmak.

8.3 ONDORIOAK

Egitura natiboa mantentzeko, kolagena mekanikoki tratatu eta disoluzio metodoaren bidez prozesatu ziren induzitutako propietate elektro-eroaledun filmak lortuz. Beraz, film hauek zelulen ugalketa sustatzeko erabil daitezke, aplikazio biomedikoetarako material egokia bihurtuz. Era berean, zink oxido nanopartikulak (ZnO NPK) film-formulazioan sartu eta beraien edukiaren eragina aztertu zen. Lortutako filmek propietate mekaniko onak erakutsi zituzten eta manea errazak ziren, PBSan murgildu ondoren, egitura osotasuna eta helize hirukoitzaren egitura mantendu zutelarik, FTIR analisisian ikusi eta XRD-ren emaitzen bidez berretsi zen bezala. Gertakari hau oso garrantzitsua da, helize hirukoitzaren egitura mantentzeak erretikulatzaile kimikoak saihesteko aukera ematen baitu; hauek beharrezkoak izanik kimikoki trataturiko kolagena desnaturalizatuatan. Halaber, kolagena filmek likidoak xurgatzeko oklusibitate balio onak erakutsi zituzten, zaurientzako apositu gisako erabilera nabarmenduz. Gainera, kolagena filmek ekorketa jarraituetan mantentzen den erdieroaleen portaera azaldu zuten. Induzitutako elektroeroale propietate hauek, zelulen ugalketa sustatzeko erabili daitezke, kolagena film hauek aplikazio biomedikoetarako aukera egoki bihurtuz.

9. kapitulua

LIKIDO IONIKO ETA ARTILEADUN KOLAGENO FILMAK

Disoluzio metodoaren bidez prestatutako likido ioniko eta artilea duten aplikazio aurreratuertarako kolageno filmak

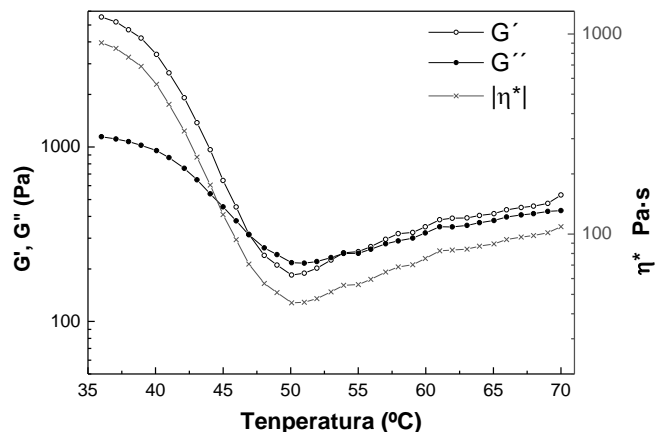
9.1 LABURPENA

Elektronika jasangarrirako polimero naturaletan oinarritutako hurrengo belaunaldiko material funtzional aurreratuak garatzeko, artilezko eta kolina dihidrogeno fosfato ([Ch][DHP]) edo serinato dihidrogeno fosfato ([Ch][Seri]) likido ionikoak (ILak) gehitu ziren kolageno natibo formulazioetan. Filmak, konpresio bidezko moldaketa bidez prestatu, haien propietate mekaniko zein elektrikoak aztertu eta filmaren egiturarekin lotu ziren. DSC analiziaren bidez behatutako desnaturalizazio-gailurrak eta FTIR emaitzek kolagenoaren zuntz-egitura lagin guztietan mantendu zela erakutsi zuten. Emaitza horiek, XRD emaitzekin korrelazionatu ziren, non desberdintasun txiki batzuk hauteman ziren alboko egokitzapen eta egitura ordenean. Gainera, SEM irudiek egitura trinkoagoa erakutsi zuten IL-ak edo artilea gehitu zirenean, ikusitako ur-xurgapen baxuagoa azalduz. Nabarmenezkoa da ILak edo artilea duten filmetan ez zela aglomeraziorik ikusi, gehigarrien dispartzio ona adieraziz. Propietate mekanikoei dagokienez, artilea gehitzeak trakzio-erresistentzia (TS) nabarmen handitu zuen, eta IL-ek, berriz, nabarmen handitu zituzten trakzio-erresistentziaren balioak (TS) eta haustura-elongazioa (EB). Azkenik, IL eta artilearen gehitzeak kolagenoaren eroankortasun elektrikoa hobetu zuten, eta film guztiek portaera antiestatikoa erakutsi zuten $1,87 \cdot 10^{-8}$ S/cm tartean. Esan beharra dago, ez zela alde nabarmenik igarri IL-ak dituzten filmen artean. Laginek 69 baino konstante dielektriko altuagoak eta 4,6tik gorako $\tan \delta$ balioak erakutsi zituzten, batez ere karga mugikorreko ekarpenen arabera. Lan honek, aplikazio askotarako balio dezaketen material jasangarren belaunaldi berri baterako, ezaugarri fisiko-kimiko moldeagarriak dituzten kolageno natibo filmen potentziala erakutsi zuen.

9.2 EMAITZAK ETA EZTABAIDA

9.2.1 Propietate erreologikoak

Konpresio bidezko moldeaketa lehengai molde metaliko bat erabiliz presio eta temperatura jakin baten pean denbora konkretu batean jarriz forma jakin batetako azken produktua lortzen deneko prozesatze-metodo bat da (Verma et al., 2021). Alde horretatik, kolagenoak egitura natiboa kontserbatu bitartean jariatzen duen gutxieneko prozesatze-tenperatura zehazteak garrantzi handia du (Bozec eta Odlyha, 2011). Beraz, kontrol laginaren portaera termoreologikoa zizaila oszilatorioan temperatura ekortzeko probak eginez aztertu zen. **9.1 Irudian** ikus daitekeenez, giro-tenperaturan G' , G'' baino handiagoa izan zen, eta, beraz, molekularen mugimendu aske mugatuaren ondorioz, portaera elastikoaren nagusitasuna erakutsi zuen (Tran-Ba et al., 2017). Temperatura igo ahala, biltegitratze- eta galera-moduluak zein biskositate konplexua (η^*) jaitsi egin ziren, 50 °C-tan balio minimoak aurkeztuz, eta honek, tenperaturak kolagenoaren egituren eragin handia duela erakutsi zuen. Tenperaturarekiko η^* -aren jaitsiera hori ur aske eta lotura uraren hidrogeno zubien hausturak eragindako kolageno-kateen mugimenduarekin erlazionatu zen, DSC kurben lehen gailur endotermikoan ikus daitekeen bezala (**9.2 Irudia**). Testuinguru honetan, tenperaturak kolageno-soluzioen propietate erreologikoetan duen eragina aztertu da, eta 25-39 °C-tan behatutako trantsizioa, kolagenoaren desnaturalizazio-tenperatura gisa definitzen da (Tian et al., 2016; Yoshimura, Chonan, eta Shirai, 1999). Hala ere, desnaturalizazio termikoa hidratazio-mailaren mende dagoela kontuan hartuta (Bozec eta Odlyha, 2011), lan honetako kolagenoa, desnaturalizazioa saihestu eta temperatura baxuan prozesatu ahal izateko adina hidratatu zen. Gainera, esan beharra dago 47-53 °C-ko tenperatura-tartean portaera likatsua nagusitu zela; izan ere, G' G'' baino pixka bat handiagoa izan zen, eta, beraz, kolagenoa konpresioan bidez moldeatzeko tenperatura-tarte optimoa adierazi zuen.

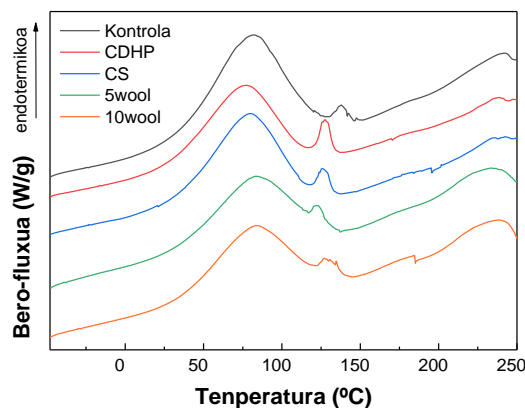


9.1 Irudia. Kontrol filmen biltegitratze-modulua (G'), galera-modulua (G'') eta kontrol-filmeko biskositate konplexua (η^*) temperaturaren arabera.

9.2.2 Propietate termiko eta fisiko-kimikoak

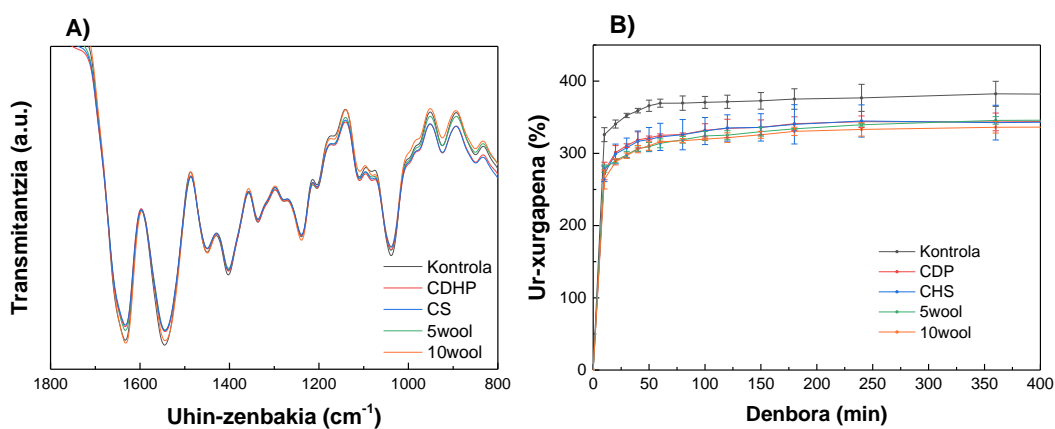
Propietate erreologikoen laginaren prozesagarritasunari buruzko informazioa ematen dute; propietate termikoen, berriz, prozesatze-baldintzen temperatura-muga eraginkorrak eta fabrikazio-prozesuek kolagenoaren egituraren eraginari buruzko informazioa ematen dute (Abeykoon et al., 2021). Beraz, DSC azterketa egin zen eta emaitzak **9.2 Irudian** ageri dira.

Ikus daitekeen bezala, lagin guztiek kolagenoaren gailur endotermiko bereizgarriak erakutsi zituzten: lehena, 75-80 °C ingurukoa, ur libre eta lotura-uraren askapenarekin lotu zen (Kaczmarek, Sionkowska, eta Skopins-Wisniewska, 2018); eta bigarren trantsizio-fasea, 125 °C ingurukoa, kolagenoaren desnaturalizazioari dagokio. Desnaturalizazio-gailur hori gehigarriak duten laginetan ere agertu zen; horrek kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura konpresio bidezko moldeaketaren ondoren mantendu egin zela adierazi zuen, nahiz eta gailurra temperatura baxuagoetan agertu. Nabarmendu behar da lehen gailurraren altuera murriztu egin zela ILak eta artilea gehitu zirenean, laginen hezetetasun ezberdintasunaren ondorioz ziurrenik (Rochdi, Foucat eta Renou, 1999).



9.2 Irudia. Kolageno filmen DSC termogramak

Filmetako osagaien arteko interakzioak ebaluatzeko, FTIR azterketa egin zen, eta espektroak, berriz, **9.3A Irudian** ageri dira. Espektro guztiek kolagenoan lotura peptidoi esleitutako xurgatze-bandak erakutsi zituzten: amida I (C=O luzatzea), amida II (N-H flexioa) eta amida III (C-N luzatzea), 1632, 1540 eta 1239 cm^{-1} , hurrenez hurren (Barth eta Zscherp, 2002). Ez zen alde nabarmenik hauteman IL-ak edo artilea gehitzean. Nahiz eta IL-etako kolina-katioiaren hidrokarboxilo erradikala eta CDHP-ko fosforo dioxidoaren taldea 1065 eta 946 cm^{-1} -ean hauteman beharko lirateke (Reizabal et al., 2019), baina banda horiek 850-1000 cm^{-1} -ko eskualdeko glizerolaren banda bereizgarriek gainjarri zituzten. Era berean, artilezko keratinaren disulfuro loturak 998-1100 cm^{-1} eremuan agertu beharko lirateke (Cardamone et al., 2009).



9.3 Irudia. Kolagenoan oinarrituriko filmen propietate fisiko-kimikoak: A) 1800tik 800 cm^{-1} -rako FTIR espektroak eta B) ur-xurgapen kurbak.

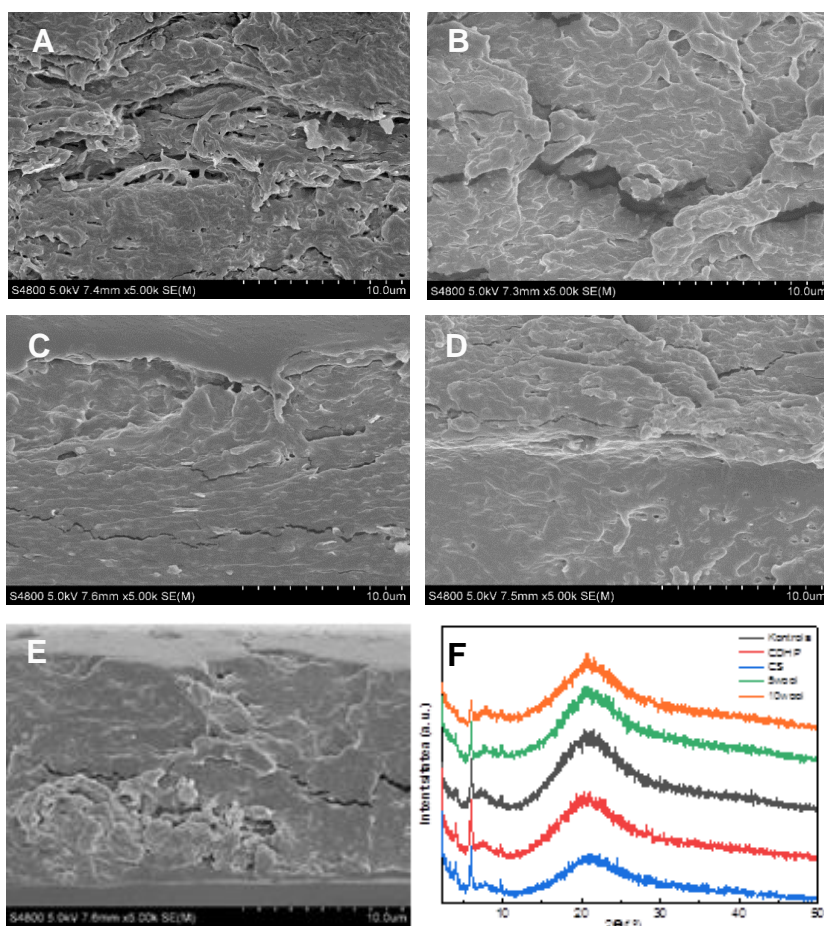
Gainera, ura hartzeko probak egin ziren, eta emaitzak **9.3B Irudian** ageri dira. Murgildu eta lehenengo 10 minutuetan, ur-xurgapen balioak azkar handitu ziren, laginen lodiera txikia zela eta. 60 minutuko murgilaldiaren ondoren, oreka-balioak % 375era iritsi ziren kontrol-filmetan eta % 325era ILak edo artilea duten filmetan. Ur-xurgapen balio horiek iradokitzen zutenez, bi IL edo artileak kolageno eta glizerolaren talde polarrekin interakzionatu zuten. Ondorioz, talde polarrak ez ziren ur molekulekin interakzionatzeko hain irisgarriak izan eta, beraz, lagin hauek kontrol laginek baino ur gutxiago xurgatu zuten. Gainera, SEM analisiaren bidez ikusiriko (**9.4 Irudia**) IL edo artiledun laginen egiturarik trinkoek ere, ur-xurgapen balioak murriztu ditzake. Nabarmentzekoa da, halaber, ez zela alde nabarmenik hauteman ILak edo artilea duten filmetako ura hartzeko balioen artean.

9.2.3 Propietate morfologikoak

ILek edo artileak kolagenoaren egituran duten eragina SEM eta XRD analisisien bidez ebaluatu zen (**9.4 Irudia**). SEM analisiari dagokionez, kontrol-filmetako (kolageno birjina) zeharkako sekzioaren mikrografiak (**9.4A Irudia**) kolageno-zuntzen sare trinkoa erakutsi zuen. IL-ak edo artilea gehitzean (**9.4B-E Irudia**), ez ziren zuntzik aurkitu, eta egitura trinkoagoa lortu zen; horrek IL-ak edo artilea zuten laginetan ur-xurgapen gaitasun txikiagoa azal lezake. Nabarmentzekoa da laginetan ez zela IL edo artile aglomeraziorik azaldu (**9.3B Irudia**), eta IL-ek eta artilea filmen barruan ondo sakabanututa zeudela adieraziz.

XRD analisiari dagokionez (**9.4F Irudia**), lagin guztiek, 20° inguruko gailurra duen kolagenoaren egitura amorfoa erakutsi zuten eta kolageno-zuntzen sakabanutze difusoarekin dago lotuta (Zou et al., 2017). 7° inguruko lehen gailurra kolagenoaren helize hirukoitzeko egiturarekin dago erlazionatua eta kolageno kateen arteko paketatze lateralaren distantzia intermolekularra adierazten ditu (Valencia et al., 2019). Lagin guztiek antzeko XRD patroiak aurkeztu zituzten; gailurren intentsitatea 7°-ko apur bat

murriztu zen artilea gehitzean eta, beraz, laginen egitura-ordenaren murrizketa adierazten du. Gainera, 5wool eta 10wool laginetan ikus daiteke 10° inguruko sorbaldan artilea osatzen duen keratinaren α -helize egituraren presentzia adieraz dezake (Wang et al., 2016). Gainera, IL edo artilea sartzeak 20° -tako gailurraren intentsitatearen murriztea ekarri zuen, eta kolageno filmen egitura-ordenaren murrizketa iradokiz.



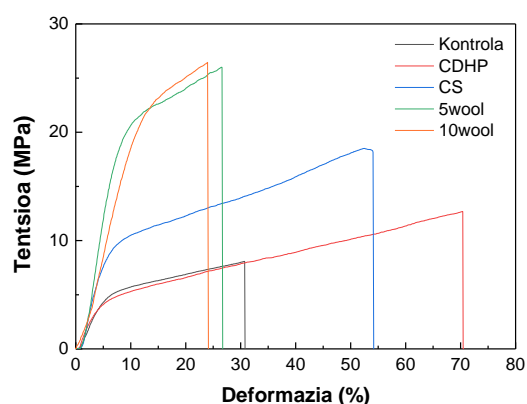
9.4 Irudia. Kolageno filmen propietate morfologiko eta egitura propietateak: A) Kontrol, B) CDHP, C) CS, D) 5wool eta E) 10wool filmen zeharkako sekzioaren irudiak; eta F) XRD patroiak.

9.2.4 Propietate mekanikoak

ILek edo artilea gehitzeak trakzioarekiko-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB) duten eragina ebaluatzeko trakzio-saiakuntzak egin ziren (**9.1 Taula**).

9.5 Irudian kolagenoaren zuntz-egitura eta IL-ak eta artilearen edukiak duen eragina ikus daiteke. Portaera hori kolagenoaren zuntz-egiturari lotuta dago. Deformazioa

handitu ahala, kolageno-zuntzak orientatzen joan ziren, eta trakzioarekiko erresistentzia haustura punturaino handitu zen (Sherman, Yang eta Meyers, 2015).



9.5 Irudia. Kolagenoan oinarrituriko filmen tentsio-deformazio kurbak.

Alde batetik, IL-en inkorporazioak TS eta EB balioen handitze nabarmena ($P < 0,05$) eragin zuen, ILen egitura kimikoari eta plastifikatzaile gisa duten rolari, hurrenez hurren (Rahman eta Brazel, 2006). Bestalde, artilea gehitu zenean, TS nabarmen handitu zen ($P < 0,05$) eta EB balioa txikitu zen ($P < 0,05$). Nahiz eta literaturan erreportaturiko lanetan erabilitako kolageno-tratamendu eta prozesatze-metodo desberdinek konparazioak zailtzen dituzten, antzeko eragina ikusi zen kaseinadun kolageno-filmetan (Wu et al., 2018), non TS balioak 17,24 MPa-tik 24,87 MPa-ra igo eta, aldi berean, EB balioak % 13,88tik 2,87ra jaitsi ziren.

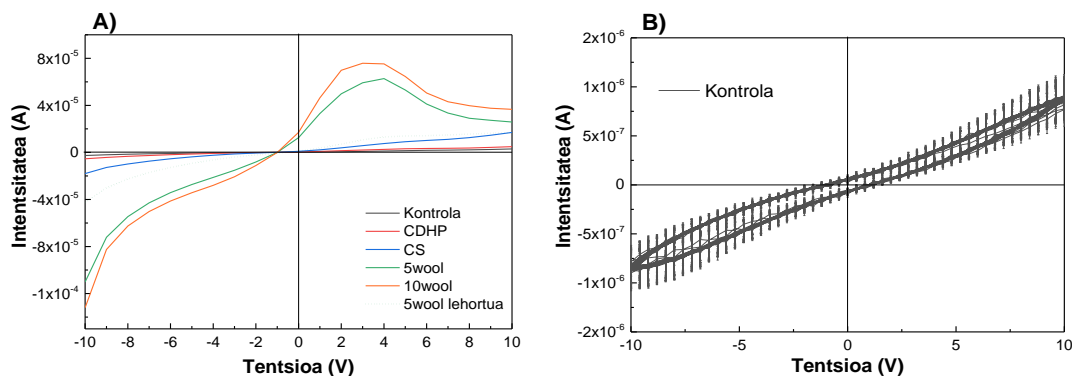
9.1 Taula. Kolagenoan oinarrituriko filmen trakzio-erresistentzia (TS) eta haustura-elongazioa (EB).

Laginak	TS (MPa)	EB (%)
Kontrola	7,36 ± 1,13 ^a	31,99 ± 4,68 ^a
CDHP	13,30 ± 0,33 ^b	68,00 ± 4,57 ^{a,b}
CS	18,07 ± 1,16 ^c	57,72 ± 4,57 ^b
5wool	24,39 ± 3,64 ^d	27,25 ± 3,21 ^c
10wool	28,31 ± 2,85 ^d	23,30 ± 1,87 ^d

^{a-d}Zutabe berean letra bera duten bi balio ez dira esanguratsuki ($P > 0,05$) ezberdinak Turkey-ren froga anizkoitzaren arabera. N= 5 erreproduzio kopuru minimoa.

9.2.5 Propietate elektriko eta dielektrikoak

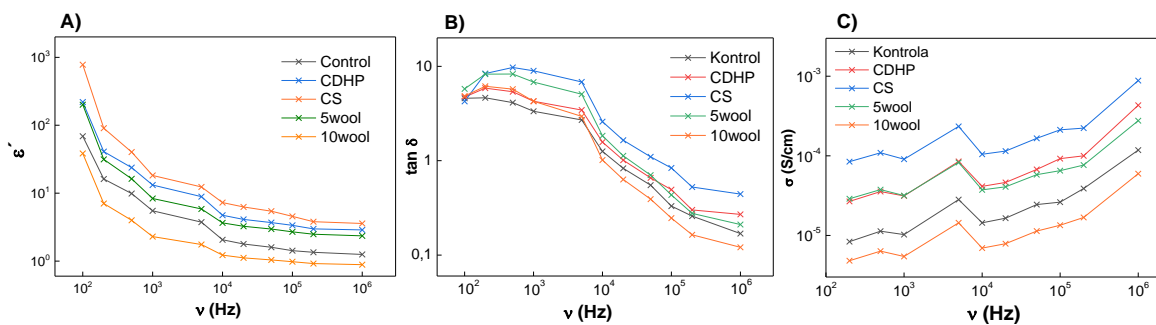
9.6A Irudian kolageno filmerako lortutako I-V kurbak eta IL-ekin edo artilearekin indartutakoak azaldu dira. IL edo artilea gehitzeak kolagenoaren eroankortasun elektrikoa hobetu zuen.



9.6 Irudia. Korrante-tentsio (I-V) kurbak eta B) korrante-tentsio (I-V) kurba ziklikoak.

9.6A Irudian ikus daitekeenez, kolagenoan oinarrituta filmek portaera antiestatikoarekin adieraz dezaketen eroankortasun elektrikoaren balioak erakusten dituzte (Jachowicz, 2013). Kontrol filmen CD eroankortasuna $2,34 \times 10^{-9}$ S/cm izan zen, eta IL-ak gehitzean handitu egin zen, $1,03 \times 10^{-9}$ S/cm-koa izanik CDHP laginetan eta $1,87 \times 10^{-8}$ S/cm-koa berriz, CS laginetan. Igoera hori IL-ei dagokien espezie mugikor ionikoen inkorporazioarekin lotuta dago. Filmetan artilea sartzean zein artile edukia handitzean, DC eroankortasun elektrikoa handitu egiten zen, artilean dauden hidroxilo talde protoi-eroapenaren ondorioz. Kasu horretan, interesgarria den portaera ez-lineala ikusi zen eta, bereziki, 3 V inguruko gailurra, eroapen-erregimenaren aldaketa (eroankortasun elektrikoa gutxitzea) adierazten duena, artilearen xurgatutako uraren efektuarekin lotuta dago. Hala frogatzen da 5wool filmetan (**9.5A Irudiko puntu-lerroa**), non efektua murriztu egiten den lehortu ondoren, hidroxilo taldeen protoi-eroapena konfirmatuz. Gainera, **9.6B Irudiak** gainerako laginetan adierazgarria den kontrol filmen I-V kurba ziklikoak (20 ziklo) erakusten ditu, zeinak eroankortasun elektrikoan histeresi txikia erakusten duen.

9.7A eta **B Irudiek** konstante dielektrikoa (ϵ') eta galera-faktorea ($\tan \delta$) erakusten dituzte, hurrenez hurren. Maiztasuna handitu ahala, ϵ' eta $\tan \delta$ txikiagotu egin ziren, eta erantzun dielektrikoari egindako ekarpenen dinamika motela adierazi zuten, batez ere karga-eramaile mugikorrei dagokiena. Gainera, ILak eta % 5 artile gehitzean ϵ' eta $\tan \delta$ balioak handitu egin ziren, gehigarri horiek karga-eramaileen kopurua handitu egin baitzuten. Gainera, ϵ' eta, bereziki, $\tan \delta$ balio handiek kolageno-, artile- eta IL karga-eramaileek erantzun dielektrikoari egiten dizkioten eroankortasun-ekarpenak addieraziz.



9.7 Irudia. A) ϵ' , B) $\tan \delta$ eta C) AC konduktibitate elektrikoren bariantza frekuentzien funtzio.

9.7C Irudian ikus daitekeenez, maiztasunarekin eroankortasuna handitu egin zen, eta horrek lokalizatutako karga eramaileen mugikortasunak ekarpen handiak egin zituela esan nahi du. Film guztien eroankortasun-portaeran bi erregimen hauteman ziren: DC eroankortasuna nagusi den 10^4 Hz-erainoko maiztasun ertainetarako erregimena eta CA eroankortasuna nagusi den maiztasun altuagoetako erregimena. Horrez gain, IL eta % 5 artilea duten filmek kontrol filmek baino CA eroankortasun-balio altuagoak erakutsi zituzten, karga-eramaile lokalizatuen kopurua handiagoa baitute, eta horrek erantzun elektrikoa handitu zuen.

9.3 ONDORIOAK

IL-ak eta artilea gehituriko kolageno filmetan oinarrituriko material funtzional aurreratuak, konpresio bidezko moldaketaren bidez prestatu ziren, film homogeneo eta moldea errazak lortuz. DSC, FTIR eta XRD bidez aurkitutako emaitzen arabera,

kolagenoaren zuntz-egitura nagusitu zen film guztietan, konpresio bidezko moldaketa-prozesuaren ondoren. Propietate fisiko-kimikoei dagokienez, ur-xurgapen gaitasun txikiagoa hauteman zen IL-ak edo artilea duten formulazioetan, seguruenik egitura trinkoagoa eratzen delako, filmeko zeharkako sekzioen SEM irudiek erakusten duten bezala. Gainera, IL-ak edo artilea gehitzean, trakzio-erresistentziaren handitze nabarmena eragin zuen, eta eroankortasun elektrikoa eta erantzun dielektrikoa hobetu zituen. Laginen erantzun dielektriko handiak ekarpen mugikorrek erakutsi zituen eta kolageno-film horiek jasangarritasunaren aldeko aplikazio antiestatiko baterako potentzial handia zutela nabarmendu zuen.

10. kapitulua

ONDORIO OROKORRAK

Hona hemen doktorego tesi honen ondorio orokorrak:

- Kolageno lamina eta filmak ondo prestatu ziren konpresio bidezko moldeaketaren erabiliz, eta kolagenoaren helize hirukoitzeko egitura mantendu zen.
- % 20 aloe vera gehituz, aplikazio biomedikoetarako kolagenoaren ezaugarri funtzionalak indartu ziren.
- Zauriak sendatzeko ezaugarri funtzional hobetuak zituzten kitosano-kolageno filmak garatu ziren. Ez zen kitosanoaren pisu molekularren arabera desberdintasun nabarmenik aurkitu.
- Ur-xurgapen ahalmen handia, THC-ren askapen kontrolatua, eta muki-itsaskortasun propietateak direla eta, THC-kolageno aldamiok zauriak sendatzeko aplikazioetarako hautagaiak izan daitezke.
- Jariakinak xurgatzeko oklusibitate-balio onak eta propietate elektro-eroale induzituak direla eta, ZnO NPak dituzten kolageno filmen zauriak sendatzeko potentziala nabarmentzen da.
- IL eta artilea duten kolageno filmak arrakastaz prestatu ziren eta aplikazio antiestatikorako material funtzional aurreratu gisa erabil daitezke.
- Irabiatze mekanikoa eta lehorketa izan ziren ingurumen-karga handiena zuten prozesuak. Kolagenozko biomaterialen ekoizpenaren eskalatzeak, eragin horiek nabarmen murriztu ditzakeen arren, prozesuak optimizatzeko gehiago ikertu behar da.

11. kapitulua

ERREFERENTZIAK

- Abdollahi, M., Rezai, M., Jafarpour, A. eta Undeland, I. (2018). Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), a biorefinery approach. *Food Chemistry*, 242, 568-578. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.045>
- Abeykoon, C., McMillan, A., Dasannayaka, C.H., Huang, X. eta Xu, P. (2021). Remanufacturing using end-of life vehicles and electrical and electronic equipment polymer recyclates – a paradigm for assessing the value proposition. *International Journal of Lightweight Materials and Manufacture*, 4, 4344-448. <https://doi.org/10.1016/j.ijlmm.2021.06.005>
- Abubakr, N., Lin, S. X. eta Chin, X. D. (2009). Effects of drying methods on the release kinetics of vitamin B12 in calcium alginate beads. *Drying Technology*, 27, 1258-1265. <https://doi.org/10.1080/07373930903267732>
- Abuine, R., Rathnayake, A. U. eta Byun, H.-G. (2019). Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22, 10. <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0125-4>
- Adriani, N.H., Rahayu, D.U.C. eta Saepudin, E. (2020). Activity of hydrogenated curcuminoid on Pd/C catalyst and its antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 902, 012068. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/902/1/012068>
- Agrawal, C. M., eta Ray, R. B. (2001). Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 141–150. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<141::AID-JBM1000>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<141::AID-JBM1000>3.0.CO;2-J)
- Ahlawat, K.S. eta Khatkar, B.S. (2011). Processing, food applications and safety of aloe vera product indicating the interactions of collagen with the additives incorporated in the formulations: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 525-533. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0229-z>
- Ahmad, T., Ismail, A., Ahmad, S. A., Khalil, K. A., Kumar, Y., Adeyemi, K. D., eta Sazili, A. Q. (2017). Recent advances on the role of process variables affecting gelatin yield and characteristics with special reference to enzymatic extraction: A review. *Food Hydrocolloids*, 63, 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.007>
- Ahmed, R., Getachew, A. T., Cho, Y. eta Chun, B. (2018). Application of bacterial collagenolytic proteases for the extraction of type I collagen from the skin of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *LWT-Food Science and Technology*, 89, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.024>

11. ERREFERENTZIAK

- Álvarez-Castillo, E., Oliveira, S., Bengoechea, C., Sousa, I., Raymundo, A. eta Guerrero, A. (2021). A rheological approach to 3D printing of plasma protein based doughs. *Journal of Food Engineering*, 288, 110255. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110255>
- Alves, A., Marques, A., Martins, E., Silva, T. eta Reis, R.L. (2017). Cosmetic Potential of Marine Fish Skin Collagen. *Cosmetics*, 4, 39. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040039>
- An, B., Lin, Y. eta Brodsky, B. (2016). Collagen interactions: drug design and delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 69–84, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.013>
- Andonegi, M., de la Caba, K. eta Guerrero, P. (2020). Effect of citric acid on collagen sheets processed by compression. *Food Hydrocolloids*, 100, 105427. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105427>.
- Andonegi, M., Peñalba, M., de la Caba, K. eta Guerrero, P. (2020). ZnO nanoparticle-incorporated native collagen films with electro-conductive properties. *Materials Science and Engineering C*, 108, 110394. <http://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110394>
- Aspevik, T., Oterhals, Å., Rønning, S.B., Altintzoglou, T., Wubshet, S.G., Gildberg, A., Afseth, N.K., Dragøy, R. eta Lindberg, D. (2017). Valorization of proteins from co- and by-products from fish and meat industry. *Topics in current chemistry*, 375, 53. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0143-6>
- ASTM D638-03 (2003). Standard test method for tensile properties of plastics. In: Annual Book of ASTM Standards, American Society for testing and materials, Philadelphia.
- ASTM E96-00 (2000) Standard test methods for water vapour transmission of material, Annual Book of ASTM Standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Astre, G., Deleruyelle, S., Dortignac, A., Bonnet, C., Valet, P. eta Dray, C. (2018). Diet-induced obesity and associated disorders are prevented by natural bioactive type 1 fish collagen peptides (Naticol®) treatment. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 74, 647–654. <https://doi.org/10.1007/s13105-018-0650-0>
- Avila Rodríguez, M. I., Rodríguez Barroso, M. G. eta Sánchez, M. L. (2018). Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 17, 20–26. <https://doi.org/10.1111/jocd.12450>
- Bajer, D., Janczak, K. eta Bajer K. (2020). Novel starch/chitosan/aloe vera composites as promising biopackaging materials. *Journal of Polymers and the Environment*, 28, 1021-1039. <https://doi.org/10.1007/s10924-020-01661-7>
- Balaure, P.C., Holban, A.M., Grumezescu, A.M., Mogoşanu, G.D., Bălşeanu, T.A., Stan, M.S., Dinischiotu, A, Volceanov, A. eta Mogoantă, L. (2019). *In vitro* and *in vivo* studies of novel

- fabricated bioactive dressings based on collagen and zinc oxide 3D scaffolds. *International Journal of Pharmaceutics*, 557, 199-207. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.063>
- Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O. eta Tomic-Canic, M. (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 22, 569-578. <https://doi.org/10.1111/wrr.12205>
- Barth, A. eta Zscherp, C. (2002). What vibrations tell about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35, 369-430. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003815>
- Bassi da Silva, J., Ferreira, S.B.D.S., Reis, A.V., Cook, M.T., Bruschi, M.L. (2018). Assessing mucoadhesion in polymer gels: the effect of method type and instrument variables. *Polymers* 10, 254. <https://doi.org/10.3390/polym10030254>
- Beghetto, V., Gatto, V., Conca, S., Bardella, N. eta Scrivanti, A. (2019). Polyamidoamide dendrimers and cross-linking agents for stabilized bioenzymatic resistant metal-free bovine collagen. *Molecules*, 24, 3611. <https://doi.org/10.3390/molecules24193611>
- Bello, A.B., Kim, D., Kim, D., Park, H. eta Lee S.-H. (2020). Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 26, 2. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2019.0256>
- Benayahu, D., Pomeranec, L., Shemesh, S., Heller, S., Rosenthal, Y., Rath-Wolfson, L. eta Benayahu, Y. (2020). Biocompatibility of a Marine Collagen Based Scaffold in Vitro and in Vivo. *Marine Drugs*, 18, 420. <https://doi.org/10.3390/MD18080420>
- Benayahu, D., Sharabi, M., Pomeranec, L., Awad, L., Haj-Ali, R. eta Benayahu, Y. (2018). Unique Collagen Fibers for Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 16, 102. <https://doi.org/10.3390/md16040102>
- Bhumbhar, M. V., Bhagwat, P. K. eta Dandge, P. B. (2019). Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging films. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7, 102983. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102983>
- Bilek, S.E. eta Bayram, S.K. (2015). Fruit juice drink production containing hydrolyzed collagen. *Journal of Functional Foods*, 14, 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.024>
- Boddupalli, B.M., Mohammed, Z.N.K., Nath, R.A. eta Banji, D. (2010). Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology eta Research*, 1, 381-387. <https://doi.org/10.4103/0110-5558.76436>

- Bolognesi, V. J., Spier, M. R. eta Rocha Garcia, C. E. (2020). Brine solution with hydrocolloids used to enhance the properties of sterilized meat. *Food Technology and Biotechnology*, 58, 2. <https://doi.org/10.17113/ftb.58.02.20.6336>
- Bozec, L. eta Odlyha, M. (2011). Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 101, 228-236. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.04.033>
- Brodsky, B. eta Ramshaw, J.A.M. (1997). The collagen triple-helix structure. *Matrix Biology*, 15, 545-554. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(97\)90030-5](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(97)90030-5)
- Bryan, M.A., Brauner, J.W., Anderie, G., Flach, C.R., Brodsky, B. eta Mendelsohn, R. (2007). FTIR studies of collagen model peptides: complementary experimental and simulation approaches to conformation and unfolding. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 7877-7884. <https://doi.org/10.1021/ja071154i>
- Campos, Y., Sola, F.J., Almirall, A., Fuentes, G., Eich, C., Que, I., Chan, A., Kaijzel, E., Tabata, Y., Quintanilla, L., Rodriguez-Cabello, J.C. eta Cruz, L.J. (2020). Design, Construction, and Biological Testing of an Implantable Porous Trilayer Scaffold for Repairing Osteoarthritic Cartilage. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14, 355-368. <https://doi.org/10.1002/term.3001>
- Cardamone, J. M., Nuñez, A., Garcia, R. A. eta Aldema-Ramos, M. (2009). Characterizing wool keratin. *Research Letters in Materials Science*, 147175. <https://doi.org/10.1155/2009/147175>
- Castellan, A., Ruggiero, R., da Silva, L.G., Portes, E., Grelier, S. eta Gardrat, C. (2007). Photophysics and photochemistry of tetrahydrocurcuminoids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 190, 110-120. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.03.019>
- Chakrapani, V.I., Gnanamani, A., Giridev, V.R., Madhusoothanan, M. eta Sekaran, G. (2012). Electrospinning of type I collagen and PCL nanofibers using acetic acid. *Journal of Applied Polymer Science*, 125, 3221-3227. <https://doi.org/10.1002/app.36504>
- Chen, J., Li, L., Yi, R., Xu, N., Gao, R. eta Hong, B. (2016a). Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT-Food Science and Technology*, 66, 453-459. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
- Chen, S., Chen, H., Xie, Q., Hong, B., Chen, J., Hua, F., Bai, K., He, J., Yi, R. eta Wu, H. (2016b). Rapid isolation of high purity pepsin-soluble type I collagen from scales of red drum fish (*Sciaenops ocellatus*). *Food Hydrocolloids*, 52, 468-477. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.027>

- Chen, S., Tang, L., Hao, G., Weng, W., Osako, K. eta Tanaka, M. (2016c). Effects of $\alpha 1/\alpha 2$ ratios and drying temperatures on the properties of gelatin films prepared from tilapia (*Tilapia zillii*) skins. *Food Hydrocolloids*, *52*, 573-580. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.07.026>
- Chen, X., Zhou, L., Xu, H., Yamamoto, M., Shinoda, M., Tada, I., Minami, S., Urayama, K. eta Yamane, H. (2019). The structure and properties of natural sheep casing and artificial films prepared from natural collagen with various crosslinking treatments. *International Journal of Biological Macromolecules*, *135*, 959-968. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.182>
- Chhabra, R.P. eta Richardson, J.F. (1999). Chapter 2- Rheometry for non-newtonian fluids. Non-newtonian flow in the process industries. Fundamentals and Engineering Applications. *Materials Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-3770-1.X5000-3>
- Chuaychan, S., Benjakul, S. eta Kishimura, H. (2015). Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *LWT-Food Science and Technology*, *63*, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.002>
- Chuaychan, S., Benjakul, S. eta Nuthong, P. (2016). Element distribution and morphology of spotted Golden goatfish fish scales as affected by demineralisation. *Food Chemistry*, *197*, 814-820. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.044>
- Clark, J. H., Farmer, T. J., Herrero-Davila, L. eta Sherwood, J. R. (2016). Circular economy design considerations for research and process development in the chemical sciences. *Green Chemistry*, *18*, 3914–3934. <https://doi.org/10.1039/C6GC00501B>
- Cockerham, K. eta Hsu, V. (2009). Collagen-based dermal fillers: past, present, future. *Facial Plastic Surgery*, *25*, 106-113. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1220650>
- Coppola, D., Oliviero, M., Vitale, G. A., Lauritano, C., D'Ambra, I., Iannace, S. eta de Pascale, D. (2020). Marine collagen from alternative and sustainable sources: Extraction, processing and applications. *Marine Drugs*, *18*, 214. <https://doi.org/10.3390/md18040214>
- Corker, A., Ng, H.C.H., Poole, R.J. eta García-Tuñón, E. (2019). 3D printing with 2D colloids: Designing rheology protocols to predict “printability” of soft-materials. *Soft Matter* *15*, 1444–1456. <https://doi.org/10.1039/C8SM01936C>
- Costa, P. eta Lobo, J.M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *13*, 123-133. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- de Campos Vidal, B., eta Mello, M. L. S. (2011). Collagen type I amide I band infrared spectroscopy. *Micron*, *42*, 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.09.010>.

11. ERREFERENTZIAK

- Deepthi, S., Sundaram, M.N., Karaavan, J.D. eta Jayakumar, R. (2016). Layered chitosan-collagen hydrogel/aligned PLLA nanofiber construct for flexor tendon regeneration. *Carbohydrates Polymers*, 153, 492-500. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.124>
- Dey, A., Bera, R. eta Chakrabarty, D. (2015). Influence of *Aloe vera* on the properties of N-vinylpyrrolidone-Acrylamide copolymer hydrogel. *Materials Chemistry and Physics*, 168, 168-179. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.11.017>
- Di Summa, P. G., Kingham, P. J., Campisi, C. C., Raffoul, W. eta Kalbermatten, D. F. (2014). Collagen (NeuraGen®) nerve conduits and stem cells for peripheral nerve gap repair. *Neuroscience Letters*, 572, 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.04.029>
- Ding, C., Zhang, M. eta Li, G. (2014). The response of collagen molecules in acid solution to temperature. *Polymers*, 55, 5751-5759. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.09.011>
- Drury, J.L. eta Mooney, D.J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24, 4337-4351. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5)
- Duan, R., Zhang, J., Du, X., Yao, X. eta Konno, K. (2009). Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chemistry*, 112, 702-706. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.020>
- El-Azazy, M., Dimassi S.N., El-Shafie, A.S. eta Issa, A.A. (2019). Bio-Waste *Aloe vera* leaves as an efficient adsorbent for titan yellow from wastewater. *Applied Sciences*, 9, 4856. <https://doi.org/10.3390/app9224856>
- Etemadian, Y., Ghaemi, V. Shaviklo, A. R., Pourashouri, P., Mahoonak, A.R.S. eta Rafipour, F. (2021). Development of animal/plant-based protein hydrolysate and its application in food, feed and nutraceutical industries: State of the art. *Journal of Cleaner Production*, 278, 123219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123219>
- Etxabide, A., Leceta, I., Cabezudo, S., Guerrero, P. eta de la Caba, K. (2016). Sustainable fish gelatin films: From food processing waste to compost. *ACS Sustainable Chemistry eta Engineering*, 4, 4626-4634. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b00750>
- Etxabide, A., Vairo, C., Santos-Vizcaino, E., Guerrero, P., Pedraz, J.L., Igartua, M., de la Caba, K. eta Hernandez, R.M. (2017). Ultra thin hydro-films based on lactose-crosslinked fish gelatin for wound healing applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 530, 455-467. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.001>
- European Commission. (2020). COM(2020) 98 final A new Circular Economy Action Plan For a cleaner and more competitive Europe. https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:9903b325-6388-11ea-b735-01aa75ed71a1.0017.02/DOC_1etaformat=PDF. (Accessed 19 December 2021)

Exposito, J.Y., Cluzel, C., Garrone, R. eta Lethias, C. (2002). Evolution of collagens. *The Anatomical Record*, 268, 302-316. <https://doi.org/10.1002/ar.10162>

Ferraro, V., Gaillard-Martinie, B., Sayd, T., Chambon, C., Anton, M. eta Santé-Lhoutellier, V. (2017). Collagen type I from bovine bone. Effect of animal age, bone anatomy and drying methodology on extraction yield, self-assembly, thermal behaviour and electrokinetic potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 55-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.068>

Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V. eta Ciardelli, G. (2012). Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8, 3191-3200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>

Figuroa-Lopez, K.J., Castro-Mayorga, J.L., Andrade-Mahecha, M.M., Cabedo, L. eta Lagaron, J.M. (2018). Antibacterial and barrier properties of gelatin coated by electrospun polycaprolactone ultrathin fibers containing black pepper oleoresin of interest in active food biopackaging applications. *Nanomaterials*, 8, 199. <https://doi.org/10.3390/nano8040199>

Food and Agriculture Organization of the United States (FAO). The state of world fisheries and aquaculture 2018.

Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H. eta Bernstorff, S. (1998). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *Journal of Structural Biology*, 122, 119-122. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.3966>

Fu, F., Zhu, X., Qin, Z., Wang, J.J., Xu, C., Wang, L.N., Tu, Y. Zhang, S., Li, R.X., Li, X.H. eta Zhao, M.L. (2018). Differential degradation rate and underlying mechanism of a collagen/chitosan complex in subcutis, spinal cord and brain tissues of rat. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29, 35. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6033-9>.

Fustier, P., Achouri, A., Taherian, A.R., Britten, M., Pelletier, M., Sabik, H., Villeneuve, S. eta Mondor, M. (2015). Protein-protein multilayer oil-in-water emulsions for the microencapsulation of flaxseed oil: Effect of whey and fish gelatin concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 9239-9250. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00858>

Ganceviciene, R., Liakou, A.I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E. eta Zouboulis, C.C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermato-Endocrinology* 4:3, 308-319. <http://dx.doi.org/10.4161/derm.22804>

Gandini, A., Lacerda, T. M., Carvalho, A. J. F. eta Trovatt, E. (2016). Progress of polymers from renewable resources: Furans, vegetable oils, and polysaccharides. *Chemical Reviews*, 116, 1637–1669. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00264>

Gao, D., Cheng, Y., Wang, P., Li, F., Wu, Y., Lyu, B., Ma, J. eta Qin, J. (2020). An eco-friendly approach for leather manufacture based on P(POSS-MAA)-aluminum tanning agent combination tannage. *Journal of Cleaner Production*, 257, 120546. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120546>

Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., Mielcarek, S. eta Włodarczyk D. (2017). Comparison of thermal properties of fish collagen and bovine collagen in the temperature range 298-670 K. *Materials Science and Engineering: C*, 80, 468-471. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.06.012>

Gelse, K., Pöschl, E. eta Aigner, T. (2003). Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55, 1531-1546. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>

Genovese, L., Corbo, A. eta Sibilla, S. (2017). An insight into the changes in skin texture and properties following dietary intervention with a nutricosmeceutical containing a blend of collagen bioactive peptides and antioxidants. *Skin Pharmacology and Physiology*, 30, 146-158. <https://doi.org/10.1159/000464470>

Georgopoulou, A., Papadogiannis, F., Batsali, A., Marakis, J., Alpantaki, K., Eliopoulos, A. G., Pontikoglou, C. eta Chatzinikolaidou, M. (2018). Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29, 59. <https://doi.org/10.1007/s10856-018-6064-2>

Ghodbane, S.A. eta Dunn, M.G. (2016). Physical and mechanical properties of cross-linked type I collagen scaffolds derived from bovine, porcine, and ovine tendons. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 104, 2685–2692, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35813>

Gomez, A. V. A., Gomez, G., Chamorro, E., Bustillo, S. eta Leiva, L. C. (2018). Digestive aspartic protease from sábalo (*Prochilodus lineatus*): Characterization and application for collagen extraction. *Food Chemistry*, 269, 610-617. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.043>

Guan, X., Avci-Adali, M., Alarçin, E., Cheng, H., Kashaf, S.S., Li, Y., Chawla, A., Jang, H.L. eta Khademhosseini, A. (2017). Development of Hydrogels for Regenerative Engineering. *Biotechnology Journal*, 12, 1600394. <https://doi.org/10.1002/biot.201600394>

Guerrero, P., Kerry, J. P. eta de la Caba, K. (2014). FTIR characterization of protein-polysaccharide interactions in extruded blends. *Carbohydrate Polymers*, 111, 598-605. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.005>

Guerrero, P., Muxika, A., Zarandona, I. eta de la Caba, K. (2019). Crosslinking of chitosan films processed by compression molding. *Carbohydrate Polymers*, 206, 820-826. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.064>

- Guo, C., Zhang, M. eta Devahastin, S. (2020). 3D extrusion-based printability evaluation of selected cereal grains by computational fluid dynamic simulation. *Journal of Food Engineering*, 286, 110113. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110113>
- Guo, L., Harnedy, P.A., Zhang, L., Li, B., Zhang, Z., Hou, H., Zhao, X. eta Fitzgerald, R.J. (2015). *In vitro* assessment of the multifunctional bioactive potential of Alaska pollock skin collagen following simulated gastrointestinal digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1514–1520. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6854>
- Guo, S., He, L., Yang, R., Chen, B., Xie, X., Jiang, B., Weidong, T. eta Ding, Y. (2020). Enhanced Effects of Electrospun Collagen-Chitosan Nanofiber Membranes on Guided Bone Regeneration. *Journal of Biomaterials Science*, 31, 155-168. <https://doi.org/10.1080/09205063.2019.1680927>
- Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U. eta Emanuelsson, A. (2013). The methodology of the FAO study: “Global Food Losses and Food Waste-extent, causes and prevention”. FAO, 2011. SIK report No. 857
- Haifei, S., Xingang, W., Shoucheng, W., Zhengwei, M., Chuangang, Y. eta Chunmao, H. (2014). The Effect of Collagen-Chitosan Porous Scaffold Thickness on Dermal Regeneration in a One-Stage Grafting Procedure. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 29, 114-125. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.08.031>
- Hanjabam, M. D., Kannaiyan, S. K., Kamei, G., Jakhar, J. K., Chouksey, M. K. eta Gudipati, V. (2015). Optimisation of gelatin extraction from Unicorn leatherjacket (*Aluterus Monoceros*) skin waste: response surface approach. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 976-983. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1075-y>
- Hayashi, Y., Yamada, S., Guchi, K.Y., Koyama, Z. eta Ikeda, T. (2012). Chitosan and Fish Collagen as Biomaterials for Regenerative Medicine. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 107-120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00006-8>
- Heino, J. (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays*, 29, 1001–1010. <https://doi.org/10.1002/bies.20636>
- Hennink, W. E. eta van Nostrum, C. F. (2012). Novel Crosslinking Methods to Design Hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 223-236. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.009>
- Hernández-Nava, R., López-Malo, A., Palou, E., Ramírez-Corona, N. eta Jiménez-Munguía, M.T. (2020). Encapsulation of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) by complex coacervation between gelatin and chia mucilage and its properties after spray drying. *Food Hydrocolloids*, 109, 106077. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106077>
- Hollister, S. J. (2009). Scaffold Design and Manufacturing: From Concept to Clinic. *Advanced*

11. ERREFERENTZIAK

Materials, 21, 3330-3342. <https://doi.org/10.1002/adma.200802977>

Hou, C., Gao, L., Wang, Z., Rao, W., Du, M. eta Zhang, D. (2020). Mechanical properties, thermal stability and solubility of sheep bone collagen-chitosan films. *Journal of Food Process Engineering*, 43, e13086. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13086>

Hu, K., Cui, F., Lv, Q., Ma, J., Feng, Q., Xu, L. eta Fan, D. (2008). Preparation of fibroin/recombinant human-like collagen scaffold to promote fibroblasts compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 84, 483-490. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31440>

Hu, Y., Liu, L., Dan, W.H., Dan, N.H. eta Gu, Z.P. (2013). Evaluation of 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate based ionic liquid systems as a suitable solvent for collagen. *Journal of Applied Polymer Science*, 130, 2245-2256. <https://doi.org/10.1002/app.39298>

Huang, C. Y., Kuo, J.M., Wu, S.J., eta Tsai, H.T. (2016). Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis sp.*) by a novel extrusion-hydroextraction process. *Food Chemistry*, 190, 997-1006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.066>

Huang, T., Tu, Z.C., Zou, Z.Z., Shangguan, X., Wang, H. eta Bansal, N. (2020). Glycosylated fish gelatin emulsion: Rheological, tribological properties and its application as model coffee creamers. *Food Hydrocolloids*, 102, 105552. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105552>

Huang, C. Y., Kuo, C. H., Wu, C. H., Ku, M. W. eta Chen, P. W. (2018). Extraction of crude chitosans from squid (*Illex argentinus*) pen by a compressional puffing-pretreatment process and evaluation of their antibacterial activity. *Food Chemistry*, 254, 217-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.018>

Huang, T., Tu, Z.C., Zou, Z.Z., Shangguan, X., Sha, X. Wang, H. Zhang, L. eta Bansal, N. (2019). Fish gelatin modifications: A comprehensive review. *Trends in Food Science eta Technology*, 86, 260-269. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.048>

Huang, Y.R, Shiao, C.Y., Chen, H.H. eta Huang, B.C. (2011). Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of balloon fish (*Diodon holocanthus*). *Food Hydrocolloids*, 25, 1507-1513. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.011>

Hulmes, D.J.S. (2002). Building collagen molecules fibrils and suprafibrillar structures. *Journal of Structural Biology*, 137, 2-10. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2002.4450>

Hwang, E., Thiagarajan, G., Parmar, A.S. eta Brodsky, B. (2010). Interruptions in the collagen repeating tripeptide pattern can promote supramolecular association. *Protein Science*, 19, 1053-1064. <https://doi.org/10.1002/pro.383>

Ishak, N. eta Sarbon, N. A. (2018). A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food Bioprocess Technology*, 11, 2–16. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1940-1>

ISO 10993-5 (2009). Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. <https://www.iso.org/standard/36406.html>

ISO 14040 (2006). Environmental Management - Life Cycle Assessment - Principals and Framework. <https://www.iso.org/standard/37456.html>

Ito, N., Seki S. eta Ueda, F. (2019). Effects of composite supplement containing collagen peptide and ornithine on skin conditions and plasma IGF-1 levels-a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Marine Drugs*, 16, 482. <https://doi.org/10.3390/md16120482>

Jachowicz, M. (2013). Electrostatic properties of selected personal protective equipment regarding explosion hazard. *Journal of sustainable mining*, 12, 27-33. <https://doi.org/10.7424/jsm130106>

Jakab, K., Marga, F., Kaesser, R., Chuang, T.H., Varadarajau, H., Cassingham, D., Lee, S., Forgacs, A. eta Forgacs, G. (2019). Non-medical applications of tissue engineering: biofabrication of a leather-like material. *Materials Today Sustainability*, in press. <https://doi.org/10.1016/j.mtsust.2019.100018>

Jeevithan, E., Qingbo, Z., Bao, B. eta Wu, W. (2013). Biomedical and pharmaceutical application of fish collagen and gelatin: a review. *Journal of Nutritional Therapeutics*, 2, 218-227. <http://dx.doi.org/10.6000/1929-5634.2013.02.04.6>

Jiang, Y. Lan, W., Sameen, D. E., Ahmed, S., Qin, W., Zhang, Q., Chen, H., Dai, J., He, L. eta Liu, Y. (2020). Preparation and characterization of grass carp collagen-chitosan-lemon essential oil composite films for application as food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 340-351. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.202>

Jridi, M., Nasri, R., Salem, R. B. S. B., Lassoued, I., Barkia, A., Nasri, M. eta Souissi, N. (2015). Chemical and biophysical properties of gelatins extracted from the skin of octopus (*Octopus vulgaris*). *LWT-Food Science and Technology*, 60, 881-889. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.057>

Kaczmarek, B., Sionkowska, A. eta Skopinska-Wisniewska, J. (2018). Influence of glycosaminoglycans on the properties of thin films based on chitosan/collagen blends. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 80, 189-193. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.02.006>

Kakkar, V., Kaur, I. P., Kaur, A. P., Saini, K. eta Singh, K. K. (2018). Topical delivery of tetrahydrocurcumin lipid nanoparticles effectively inhibits skin inflammation: in vitro and in vivo

study. Drug Development and Industrial Pharmacy.
<https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1492607>

Kapashi, E., Kapnisti, M., Dafnomili, A. eta Noli, F. (2019). Aloe Vera as an effective biosorbent for the removal of thorium and barium from aqueous solutions. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 321, 217-226. <https://doi.org/10.1007/s10967-019-06558-x>

Kean, T. eta Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.09.004>

Kezwoń, A., Góral, I., Fraczyk, T., eta Wojciechowski, K. (2016). Effect of surfactants on surface active and rheological properties of type I collagen at air/water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 238-248. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.08.058>

Kim, D.U., Chung, H.C., Choi, J., Sakai, Y. eta Lee, B.Y. (2018). Oral intake of low-molecular weight collagen peptide improves hydration, elasticity, and wrinkling in human skin: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*, 10, 826. <https://doi.org/10.3390/nu10070826>

Kiran, P. eta Rao, P.S. (2016). Development and characterization of reconstituted hydrogel from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miler) powder. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10, 411-424. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9320-5>

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Sinthusamran, S. eta Kishimura, H. (2016). Gelatin from clown featherback skin: Extraction conditions. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.029>

Knupp, C. eta Squire, J.M. (2005). Molecular packing in network-forming collagens. *Advances in Protein Chemistry*, 70, 375–403. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70011-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70011-5)

Koch, M., Foley, J. E., Hahn, R., Zhou, P., Burgeson, R. E., Gerecke, D. R. eta Gordon, M.K. (2001). $\alpha 1$ (XX) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupter triple helices. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23120–23126. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009912200>

Kuai, L., Liu, F., Ma, Y., Goff, H.D. eta Zhong, F. (2020). Regulation of nano-encapsulated tea polyphenol release from gelatin films with different Bloom values. *Food Hydrocolloids*, 108, 106045. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106045>

Labastida-Pólito, A., Piña-Barba, C., Romero-Valdovinos, M.G. eta Tello-Solís, S.R. (2009). Physicochemical properties of collagen sheet from bovine femur. *Journal of Applied Biomaterials eta Biomechanics*, 7, 200-204.

- Lamke, L.O., Nilsson, G.E. eta Reithner, H.L. (1977). The evaporative water loss from burns and the water-vapour permeability of grafts and artificial membranes used in the treatments of burns. *Burns*, 3, 159-165. [https://doi.org/10.1016/0305-4179\(77\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0305-4179(77)90004-3)
- Langer, R. S. eta Vacanti, J. P. (1999). Tissue Engineering: The Challenges Ahead. *Scientific American*, 280, 86-89. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0499-86>
- Las Heras, K., Santos-Vizcaíno, E., Garrido, T., Gutierrez, F.B., Aguirre, J.J., de la Caba, K., Guerrero, P., Igartua, M. eta Hernandez, R.M. (2020). Soy protein and chitin sponge-like scaffolds: from natural by-products to cell delivery systems for biomedical applications. *Green Chemistry*, 22, 3445. <https://doi.org/10.1039/d0gc00089b>.
- Lauritano, C. eta Ianora, A. (2016). Marine organisms with anti-diabetes properties. *Marine Drugs*, 14, 220. <https://doi.org/10.3390/md14120220>
- Leceta, I. Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M.T. eta de la Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116, 889-899. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022>
- Leceta, I., Peñalba, M., Arana, P., Guerrero, P. eta de la Caba, K. (2015). Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. *European Polymer Journal*, 66, 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.02.015>
- Lee, J. K., Patel, S. K. S., Sung, B. H. eta Kalia, V. C. (2020). Biomolecules from municipal and food industry wastes: An overview. *Bioresource Technology*, 298, 122346. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122346>
- Lee, J. M., Suen, S. K. Q., Ng, W.L., Ma, W. C. eta Yeong, W. Y. (2021). Bioprinting of collagen: considerations, potentials and application. *Macromolecular Bioscience*, 21, 2000280. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000280>
- León-López, A., Fuentes-Jiménez, L., Hernández-Fuentes, A. D., Camps-Montiel, R. G. eta Aguirre-Álvarez, G. (2019). Hydrolysed Collagen from Sheepskins as a Source of Functional Peptides with Antioxidant Activity. *International Journal of Molecular Science*, 20, 3931. <https://doi.org/10.3390/ijms20163931>
- Li J., Yu, X., Tang, W., Wan, C., Lu, Y., Dong, N., Chen, Z., Lei, Z. Ren, T., Wang, Z. eta Liu, J. (2021). Characterization of food gels prepared from the water extract of fish (*Cyprinus carpio* L.). scales: From molecular components to sensory attributes. *Food Hydrocolloids*, 112, 106263. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106263>
- Li, H., Liu, B.L., Gao, L.Z. eta Chen, H.L. (2004). Studies on bullfrog skin collagen. *Food Chemistry* 84, 65-69. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00167-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00167-5)

11. ERREFERENTZIAK

Liang, Q., Wang, L., He, Y., Wang, Z., Xu, J., eta Ma, H. (2014b). Hydrolysis kinetics and antioxidant activity of collagen under simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 11, 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.08.004>

Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J. eta Ma, H. (2014a). Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Process Biochemistry*, 49, 318-323. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.12.003>

Liao, W., Guanghua, X., Li, Y., Shen, X.R. eta Li, C. (2018). Comparison of characteristics and fibril-forming ability of skin collagen from barramundi (*Lates calcarifer*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*). *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 549-559. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.022>

Lille, M., Nurmela, A., Nordlund, E., Metsä-Kortelainen, S., eta Sozer, N. (2018). Applicability of protein and fiber-rich food materials in extrusion-based 3D printing. *Journal of Food Engineering*, 220, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.034>

Liu, B., Huang, W., Yang, G., An, Y., Yin, Y., Wang, N. eta Jiang, B. (2020). Preparation of gelatin/poly(γ -glutamic acid) hydrogels with stimulated response by hot-pressing preassembly and radiation crosslinking. *Materials Science and Engineering: C*, 116, 111259. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111259>

Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M. eta Zhou, P. (2015). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 172, 836-843. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.147>

Liu, L., Hu, D. eta Han, X. (2018). A three-dimensional unit cell model with controllable crimped structure for investigating strain response of collagen fiber reinforced biological composites. *Composites Science and Technology*, 164, 178-186. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2018.05.050>

Liu, Y., Ma, L. eta Gao, C. (2012). Facile Fabrication of the Glutaraldehyde Cross-Linked Collagen/Chitosan Porous Scaffold for Skin Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 32, 2361-2366. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.07.008>

Lodish H., Berk, A., Zipursky, SL, et al. (2000). *Molecular Cell Biology*. 4TH edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 22.3, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21582>

Lotfi, G., Shokrgozar, M. A., Mofid R., Abbas, F. M., Ghanavati, F., Baghban, A.A., Yavari, S.K. eta Pajoumshariati, S. (2016). Biological Evaluation (*In Vitro* and *In Vivo*) of Bilayered Collagenous Coated (Nano Electrospun and Solid Wall) Chitosan Membrane for Periodontal

Guided Bone Regeneration. *Annals of Biomedical Engineering*, 44, 2132-2144. <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1516-z>

Lui, Y. S., Sow, W.T., Tan, L.P., Wu, Y., Lai, Y. eta Li, H. (2019). 4D Printing and Stimuli-Responsive Materials in Biomedical Aspects. *Acta Biomaterialia*, 92, 19-36. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.005>

Lynn, A.K., Yannas, I.V. eta Bonfield, W. (2004). Antigenicity and immunogenicity of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research Part B*, 71B, 343–354, <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30096>

Ma, D., Jiang, Y., Ahmed, S., Qin, W. eta Liu, Y. (2020). Antilisterial and physical properties of polysaccharide-collagen films embedded with cell-free supernatant of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 1031-1038. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.195>

Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X. eta Han, C. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24, 4833-4841. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00374-0)

Ma, Y., Wang, W., Wang, Y., Guo, Y., Duan, S., Zhao, K. eta Li, S. (2018). Metal ions increase mechanical strength and barrier properties of collagen-sodium polyacrylate composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.092>

Ma, Y., Zeng, X., Ma, X., Yang, R. eta Zhao, W. (2019). A simple and eco - friendly method of gelatin production from bone: One-step biocatalysis. *Journal of Cleaner Production*, 209, 916-926 <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.313>

Machado, A.A.S., Martins, V.C.A. eta Plepis, A.M.G (2002). Thermal and rheological behavior of collage. Chitosan blends. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67, 491-498. <https://doi.org/10.1023/A:1013953316829>

MacNeeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445, 874–880. <https://doi.org/10.1038/nature05664>

Mantha, S., Pillai, S., Khayambashi, P., Upadhyay, A., Zhang, Y., Tao, O., Pham, H.M. eta Tran, S. D. (2019). Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative *Medicine*. *Materials*, 12, 3323. <https://doi.org/10.3390/ma12203323>

Mardani, M., Yeganehzad, S., Ptichkina N., Kodatsky, Y., Kliukina, O., Nepovinnykh, N. eta Najj-Tabasi, S. (2019). Stud on foaming, rheological and thermal properties of gelatin –free marshmallow. *Food Hydrocolloids*, 93, 335-341. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.033>

11. ERREFERENTZIAK

- Martínez, A., Blanco, M. D., Davidenko, N. eta Cameron, R. E. (2015). Tailoring Chitosan/Collagen Scaffolds for Tissue Engineering: Effect of Composition and Different Crosslinking Agents on Scaffold Properties. *Carbohydrate Polymers*, 132, 606-619. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.06.084>
- Martínez-Alvarez, O., Chamorro, S. eta Brenes, A. (2015). Protein hydrolysates from animal processing by-products as a source of bioactive molecules with interest in animal feeding: A review. *Food Research International*, 73, 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.005>
- Martínez-Ortiz, M. A., Hernandez-Fuentes, A. D., Pimentel-Gonzalez, D. J., Campos-Montiel, R. G., Vargas-Torres, A. eta Aguirre-Alvarez, G. (2015). Extraction and characterization of collagen from rabbit skin: Partial characterization. *CyTA- J. Food*, 13, 253-258. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.946451>
- McBane, J. E., Vulesevic, B., Padavan, D.T., McEwan, K.A., Korbitt, G.S. eta Suuronen, E.J. (2013). Evaluation of a Collagen-Chitosan Hydrogel for Potential Use as a Pro-Angiogenic Site for Islet Transplantation. *PLoS ONE*, 8(10), e77538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077538>
- Meena, R. A. A., Banu, J. R., Kannah, R. Y., Yogalakshmi, K. N. eta Kumar, G. (2020). Biohythane production from food processing wastes - challenges and perspectives. *Bioresource Technology*, 298, 122449. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122449>
- Miles, C.A. eta Ghelashvili, M. (1999). Polymer-in-a-Box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers. *Biophysical Journal*, 76, 3243-3252. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77476-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77476-X)
- Miles, C.A., Avery, N.C., Rodin, V.V. eta Bailey, A.J. (2005). The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *Journal of Molecular Biology*, 346, 551-556. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.001>
- Miller, E.J. (1984). Biomedical and industrial application of collagen; In: Extracellular Matrix Biochemistry, K. A. Piez and A. H. Reddi, eds. Elsevier, New York. pp. 41-81.
- Minh Thuy, L.T., Okazaki, E. eta Osako, K. (2014). Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry*, 149, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.094>
- Mohseni, F. eta Goli, S.A.H. (2019). Encapsulation of flaxseed oil in the tertiary conjugate of oxidized tannic acid-gelatin and flaxseed (*Linum usitatissimum*) mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 140, 959-964. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.197>

- Molino, S., Casanova, N.A., Rufián Henares, J.Á. eta Fernandez Miyakawa, M.E. (2020). Natural Tannin Wood Extracts as a Potential Food Ingredient in the Food Industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68, 2836-2848. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00590>
- Moreira, R., Chenlo, F. eta Torres, M.D. (2012). Effect of shortenings on the rheology of gluten-free doughs: study of chestnut flour with chia flour, olive and sunflower oils. *Journal of Texture Studies*. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.2012.00348.x>
- Moreno, O., Atarés, L., Chiralt, A., Cruz-Romero, M.C. eta Kerry, J. (2018). Starch-gelatin antimicrobial packaging materials to extend the shelf life of chicken breast fillets. *LWT*, 97, 483-490. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.005>
- Muthukumar, T., Sreekumar, G., Sastry, T. P. eta Chamundeeswari, M. (2018). Collagen as a potential biomaterial in biomedical applications. *Reviews on Advanced Materials Science*, 53, 29–39. <https://doi.org/10.1515/rams-2018-0002>
- Myllyharju, J. eta Kivirikko, K. (2001). Collagens and collagen-related diseases. *Annals of Medicine*, 33, 7–21. <https://doi.org/10.3109/07853890109002055>
- Nguyen, T. T., Heimann, K. eta Zhang W. (2020). Protein Recovery from Underutilised Marine Bioresources for Product Development with Nutraceutical and Pharmaceutical Bioactivities. *Marine Drugs*, 18, 391. <https://doi.org/10.3390/md18080391>
- Ni, S., Zhang, H., Godwin, P.M., Dai, H. eta Xiao, H. (2018). ZnO nanoparticles enhanced hydrophobicity for starch film and paper. *Materials Letters*, 230, 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.07.075>
- Nilsuwan, K., Guerrero, P., de la Caba, K., Benjakul, S. eta Prodpran, T. (2020). Properties and application of bilayer films based on poly (lactic acid) and fish gelatin containing epigallocatechin gallate fabricated by thermo-compression molding. *Food Hydrocolloids*, 105, 105792. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105792>
- Noorzai, S., Verbeek, C.J.R., Lay, M.C. eta Swan, J. (2020). Collagen Extraction from Various Waste Bovine Hide Sources. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 5687-5698. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00843-2>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials eta Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Today*, 14, 88-95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Oertzen-Hagemann, V., Kirmse, M., Eggers, B., Pfeiffer, K., Marcus, K., de Marées, M. eta Platen, P. (2019). Effects of 12 Weeks of Hypertrophy Resistance Exercise Training Combined with Collagen Peptide Supplementation on the Skeletal Muscle Proteome in Recreationally Active Men. *Nutrients*, 11, 1072. <https://doi.org/10.3390/nu11051072>

11. ERREFERENTZIAK

- Oliveira, V.D.M., Assis, C.R.D., Costa, B.D.A.M., Neri, R.C.D.A., Monte, F.T., Freitas, H.M.S.D.C.V., França, R.C.P., Santos, J., Bezerra, R.D.S. eta Porto, A.L.F. (2021). Physical, biochemical, densitometric and spectroscopic techniques for characterization collagen from alternative sources: A review based on the sustainable valorization of aquatic by-products. *Journal of Molecular Structure*, 1224, 129023. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129023>
- Ong, K. L., Kaur, G., Pensupa, N., Uisan, K. eta Lin, C. S. K. (2018). Trends in food waste valorization for the production of chemicals, materials and fuels: Case study South and Southeast Asia. *Bioresource Technology*, 248, 100-112. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.076>
- Pal, G. K., Nidheesh, T. eta Suresh, P. V. (2015). Comparative study on characteristics and *in vitro* fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*, 76, 804-812. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.018>
- Pal, G.K. eta Suresh, P.V. (2016). Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 201-215. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.03.015>
- Pal, G.K. eta Suresh, P.V. (2017). Comparative assessment of physicochemical characteristics and fibril formation capacity of thermostable carp scales collagen. *Materials Science and Engineering: C*, 70, 32-40. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.08.047>
- Pal, G.K., Nidheesh, T. eta Suresh, P.V. (2015). Comparative study on characteristics and *in vitro* fibril formation ability of acid and pepsin soluble collagen from the skin of catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*). *Food Research International*, 76, 804-812. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.018>
- Pan, M., Liu, K., Yang, J., Liu, S., Wang, S. eta Wang S. (2020). Advances on food-derived peptidic antioxidants- a review. *Antioxidants*, 9, 700. <https://doi.org/10.3390/antiox9090799>
- Patino, M.G., Neiders, M.E., Andreana, S., Noble, B. eta Cohen, R.E. (2002). Collagen: an overview. *Implant Dentistry*, 11, 280-285. <https://doi.org/10.1097/00008505-200207000-00014>
- Paula, D.D.A., Martins, E.M.F., Costa, N.D.A., de Oliveira, P.M., de Oliveira, E.B. eta Ramos, A.M. (2019). Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 722-731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.110>
- Pawelec, K. M., Best, S. M. eta Cameron, R. E. (2016). Collagen: A Network for Regenerative Medicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 4, 6484-6496. <https://doi.org/10.1039/c6tb00807k>

- Pellá, M.C.G., Silva, O.A., Pellá, M.G., Beneton, A.G., Caetano, J., Simões, M.R. eta Dragunski, D.C. (2020). Effect of gelatin and casein additions on starch edible biodegradable films for fruit surface coating. *Food Chemistry*, 309, 125764. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125764>
- Peralta, J.M., Meza, B.E., Zorrilla, S. E. (2017). Analytical solutions for the free-draining flow of a Carreau-Yasuda fluid on a vertical plate. *Chemical Engineering Science*, 168, 391-402. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.05.002>
- Perez-Puyana, V., Jiménez-Rosado, M., Romero, A. eta Guerrero, A. (2019). Crosslinking of Hybrid Scaffolds Produced from Collagen and Chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 262-269. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.198>
- Perumal, R.K., Perumal, S., Thangam, R., Gopinath, A., Ramadass, S.K., Madhan, A. eta Sivasubramanian, S. (2018). Collagen-fucoidan blend film with the potential to induce fibroblast proliferation for regenerative applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1032-1040. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.111>
- Pezechki-Modaress, M., Zandi, M. eta Rajabi, S. (2018). Tailoring the Gelatin/Chitosan Electrospun Scaffold for Application in Skin Tissue Engineering: An in Vitro Study. *Progress in Biomaterials*, 7, 207-218. <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0094-1>
- Piedade, A. P. (2019). 4D Printing: The Shape-Morphing in Additive Manufacturing. *Journal of Functional Biomaterials*, 10, 9. <https://doi.org/10.3390/jfb10010009>
- Piez, K.A., (1984). Molecular and aggregate structures of the collagens. In *“Extracellular Matrix Biochemistry”* (K.A. Piez and A.H. Reddi, eds.), 1-39. Elsevier, New York.
- Plepis, A. M. D. G., Goissis, G. eta Das-Gupta, D. K. (1996). Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering Science*, 36, 2932-2938. <https://doi.org/10.1002/pen.10694>
- Plumb, D.A., Dhir, V., Mironov, A., Ferrara, L., Poulosom, R., Kadler, K.E., Thornton, D.J., Briggs, M.D. eta Boot-Handford R.P. (2007). Collagen XXVII is developmentally regulated and forms thin fibrillary structures distinct from those of classical vertebrate fibrillar collagens. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 12791–12795. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700021200>
- Rahman, M. eta Brazel, C. S. (2006). Ionic liquids: New generation stable plasticizers for poly(vinyl chloride). *Polymer Degradation and Stability*, 91, 3371-3382. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2006.05.012>
- Ramachandran, G.N. (1988). Stereochemistry of collagen. *Journal of Peptide Protein Research*, 31, 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1988.tb00001.x>

- Reddy, N., Reddy, R. eta Jiang, Q. (2015). Crosslinking Biopolymers for Biomedical Applications. *Trends in Biotechnology*, 33, 362-369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>
- Regubalan B., Pandit P., Maiti S., Nadathur G.T. eta Mallick A. (2018). Potential Bio-Based Edible Films, Foams, and Hydrogels for Food Packaging. In: Ahmed S. (eds) *Bio-based Materials for Food Packaging*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1909-9_5
- Reizabal, A., Correia, D. M., Costa, C. M., Perez-Alvarez, L., Vilas-Vilela, J. L. eta Lanceros-Mendez, S. (2019). Silk fibroin bending actuators as an approach towards natural polymer based active materials. *ACS Applied Materials eta Interfaces*, 11, 30197-30206. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b07533>
- Rethinam, S., Vihayan, S., Aruni, A.W., Basaran, B., Alagumuthu, T. eta Ramamoorthy, R. (2020). Enhanced tissue regeneration using an nano-bioactive scaffold - A novel perspective. *Materials Chemistry and Physics*, 240, 122303. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.122303>
- Reyna-Urrutia, V. A., Mata-Haro, V., Cauich-Rodriguez, J.V., Herrera-Kao, W. A. eta Cervantes-Uc, J.M. (2019). Effect of Two Crosslinking Methods on the Physicochemical and Biological Properties of the Collagen-Chitosan Scaffolds. *European Polymer Journal*, 117, 424-433. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.05.010>
- Rezaee, M., Askari, G., EmamDjomeh, Z. eta Salami, M. (2018). Effect of organic additives on physicochemical properties and anti-oxidant release from chitosan-gelatin composite films to fatty food simulant. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 844-850. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.122>
- Riaz, T., Zeeshan, R., Zarif, F., Ilyas, K., Muhammad, N., Safi, S.Z., Rahim, A., Rizvi, S.A.A. eta Rehman, I.U (2018). FTIR analysis of natural and synthetic collagen. *Applied Spectroscopy Reviews*, 53, 703-746. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1426595>
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>
- Rochdi, A., Foucat, A. L. eta Renou, J.P. (1999). Effect of thermal denaturation on water-collagen interactions: NMR relaxation and differential scanning calorimetry analysis. *Biopolymers*, 50, 690-696. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0282\(199912\)50:7<690::AID-BIP2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0282(199912)50:7<690::AID-BIP2>3.0.CO;2-P)
- Rodrigues, M.Á.V., Bertolo, M.R.V., Marangon, C.A., Martins, V.D.C.A. eta Plepis, A.M.D.G. (2020). Chitosan and gelatin materials incorporated with phenolic extracts of grape seed and jaboticaba peel: Rheological, physicochemical, antioxidant, antimicrobial and barrier properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 769-779. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.240>

- Rosenberg, B., Electrical conductivity of proteins. (1962). *Nature* 193, 364-365, <https://doi.org/10.1038/193364a0>
- Rramaswamy, R., Mani, G., Venkatachalam, S., Yasam, R.V., Rajendran J.C.B., Tae, J.H. (2018). Preparation and characterization of tetrahydrocurcumin-loaded cellulose acetate phthalate/polyethylene glycol electrospun nanofibers. *AAPS PharmSciTech* 19, 3000-3008. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1122-0>
- Sae-leaw, T., Benjakul, S. eta O'Brien, N. M. (2016). Effects of defatting and tannic acid incorporation during extraction on properties and fishy odour of gelatin from seabass skin. *LWT- Food Science and Technology*, 65, 661-667. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.060>
- Sarkar, S. D., Farrugia, B. L., Dargaville, T. R. eta Dhara, S. (2013). Chitosan-Collagen Scaffolds with Nano/Microfibrous Architecture for Skin Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101, 3482-3492. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34660>
- Sato, K. (2017). The presence of food-derived collagen peptides in human boy-structure and biological activity. *Food eta Function*, 8, 12. <https://doi.org/10.1039/C7FO01275F>
- Schmidt, M.m., Dornelles, R.C.P., Mello, R.O., Kubota, E.H., Mazutti, M.A., Kempka, A.P. eta Demiate, I.M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23, 913-922
- Schroepfer, M. eta Meyer, M. (2017). DSC investigation of bovine hide collagen at varying degrees of crosslinking and humidities, *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 120-128. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.124>
- See, S. F., Ghassem, M., Mamot, S. eta Babji, A. S. (2015). Effect of different pretreatments on functional properties of African catfish (*Clarias gariepinus*) skin gelatin. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 753-762. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1043-6>
- Senadheera, T. R. L., Dave, D. eta Shahidi, F. (2020). Sea cucumber derived type I collagen: A comprehensive review. *Marine Drugs*, 18, 471. <https://doi.org/10.3390/md18090471>
- Shadangi, K.P. eta Mohanty, K. (2014). Kinetic study and thermal analysis of the pyrolysis of non-edible oilseed powders by thermogravimetric and differential scanning calorimetric analysis. *Renewable Energy*, 63, 337-344. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2013.09.039>
- Shah, R., Stodulka, P., Skopalova, K. eta Saha, P. (2019). "Dual Crosslinked Collagen/Chitosan Film for Potential Biomedical Applications". *Polymers*, 11, 2094. <https://doi.org/10.3390/polym11122094>

Shekhter, A.B., Fayzullin, A.L., Vukolova, M.N., Rudenko, T.G., Osipycheva, V.D. eta Litvitsky, P.F. (2019). Medical applications of collagen and collagen-based materials. *Current Medical Chemistry*, 26, 506-516. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171205170339>

Sherman, V. R., Yang, W. eta Meyers, M. A. (2015). The materials science of collagen. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 52, 22-50. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.05.023>

Shi, D., Liu, F., Yu, Z., Chang, B., Goff, H.D. eta Zhong, F. (2019). Effect of aging treatment on the physicochemical properties of collagen films. *Food Hydrocolloids*, 87, 436-447. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.016>

Shi, R., Bi, J., Zhang, Z., Zhu, A., Chen, D., Zhou, X., Zhang, L. eta Tian, W. (2008). The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of the polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperatures. *Carbohydrate Polymers*, 74, 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.04.045>

Shie, M. Y., Shen, Y. F., Astuti, S. D., Kai-Xing Lee, A., Lin, S. H., Dwijaksara, N.L.B. eta Chen, Y.W. (2019). Review of Polymeric Materials in 4D Printing Biomedical Applications. *Polymers*, 11, 1864. <https://doi.org/10.3390/polym11111864>

Shoulders, M. D. eta Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>

Sila, A., Martinez-Alvarez, O., Haddar, A., Gómez-Guillén, M. C., Nasri, M., Montero, M. P. eta Bougatef, A. (2015). Recovery, viscoelastic and functional properties of Barbel skin gelatine: Investigation of anti-DPP-IV and anti-prolyl endopeptidase activities of generated gelatine polypeptides. *Food Chemistry*, 168, 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.086>

Silvipriya, K.S., Kumar, K.K., Bhat, A.R., Kumar, B.B., John A. eta Lakshmanan, P. (2015). Collagen: Animal sources and biomedical application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 5, 123-127. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50322>

Singh, S., Gupta, A. eta Gupta, B. (2018). Scar free healing mediated by the release of aloe vera and manuka honey from dextran bionanocomposite wound dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, Part B, 1581-1590. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.124>

Sinthusamran, S., Benjakul, S. eta Kishimura, H. (2014). Characteristics and gel properties of gelatin from skin of seabass (*Lates calcarifer*) as influenced by extraction conditions. *Food Chemistry*, 152, 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.109>

- Sionkowska, A., Kaczmarek, B. eta Lewandowska, K. (2014). Modification of Collagen and Chitosan Mixtures by the Addition of Tannic Acid. *Journal of Molecular Liquids*, 199, 318-323. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.09.028>
- Six, L., Velghe, F., Verstichel, S. eta De Meester, S. (2016). Sustainability considerations on the valorization of organic waste. *Biotransformation of agricultural waste and by-products*, 287-307. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803622-8.00011-2>
- Sizeland, K.H., Hofman, K.A., Hallett, I.C., Martin, D.E., Potgieter, J., Kirby, N.M., Hawley, A., Mudie, S.T., Ryan, T.M., Haverkamp, R.G. eta Cumming, M.H. (2018). Nanostructure of electrospun collagen: Do electrospun collagen fibers form native structures? *Materialia*, 3, 90-96. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2018.10.001>
- Skov, K., Oxfeldt, M., Thøgersen, R., Hansen, M. eta Bertram, H.C. (2019). Enzymatic Hydrolysis of a Collagen Hydrolysate Enhances Postprandial Absorption Rate-A Randomized Controlled Trial. *Nutrients*, 11, 1064. <https://doi.org/10.3390/nu11051064>
- Socrates, R., Prymak, O., Loza, K., Sakthivel, N., Rajaram, A., Epple, M. eta Narayana Kalkura, S. (2019). Biomimetic fabrication of mineralized composite films of nanosilver loaded native fibrillar collagen and chitosan. *Materials Science and Engineering C*, 99, 357-366. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.101>
- Soe, M.T., Chitropas, P., Pongjanyakul, T., Limpongsa, E. eta Jaipakdee, N. (2020). Thai glutinous rice starch modified by ball milling and its application as a mucoadhesive polymer. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115812. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115812>
- Sun, Y., Yang, C., Zhu, X., Wang, J. J., Liu, X. Y., Yang, X. P., An, X. W., Liang, J., Dong, H.J., Jiang, W., Chen, C., Wanf, Z.G., Sun, H. T., Tu, Y., Zahng, S., Chen, F., eta Li, X.H. (2019). 3D Printing Collagen/Chitosan Scaffold Ameliorated Axon Regeneration and Neurological Recovery after Spinal Cord Injury. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 107,1898-1908. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36675>
- Supramaniam, J., Adnan, R., Kaus, N. H. M. eta Bushra, R. (2018). Magnetic nanocellulose alginate hydrogel beads as potential drug delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 640-648. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.043>
- Suresh, K., Sugihara, F., Suzuki, K., Inoue, N. eta Venkateswarathirukumara, S. (2015). A double-blind, placebo-controlled, randomized, clinical study on the effectiveness of collagen peptide on osteoarthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 4, 702-707. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6752>

11. ERREFERENTZIAK

- Sutmuller, M., Bruijn, J.A. eta de Heer E. (1997). Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histol Histopathol*, 12, 557-566.
- Tamay, D. G., Usal, T. D., Alagoz, A. S., Yucel, D., Hasirci, N. eta Hasirci, V. (2019). 3D and 4D Printing of Polymers for Tissue Engineering Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 164. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00164>
- Tan, Y. eta Chang, S. K. C., (2018) Isolation and characterization of collagen extracted from channel catfish (*Ictalurus punctatus*) skin. *Food Chemistry*, 242, 147-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.013>
- Thirawong, N., Nunthanid, J., Puttipipatkachorn, S. eta Sriamornsak, P. (2007). Mucoadhesive properties of various pectins on gastrointestinal mucosa: An *in vitro* evaluation using texture analyzer. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.01.010>
- Thuy, L. T. M., Okazaki, E. eta Osako, K. (2014). Isolation and characterization of acid-soluble collagen from the scales of marine fishes from Japan and Vietnam. *Food Chemistry*, 149, 264-270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.094>
- Tian, Z., Duan, L., Wu, L., Shen, L. eta Li, G. (2016). Rheological properties of glutaraldehyde-crosslinked collagen analysed quantitatively using mechanical models. *Materials Science and Engineering C*, 63, 10-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.02.047>
- Tkaczewska, J., Morawska, M., Kulawik, P. eta Zajac, M. (2018). Characterization of carp (*Cyprinus carpio*) skin gelatin extracted using different pretreatments method. *Food Hydrocolloids*, 81, 169-179. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.048>
- Tonndorf, R., Aibibu, D. eta Cherif, C. (2020). Collagen multifilament spinning. *Materials Science and Engineering: C*, 106, 110105. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110105>
- Torres, M.D., Hallmark, B. eta Wilson, D.I. (2014). Effect of concentration on shear and extensional rheology of guar gum solutions. *Food Hydrocolloids*, 40, 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.011>
- Tosati, J.V., Messias, V.C., Carvalho, P.I.N., Pollonio, M.A.R., Meireles, M.A.A. eta Monteiro, A.R. (2017). Antimicrobial Effect of Edible Coating Blend Based on Turmeric Starch Residue and Gelatin Applied onto Fresh Frankfurter Sausage. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 2165-2175. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-1985-1>

- Tran-Ba, K., Lee, D. J., Zhu, J., Paeng, K. eta Kaufman, L. J. (2017). Confocal rheology probes the structure and mechanics of collagen through the sol-gel transition. *Biophysical Journal*, 113, 1882-1892. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.025>
- Trivedi, M.K., Gangwar, M., Mondal, S. C. eta Jana, S. (2017). Protective effects of tetrahydrocurcumin (THC) on fibroblast and melanoma cell lines in vitro: it's implication for wound healing. *Journal of food science and Technology*, 54, 1137-1145. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2525-8>.
- United Nations. (2015). A/RES/70/1 transforming our world: The 2030 agenda for sustainable development. https://www.un.org/ga/search/view_doc.asp?symbol=A/RES/70/1&Lang=E. (Accessed 19 December 2021).
- Uranga, J., Leceta, I., Etxabide, A., Guerrero, P. eta de la Caba K. (2016). Cross-linking of fish gelating to develop sustainable films with enhanced properties. *European Polymer Journal*, 78, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.03.017>
- Uranga, J., Nguyen, B.T., Si, T.T., Guerrero, P. eta de la Caba, K. (2020). The effect of cross-linking with citric acid on the properties of agar/fish gelatin films. *Polymers*, 12, 291. <https://doi.org/10.3390/polym12020291>
- Uranga, J., Puertas, A.I., Etxabide, A., Dueñas, M.T., Guerrero, P. eta de la Caba, K. (2019). Citric acid-incorporated fish gelatin/chitosan composite films. *Food Hydrocolloids*, 86, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.018>
- Valencia, G. A., Luciano, C. G., Lourenço, R. V., Bittante, A. M. Q. B., eta Sobral, P. J. A. (2019). Morphological and physical properties of nano-biocomposite films base on collagen loaded with laponite®. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.013>.
- Van der Rest, M. eta Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB Journal*, 5, 2814-2823. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1916105>
- Veeruraj, A., Arumugam, M. eta Balasubramanian, T. (2013). Isolation and characterization of thermostable collagen from marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). *Process Biochemistry*, 48, 1592-1602. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.011>
- Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K. eta Shim, M. S. (2017). Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review. *Marine Drugs*, 15, 143. <https://doi.org/10.3390/md15050143>
- Verma, N., Singh, M. K, Zafar, S. eta Pathak, H. (2021). Comparative study of in-situ temperature measurement during microwave-assisted compression-molding and conventionally compression-molding process. *CIRRP Journal of Manufacturing Science and Technology*, 35, 336-345. <https://doi.org/10.1016/j.cirpj.2021.07.005>

- Vidal, A.R., Duarte, L.P., Schmidt, M.M., Cansian, R.L., Fernandes, I.A., Mello, R.O., Demiate, I.M. eta Dornelles, R.C.P. (2020) Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter by-products. *Waste Management*, 102, 838-846. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.12.004>
- Vigata, M., Meinert, C., Hutmacher, D. W. eta Bock, N. (2020). Hydrogels as drug delivery systems: a review of current characterization and evaluation techniques. *Pharmaceutics*, 12, 1188. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121188>
- Wang, B.L., Han, Y.M., Lin, Q.K., Liu, H.H., Shen, C.H., Nan, K.H. eta Chen, H. (2016b). *In vitro* and *in vivo* evaluation of xanthan gum-succinic anhydride hydrogels for the ionic strength-sensitive release of antibacterial agents. *Journal of Material Chemistry B*, 4, 1853-1861. <https://doi.org/10.1039/C5TB02046H>
- Wang, K., Li, R., Ma, J. H., Jian, Y. K. eta Che, J. N. (2016c). Extracting keratin from wool by using L-cysteine. *Green Chemistry*, 18, 476-481. <https://doi.org/10.1039/c5gc01254f>
- Wang, L., Jiang, Y., Wang, X. Cui, H, Xu W., He, Y., Ma, H. eta Gao R. (2018). Effect of oral administration of collagen hydrolysates from Nile tilapia on the chronologically aged skin. *Journal of Functional Foods*, 44, 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.005>
- Wang, L., Liang, Q., Chen, T., Wang, Z., Xu, J., eta Ma, H. (2014). Characterization of collagen from the skin of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Food Hydrocolloids*, 38, 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.002>
- Wang, P., Li, Y., Zhang, C., Que, F., Weiss, J. eta Zhang, H. (2020). Characterization and antioxidant activity of trilayer gelatin/dextran-propyl gallate/gelatin films: Electrospinning versus solvent casting. *LWT*, 128, 109536. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109536>
- Wang, X., Wang, G., Liu, L. eta Zhang, D. (2016a). The mechanism of a chitosan-collagen composite film used as biomaterial support for MC3T3-E1 cell differentiation. *Scientific reports*, 6, 1-8. <https://doi.org/10.1038/srep39322>
- Wei, Q., Lu, J., Wang, Q., Fan, H. eta Zhang, X. (2015). Novel synthesis strategy for composite hydrogel of collagen/hydroxyapatite microsphere originating from conversion of CaCO₃ templates. *Nanotechnology*, 26, 115605. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/26/11/115605>
- Whu, S. W., Hung, K. H., Hsieh, K. H., Chen, C. H., Tsai, C. L. eta Hsu, S. H. (2013). In Vitro and in Vivo Evaluation of Chitosan-Gelatin Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 33, 2855-2863. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.03.003>
- Williamson, R.V. (1929). The Flow of Pseudoplastic Materials. *Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 1108–1111. <https://doi.org/10.1021/ie50239a035>

- Wu, H., Huang, X., Gao, M.M., Liao, X.P. eta Shi, B. (2011). Polyphenol-grafted collagen fiber as reductant and stabilizer for one-step synthesis of size-controlled gold nanoparticles and their catalytic application to 4-nitrophenol reduction. *Green Chemistry* 13, 651-658. <https://doi.org/10.1039/C0GC00843E>
- Wu, T., Gray, E. eta Chen, B. (2018). A self-healing, adaptive and conductive polymer composite ink for 3D printing of gas sensors. *Journal of Materials Chemistry C*, 6, 6200. <https://doi.org/10.1039/c8tc01092g>.
- Wu, X., Liu, A., Wang, W. eta Ye, R. (2018). Improve mechanical properties and thermal-stability of collagen fiber based film by crosslinking with casein, keratin or SPI: Effect of crosslinking processes and concentrations of proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 1319-1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.144>
- Wu, X., Liu, Y., Liu, A. eta Wang, W. (2017). Improved thermal-stability and mechanical properties of type I collagen by crosslinking with casein, keratin and soy protein isolate using transglutaminase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 292-301. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.127>
- Wu, X., Luo, Y., Liu, Q., Jiang, S. eta Mu, G. (2019). Improved structure-stability and packaging characters of crosslinked collagen fiber-based film with casein, keratin and SPI. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99, 4942-4951. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9726>
- Xiong, X., Yu, I.K.M., Tsang, D.C.W., Bolan, N.S., Ok, Y.S., Igalavithana, A.D., Kirkham, M.B., Kim K.-H. eta Vikrant, K. (2019). Value-added chemicals from food supply chain wastes: State-of-the-art review and future prospects. *Chemical Engineering Journal*, 375, 121983. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.121983>
- Yan, L. P., Wang, Y. J., Ren, L., Wu, G., Caridade, S. G., Fan, J. B., Wang, L. Y., Ji, P. H., Oliveira, J. M., Oliveira, J. T., Mano, J. F., eta Reis, R. L. (2010). Genipin-Cross-Linked Collagen/Chitosan Biomimetic Scaffolds for Articular Cartilage Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*, 95A, 465-475. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32869>
- Yang, F., Guo, C., Zhang, M., Bhandari, B. eta Liu, Y. (2019). Improving 3D printing process of lemon juice gel based on fluid flow numerical simulation. *LWT*, 102, 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.031>
- Yang, H., Duan, L., Li, Q., Tian, Z. eta Li, G. (2018). Experimental and modeling investigation on the rheological behavior of collagen solution as a function of acetic acid concentration. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 77, 125-134. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.09.003>

11. ERREFERENTZIAK

Yang, X., Li, A., Li, X., Sun, L. eta Guoy. (2020). An overview of classifications, properties of food polysaccharides and their links to applications in improving food textures. *Trends in Food Science eta Technology*, 102, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.05.020>

Yeddes, W., Djebali, K., Aidi Wannes, W., Horchani.Naifer, K., Hammami, M., Younes, I. eta Saidani Tounsi, M. (2020). Gelatin-chitosan-pectin films incorporated with rosemary essential oil: Optimized formulation using mixture design and response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.092>

Yoon, S.D., Chough, S.H. eta Park, H.R. (2007). Preparation of resistant starch/poly(vinyl alcohol) blend films with added plasticizer and crosslinking agents. *Journal of Applied Polymer Science*, 106, 2485-2493. <https://doi.org/10.1002/app.26755>

Yoshimura, K., Chonan, Y. eta Shirai, K. (1999). Preparation and dynamic viscoelastic characterization of pepsin-solubilized collagen from shark skin compared with pig skin. *Animal Science Journal*, 70, 227-234.

Yu, D., Chi, C.F., Wang, B., Ding, G.F. eta Li, Z.R. (2014). Characterization of acid-and pepsin-soluble collagens from spines and skulls of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Chinese Journal of Natural Medicines*, 12, 712–720. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(14\)60110-2](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(14)60110-2)

Yüksel, A., Şahin-Yeşilçubuk, N. (2018). Encapsulation of structured lipids containing medium- and long chain fatty acids by complex coacervation of gelatin and gum arabic. *Journal of Food Process Engineering*, 41, e1290. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12907>

Zamorano-Apodaca, J. C, García-Sifuentes, C. O., Carvajal-Millán, E., Vallejo-Galland, B., Scheuren-Acevedo, S. M. eta Lugo-Sánchez, M. E. (2020). Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-product of different fish species. *Food Chemistry*, 331, 127350 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127350>

Zhuang, C., Tao, F. eta Cui, Y. (2017). Eco-friendly biorefractory films of gelatin and TEMPO-oxidized cellulose ester for food packaging applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3384-3395. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8189>

Zou, Y., Wang, L., Cai, P., Li, P., Zhang, M., Sun, Z., Sun, C., Xu, W. eta Wang, D. (2017). Effect of ultrasound assisted extraction on the physicochemical and functional properties of collagen from soft-shelled turtle calipash. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1602-1610. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.011>

Zuidem, J.M., Rivet, C.J., Gilbert, R.J. eta Morrison, F.A. (2013). A protocol for rheological characterization of hydrogels for tissue engineering strategies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102, 1063–1073. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33088>