

**Universidad
Autónoma
Metropolitana**



Casa abierta al tiempo **Azcapotzalco**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Maestría en Ciencias e Ingeniería de Materiales

**“Síntesis de compósitos hidroxiapatita/colágeno a partir de
residuos de pescado con orientación a la regeneración ósea”**

Tesis

Presenta:

Daniela Ayala Barajas

Matrícula: 2183802791

Asesoras:

Dra. Julia Aguilar Pliego

Dra. Virginia González Vélez

Depto. Ciencias Básicas, UAM-A

Ciudad de México, agosto del 2021.

Agradecimientos

- Mi agradecimiento a CONACYT por brindarme el apoyo para iniciar y concluir este trabajo de investigación, que me ha dado la oportunidad de obtener un grado académico más y me ha permitido superarme.
- Agradezco la oportunidad que me brinda la Universidad Autónoma Metropolitana por abrirme una puerta al conocimiento que me permite ser mejor en todos los aspectos de mi vida.
- Agradezco al Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, especialmente al Laboratorio de Biofuncionalización de Superficies dirigido por la Dra. Marisela Vélez Tirado, por la oportunidad que me brindó para desarrollar la mayor parte de experimentación de este trabajo.
- Mi agradecimiento infinito a Dios y a mi familia (especialmente a mi mamá y a Pablo) por apoyarme en cada paso escolar que he dado, por estar siempre en los momentos más difíciles para ayudarme a sobre llevarlos.

Tabla de contenido

Resumen.....	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Marco teórico.....	6
Biomateriales.....	6
Ingeniería de tejidos.....	7
Tejido óseo.....	8
Justificación.....	12
Hipótesis.....	12
Objetivos.....	12
Capítulo 1 ANTECEDENTES.....	13
1.1 Tilapia.....	13
1.2 Hidroxiapatita.....	14
1.5 Colágeno.....	17
1.7 Regeneración de tejido óseo.....	22
1.7.1 Materiales usados en regeneración de tejido óseo.....	22
1.8 Pescados como fuente de hidroxiapatita y colágeno.....	24
1.9 Compósito hidroxiapatita/colágeno.....	25
Capítulo 2 METODOLOGÍA.....	26
2.1 Diseño de experimentos.....	26
2.2 Extracción de colágeno.....	27
2.2.1 Colágeno a partir de escamas.....	28
2.2.2 Colágeno a partir de piel.....	28
2.3 Síntesis de hidroxiapatita.....	29
2.3.1 Síntesis de hidroxiapatita a partir de escamas.....	29
2.3.2 Síntesis de hidroxiapatita por precipitación.....	29
2.4 Síntesis de compósito hidroxiapatita/colágeno.....	30
2.5 Técnicas de caracterización fisicoquímicas.....	31
Capítulo 3 RESULTADOS.....	33
3.1 Colágeno.....	34
3.2 Hidroxiapatita.....	38
3.3 Compósito.....	43

Capítulo 4	CONCLUSIONES	49
Capítulo 5	PUBLICACIONES	50
	Referencias	60
	APÉNDICE	65
	Este apéndice contiene información adicional sobre dos procedimientos experimentales que quedaron pendientes de realizarse para los biomateriales extraídos.....	65
1.	Esterilización	65
2.	Pruebas de biocompatibilidad	66

Resumen

El presente trabajo está enfocado en la síntesis de un compuesto de hidroxiapatita y colágeno que pueda ser empleado en la regeneración de tejido óseo. Los precursores del compuesto fueron extraídos de las escamas y piel del pescado *Oreochromis hunteri* y *niloticus* (tilapia). El colágeno se extrajo a partir de ambos residuos, mientras que la hidroxiapatita se obtuvo a partir de las escamas. Inicialmente este trabajo se basó en los métodos descritos por Liu et al., y Akkasit et al., para aislar colágeno soluble en ácido (CSA) y colágeno soluble en pepsina (CSP), y en el método de Ulfyana et al. para sintetizar la hidroxiapatita; en el desarrollo experimental se realizaron variaciones que logran resultados novedosos.

Se pudo extraer colágeno tipo I tanto de la piel como de la escama, con mayor rendimiento para la piel, y que el polímero extraído presenta una estructura cuya longitud es menor a la reportada para el colágeno proveniente de mamíferos. El rendimiento obtenido fue similar al reportado por Liu et al. Con respecto a la hidroxiapatita, el material extraído de la escama no requirió de la adición del grupo fosfato, como se ha reportado en otros trabajos similares, ya que el material obtenido ya contenía fósforo. El análisis físicoquímico del material compuesto mostró que tiene características adecuadas para ser aplicado en el área médica, ya que es un material poroso, rico en calcio, y enriquecido con sodio y magnesio. Además, el aspecto físico del compuesto es muy parecido al hueso esponjoso.

Teniendo en cuenta que la Tilapia es un pescado de alto consumo en México, lo que genera enormes cantidades de escamas y piel de desecho, el trabajo descrito en esta tesis es una propuesta de recuperación de estos desechos para extraer productos de alto valor agregado, como el Colágeno Tipo I, que puede ser aplicado en el área biomédica.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo muestra la investigación desarrollada en torno a la síntesis de un material compósito de hidroxiapatita y colágeno que tiene la finalidad de convertirse en un biomaterial para aplicaciones médicas. Mas este es un trabajo preliminar para comenzar la exploración del material ya que se obtiene de residuos de pescado.

Marco teórico

Biomateriales

Los materiales que se emplean en el área médica se denominan biomateriales, estos materiales tienen como objetivo reemplazar o desarrollar una función en algún tejido u órgano. En el pasado no había desarrollo específico de biomateriales basados en criterios científicos, sin embargo, al paso de los años esto se fue modificando y las bases científicas se han ido sentando. La evolución de la investigación en biomateriales se puede describir en cuatro etapas (1):

- Primera generación: data de los años 60-70's, donde los materiales representativos son el acero y polietileno, tuvo como objetivos el logro de propiedades físicas similares al tejido a reemplazar y la obtención de un material con el cual no reaccionara.
- Segunda generación: tiene relación con el desarrollo de la industria aeronáutica y con materiales como el titanio y sus aleaciones, cuyas características relevantes son la inercia y pasividad, presentan alta probabilidad de aceptación, algunos de ellos llegaron a presentar inconvenientes en la adaptación al organismo.
- Tercera generación: se presenta en los años 90's, parte del principio de que no es el cuerpo el que debe adaptarse al material, sino a la inversa. Aparecen entonces el término de biomaterial activo para designar aquellos materiales que presentan similitudes en composición o superficie con el sistema biológico.
- Cuarta generación: pretende obtener materiales que interactúen en profundidad con los sistemas biológicos mediante la regularización del proceso biológico, integrándose en el organismo, con una capacidad de degradarse y luchando contra infecciones. A estos materiales se les denomina inteligentes ya que adaptan sus propiedades al estímulo exterior o contienen sensores para vigilar las funciones e interactuar con los sistemas biológicos.

Existen diferentes definiciones y ampliaciones de estas debido a los retos que enfrentan estos materiales ante su implantación en el cuerpo humano.

La definición de biomateriales empleada por el Instituto Nacional Americano de Salud menciona que un biomaterial es cualquier sustancia o combinación de

sustancias, que no sean drogas, sintéticas o de origen natural que se puedan usar durante cualquier periodo de tiempo, que aumente o reemplace parcial o totalmente cualquier tejido, órgano o función del cuerpo, para mantener o mejorar la calidad de vida del individuo (2).

La revista “Biomaterials” define el biomaterial como una sustancia que ha sido diseñada para formar parte de un sistema complejo, usada para dirigir mediante el control de las interacciones con los componentes de los sistemas vivos, en cualquier terapia o tratamiento, así como en procedimientos diagnósticos. Los biomateriales son usados para reemplazar o mejorar la función de aquellos tejidos u órganos que han sido dañados o degradados. Esto permite mejorar la calidad de vida de los pacientes (3).

Los biomateriales son materiales que presentan diferentes clasificaciones, desde su naturaleza hasta las propiedades que deben tener para ser considerados como tales. Dentro de su naturaleza se encuentran que pueden ser metálicos, cerámicos poliméricos o compósitos; en cuanto a sus propiedades se pueden clasificar en reabsorbible (tienen la capacidad de desintegrarse y absorberse en el tejido) y no reabsorbible que son contrarios a los anteriores. Para clasificar un biomaterial debe presentar algunas otras características como:

Inerte: materiales que al estar en contacto con tejido no producirán reacciones químicas entre el implante y el tejido.

Bioactivos: materiales que fomentan la unión con tejido circundante, su contraposición son materiales inactivos que causan una respuesta mínima o nula al tejido.

Degradable: materiales que liberan gradualmente su masa en el tejido circundante y pueden disolverse por completo en un tiempo dado.

No tóxico

Compatible: en estos materiales, la respuesta del huésped con respecto a su implantación o presencia no pueden tener efectos adversos ni en el implante ni en el organismo huésped.

Los biomateriales deben permitir el uso a largo plazo sin el rechazo del organismo huésped, ni perder su función prevista (2,3).

Ingeniería de tejidos

Ingeniería de tejidos es definida como un campo interdisciplinar que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauran, mantienen o mejoran la función de un tejido (4).

La ingeniería de tejidos evolucionó a partir del desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente

activas en tejidos funcionales. El objetivo de la ingeniería de tejidos es ensamblar construcciones funcionales que restauran, mantienen o mejoran el tejido dañado o un órgano completo (5).

La aportación de la ingeniería de tejidos hacia la medicina regenerativa se basa en producir de forma continua tejidos y órganos que puedan integrarse en el cuerpo humano. Se distinguen tres modalidades de la ingeniería de tejidos (6):

Sustitutos o aislamiento celulares: En esta metodología se extraen células del paciente a tratar, o de un donante, para ser multiplicadas *in vitro*. Posteriormente, se separan las células capaces de reparar el daño y se implantan en el sitio de la lesión. Comúnmente estas células son implantadas por inyección empleando un hidrogel biocompatible como vehículo, resultando en una técnica de mínima invasión quirúrgica que reduce las complicaciones. La principal desventaja de este método es la posible pérdida de la función celular y el rechazo inmunológico de células extraídas de donantes (6).

Sustancias inductoras de tejidos: Esta técnica se basa en que las células responden a las señales bioquímicas de su entorno para formar su propia matriz, por lo que el éxito depende de la purificación a gran escala de moléculas capaces de estimular a las células que conforman al tejido para que ellas mismas reparen el daño (6).

Matrices extracelulares sintéticas: En este enfoque, materiales macroporosos tridimensionales son empleados como medio para el trasplante o estimulación celular, actuando como guía en la restauración del tejido. Para cumplir el objetivo, la matriz ideal debe permitir la vascularización para suplir de nutrientes la estructura, puesto que las células localizadas a más de 150 μm de un vaso sanguíneo no sobreviven por falta de oxígeno. Además, la matriz debe ser biodegradable para permitir el crecimiento del nuevo tejido y desaparecer una vez se haya regenerado.

La fabricación de órganos y/o tejidos *in vitro* listos para ser trasplantados al cuerpo humano. Se cultivan células sobre el material dentro de un biorreactor que proveerá un microambiente fisicoquímico adecuado para la diferenciación celular y la conjunción del tejido tridimensional.

La implantación directa de materiales acelulares que promuevan la colonización del implante por las células localizadas en la vecindad de la lesión a tratar. Para lograr la restauración del tejido, el material debe estimular la migración celular, la vascularización y el remodelado del implante, mientras que el cuerpo humano suministra las células y las condiciones necesarias (6).

Tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo especializado en la función esquelética y de sostén, así como en la hematopoyesis (7). Es parte fundamental de del

aparato locomotor, además posee una función metabólica central ya que es almacén de calcio (Ca). El Ca es un ion esencial en muchas funciones del organismo (contracción muscular, secreción y coagulación de sangre, entre otras). Además, en el hueso se almacenan magnesio, fósforo, sodio y otros iones (8).

El hueso posee gran resistencia a la tracción y a la compresión. El hueso es un material compuesto por dos fases: fase mineral que es dura y una fase de matriz orgánica en relación estrecha con la primera y compuesta alrededor del 90-95% por colágeno tipo I (8).

Matriz ósea

Las características y propiedades específicas del hueso se deben a las propiedades de la matriz ósea. Dado que está calcificada, le imparte al hueso gran resistencia a la compresión y tracción. La composición especial de la matriz, consiste en fibrillas colágenas y sales inorgánicas (fosfato de calcio en forma de hidroxiapatita) (8).

La matriz ósea está compuesta:

- Material orgánico, alrededor de 35% (fibras de colágeno, proteínas óseas y proteoglucanos).
- Material inorgánico, aproximadamente el 65% (sales).

El colágeno totaliza alrededor del 90% del material orgánico del hueso, la parte inorgánica que compone al hueso consiste en una forma cristalina de depósitos del fosfato de calcio, la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$). La mineralización comienza en el colágeno, donde inicialmente se depositan los cristales de apatita en intervalos regulares (8).

En la estructura macroscópica pueden distinguirse dos tipos de tejido óseo:

Hueso compacto que se encuentra en la periferia de los huesos, es una masa sólida y dura.

Hueso esponjoso se encuentra como un sistema tridimensional de espículas (trabéculas) óseas finas y ramificadas en el interior del hueso; entre las espículas quedan espacios amplios para tejido hematopoyético o adiposo.

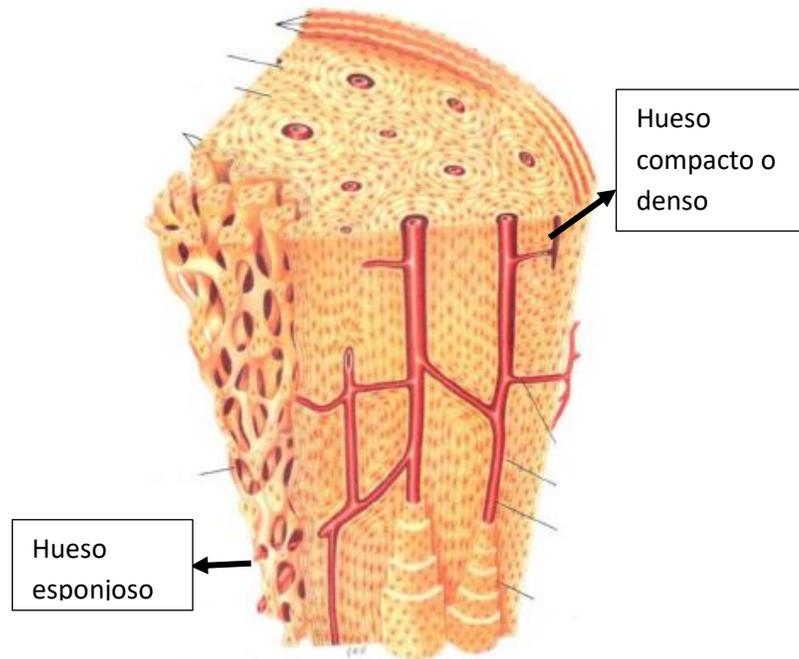


Figura 1. Hueso maduro. Representación esquemática de la metáfisis. Se puede observar la parte de hueso denso y esponjoso (9).

La estructura histológica de hueso maduro es igual en la sustancia compacta y esponjosa, se designa con el nombre de hueso laminar. Las unidades estructurales del tejido óseo maduro son laminillas óseas de 3 a 7 μ m de espesor (8).

Tipos de células óseas

Las células que componen al tejido óseo son de cuatro tipos:

Células osteoprogenitoras (precursoras de osteoblastos), provenientes de células madre, presentes en el desarrollo del tejido óseo, al presentarse una fractura se pueden activar y dividirse.

Osteoblastos son las células formadoras de matriz del hueso en crecimiento y maduro. Están conectados a través de nexos, además secretan colágeno, proteoglicanos, osteocalcina, osteopontina, osteonectina y otras proteínas. La matriz secretada inicialmente por estas células aún no está calcificada y recibe el nombre de osteoide. También desempeñan un papel en la degradación ósea. Los osteoblastos se transforman en osteocitos o mueren por apoptosis.

Osteocitos son osteoblastos con modificaciones morfológicas.

Osteoclastos se hacen cargo de la resorción de la matriz calcificada, son células de hasta 150 μ m de diámetro.

Patologías

Existen muchas enfermedades óseas (osteopatías), en las osteomalacias la porción inorgánica desciende a valores de hasta el 35%, dentro de las causas se encuentra una carencia de vitamina D o un aporte insuficiente de calcio y fosfato en los alimentos (8). Algunas de las entre las enfermedades que afectan al tejido óseo son las siguientes:

- Osteoporosis: es la disminución local o generalizada del tejido óseo.
- Osteosclerosis: se designa una hipertrofia circunscrita o general del hueso con aumento de la dureza y disminución de la capacidad de carga dinámica.
- Osteosarcoma: es el tumor óseo maligno que se presenta frecuentemente entre 10 y 25 años.
- Sarcoma de Ewing: otro tipo de tumor maligno que afecta a niños y jóvenes.

Justificación

A pesar de que existen publicaciones relacionadas con la obtención de colágeno e hidroxiapatita a partir de residuos de pescado, no hay reportes que describan la obtención de estos productos a partir de la especie *Oreochromis hunteri*, que es uno de los pescados que más se consumen en la región centro de México. Por otro lado, se han publicado algunos trabajos que reportan aplicaciones médicas de estos biomateriales, así como su biocompatibilidad, para otras especies de pescado. Por ello, en este proyecto se pretende sintetizar un biomaterial que favorezca la regeneración de tejido óseo a partir de los residuos del pescado *Oreochromis hunteri*.

Hipótesis

El colágeno y la hidroxiapatita obtenidos a partir de residuos del pescado *Oreochromis Hunteri*, tales como piel y escamas, sirven para sintetizar un material compósito biocompatible y útil para la regeneración de tejido óseo.

Objetivos

Objetivo general

Sintetizar compósitos hidroxiapatita/ colágeno a partir de escamas y piel del pescado *Oreochromis Hunteri* (tilapia) para ser aplicados en la regeneración de tejido óseo.

Objetivos particulares

Aislar componentes orgánicos e inorgánicos de alto valor agregado a partir de un material de desecho.

Sintetizar y caracterizar compósitos hidroxiapatita/ colágeno.

Realizar pruebas de biocompatibilidad del material en cultivos celulares

Capítulo 1 ANTECEDENTES

1.1 Tilapia

La tilapia es un pez que pertenece a la familia *Cichlidae*, al género *Oreochromis*. Las tilapias son peces endémicos de África y el cercano Oriente, han sido introducidas de forma acelerada hacia otros países tropicales o subtropicales, aparentemente son fáciles de cultivarse por lo que las llaman “gallinas acuáticas”, soportando la rusticidad para su manejo, alta adaptabilidad a diferentes condiciones del medio, fácil reproducción, alta resistencia a enfermedades, alta productividad, generalmente herbívoras aunque aceptan todo tipo de alimentos tanto naturales como artificiales (10).

Las tilapias son introducidas en México desde 1964, tienen gran importancia en la producción de proteína animal. El cultivo de tilapia es de los más rentables porque es altamente productivo, debido a los atributos de la especie, capacidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno y a diferentes salinidades (organismos *eurihalinos*), así como la aceptación de una amplia gama de alimentos naturales y artificiales. La acuicultura aporta el 91% de la producción de tilapia en México, y se cultiva en 31 estados de la República Mexicana, siendo los mayores productores: Chiapas, Tabasco, Guerrero, Estado de México y Veracruz (11).

La morfología que presenta es de cuerpo robusto comprimido y discoidal, boca con labios gruesos; mandíbulas anchas con dientes cónicos y en ocasiones incisivos, aleta dorsal en forma de cresta con espinas y radios en su parte terminal, aleta caudal redonda y trunca. En la Figura 2 se muestra la apariencia física de la tilapia. El macho tiene dos orificios en la papila genital: el ano y el orificio urogenital, mientras que la hembra posee tres: el ano, el poro genital y el orificio urinario (11).

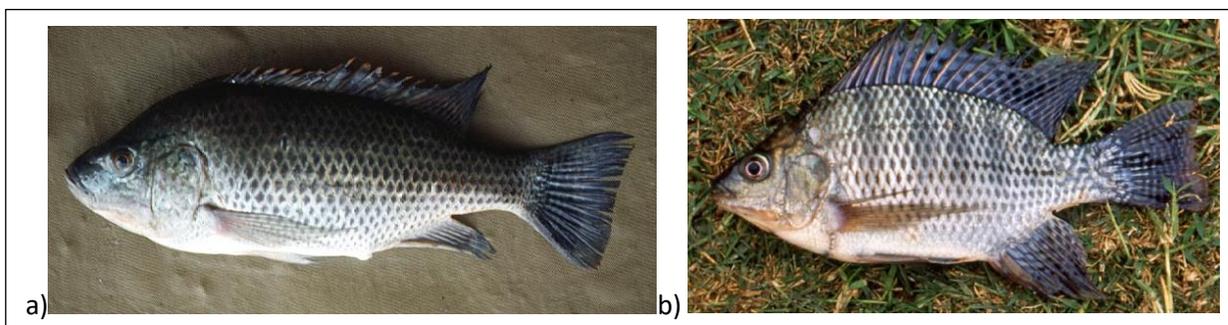


Figura 2. Fotografía de Tilapia a) *O. hunteri* (12) y b) *O. niloticus* (13).

La incubación de este pez es bucal y dura de 3-6 días. Los machos maduran de los 4-6 meses, y las hembras de los 3-5 meses, se desarrollan en ambientes acuáticos dulceacuícolas (ríos, embalses, arroyos y lagos) y salobres en lagunas costeras y estuarios (11).

La reproducción se inhibe a temperaturas menores a 20 °C, y resulta letal menor a 11°C, la temperatura de desarrollo óptima se encuentra entre 24°C y 29°C, el

oxígeno en agua debe estar entre 3 y 5 mg/l, un pH entre 6.5 y 8.5, el pH óptimo es de 7.5 (11).

La Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA) indicó que la tilapia se cultiva en aguas interiores en territorio nacional y su producción alcanza las 117 mil 806 toneladas anuales, siendo los estados más productores: Chiapas, con 28 mil 782 toneladas; Jalisco, 27 mil 739 toneladas; Michoacán, nueve mil 663 toneladas; Veracruz, ocho mil 762 toneladas; y Sinaloa, ocho mil 285 toneladas. Estas cinco entidades producen el 70 por ciento del volumen nacional de esta especie (14).

Lo anterior posiciona a México en el noveno lugar a nivel mundial en producción de tilapia y entre los principales consumidores de este producto (14).

1.2 Hidroxiapatita

La hidroxiapatita (HAp) es una forma mineral natural de apatita de calcio, con fórmula general $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. La hidroxiapatita es el miembro del extremo hidroxilo del complejo grupo apatita, donde el ion OH puede reemplazarse por iones fluoruro, cloruro o carbonato. Esta cristaliza en el sistema hexagonal, tiene una gravedad específica de 3.08 y ocupa la quinta posición en la escala de dureza de Mohs. La Figura 3 muestra la estructura cristalina de la hidroxiapatita. Presenta una apariencia blanca en polvo, pero existen apatitas naturales en color marrón, amarillas o verdes por la presencia de impurezas de hierro(15). Se presenta como la fase cristalina termodinámicamente más estable de fosfato de calcio (CaP) en contacto con el fluido corporal (16).

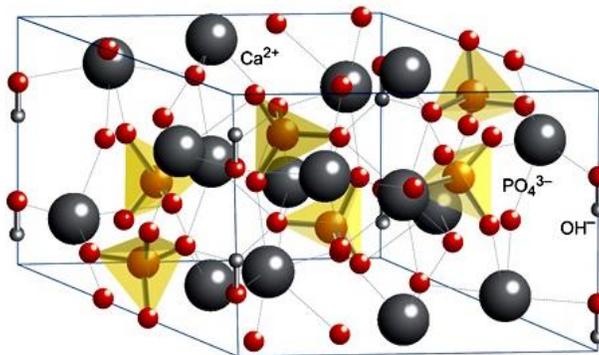


Figura 3. Estructura cristalina de hidroxiapatita (17).

Los CaP son materiales compuestos de calcio y fosfato con relaciones molares diversas entre 0.5 y 2.0. Entre ellos se encuentra la hidroxiapatita (HAp) que es el principal biomaterial que imita al elemento mineral que poseen los huesos y dientes, siendo uno de los pocos minerales fisiológicos (18). Por lo tanto, muchos estudios informan que se utiliza comúnmente como recubrimiento o relleno para promover el crecimiento óseo en implantes protésicos. Algunos implantes óseos modernos

están recubiertos con HAp, ya que se ha sugerido que este material podría promover la osificación (15).

La hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que constituye el sistema óseo presenta una relación molar de Ca/P de 1.67 en huesos y dientes. Es el principal componente de hueso con un tamaño de grano de 5 a 50nm (19). Este biomaterial exhibe notable bioactividad y biocompatibilidad en las aplicaciones biomédicas. Se ha utilizado como implante dental, protector del esmalte dental de la erosión ácida y exhibe efectos restauradores del esmalte y material sustituto óseo debido a sus propiedades no inflamatorias, no tóxicas y no inmunogénicas (18). Además, se ha utilizado con frecuencia como un relleno semipermanente en aplicaciones no quirúrgicas y en el rejuvenecimiento de la piel para tratar arrugas y cambios texturales de la misma (15).

Sin embargo, la HAp difiere significativamente en términos de su micro y nano estructura de su equivalente biológico: el hueso cortical. La diferencia de las estructuras conduce a las malas propiedades mecánicas de la HAp sintética, como la fragilidad y baja tenacidad a la fractura, lo cual restringe sus aplicaciones en recubrimientos superficiales de implantes metálicos y sin carga (20).

Existen diferentes técnicas para mejorar las propiedades que presenta el material cerámico, para esto se añaden impurezas, elaboración de compósitos y controlando la microestructura a través del método de síntesis empleado (20)

1.3 Métodos de síntesis

Hasta ahora, se han desarrollado varios enfoques para la preparación y el procesamiento de HAp, que incluyen electrodeposición, precipitación química, método sol-gel, síntesis de llama, irradiación de microondas, síntesis solvotermal, síntesis hidrotérmica, método de neutralización, síntesis de baja presión, hidrólisis enzimática, método de precipitación y método de reacción en estado sólido (18).

Existen diversos métodos de síntesis de HAp, Sadat-Shojai (16) engloba los métodos de síntesis en cinco métodos y estos a su vez los divide en submétodos como se muestra en la Tabla 1:

- Método en seco, en este tipo de síntesis no se emplean solventes y las características de los polvos no están fuertemente influenciadas por los parámetros de procesamiento, por lo que los métodos secos no requieren condiciones controladas.
 - Se han sintetizado por procesos mecanoquímicos,
 - Síntesis en estado sólido para la preparación de las partículas de HAp.
- Método de síntesis húmedo, con este método se obtienen partículas de tamaño y formas variadas, por ello se ha empleado convencionalmente a la síntesis de partículas de HAp que tienen estructuras nanométricas con morfología regular. Además, tiene ventajas en su capacidad para controlar la

morfología y tamaño medio del polvo, así como su potencial aplicación en la fabricación de HAp nanométrica

- Procesos de alta temperatura, para este tipo de síntesis se emplean temperaturas que queman total o parcialmente los precursores.
- Síntesis basada en precursores biogénicas, es la síntesis de HAp cerámica generada parcial o completamente de precursores de origen biológico ya que presenta similitud a la apatita presente en el hueso humano.
- Combinaciones de los anteriores métodos de síntesis con la finalidad de mejorar las propiedades del producto final.

Tabla 1. Comparativa de diferentes métodos de síntesis de HAp (16).

Método	Submétodo	Características del polvo			
		Cristalinidad	Pureza de fase	Relación Ca/P	Tamaño
Seco	Estado sólido	Muy alto	Baja	Variable	Micro
	Mecano-químico	Muy alto	Baja	No estequiométrica	Nano
Húmedo	Precipitación química	Baja	Variable	No estequiométrica	Nano
	Hidrólisis	Variable	Alta	Estequiométrica	Variable
	Sol-gel	Variable (baja)	Variable	Estequiométrica	Nano
	Hidrotermal	Alta	Alta	Estequiométrica	Nano o micro
	Emulsión	Baja	Variable	No estequiométrica	Nano
	Sonoquímica	Variable	Alta	Variable	Nano
Alta temperatura	Combustión	Variable	Alta	Variable	Nano
	Pirólisis	Alta	Variable	Estequiométrica	Nano partículas embebidas en micro-agregados
Fuentes biogénicas		Variable	Alta	Variable	Variable
Combinación de procesos		Alta	Alta	Estequiométrica	Nano

1.4 HAp a partir de fuentes biogénicas

La HAp puede ser obtenida de diversas fuentes, entre ellas de desechos biológicos como las escamas de pescado, cáscara de huevo, conchas marinas y huesos de animales bovinos y porcinos, sin embargo, sigue siendo un desafío para lograr la HAp nanoestructurada (18). Así, como obtenerla a partir de reactivos químicos como nitrato de calcio tetrahidratado y fosfato monoácido de diamonio o ácido fosfórico e hidróxido de calcio, entre otros (21,22), En la tabla 2 se muestra una revisión bibliográfica de las fuentes biogénicas empleadas para la extracción de HAp.

Tabla 2. Fuentes biogénicas para la obtención de HAp.

Año	Autor	Producto obtenido	Fuente biogénica	Rendimiento (% en peso)	Ref.
2011	Rajesh, R.	HAp	Huesos de pollo	60	(23)
2015	Mustafa, N.	HAp	Huesos y escamas de pescado	58	(24)
2016	Manoj, M.	HAp	Cascarón de huevo y jengibre	No se muestra	(25)
2018	Rincón, J.	HAp	Bovino	No se muestra	(26)
2018	Ulfyana, D.	HAp	Escamas de pescado	No se muestra	(27)

1.5 Colágeno

- El colágeno es una proteína de la matriz extracelular que en conjunto con otras proteínas forman el andamiaje celular o citoesqueleto. Tiene un cometido estructural de importancia en la matriz extracelular (material que ayuda a mantener a las células juntas), en el tejido conectivo dentro de los órganos entre ellos el hueso. El colágeno más familiar es el de hueso (tipo I) y tendones (tipo II), que forman estructuras gruesas parecidas a cuerdas como se puede observar en la Figura 4. Este tipo de colágeno es una estructura trimérica de unos 3000Å de longitud, 15Å de diámetro y una distancia entre estrías de 67nm en estado hidratado nativo (28,29).

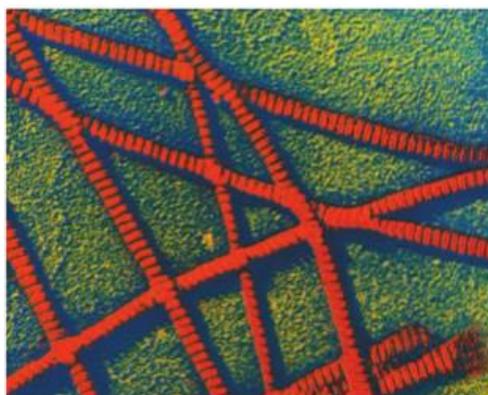


Figura 4. Micrografía electrónica de fibras de colágeno (28).

El colágeno es una de las principales proteínas estructurales del tejido conectivo de los vertebrados, constituye alrededor del 30% de sus proteínas totales. Está constituido en cadenas helicoidales de triple hélice, mostradas en la Figura 5, la

unidad básica de la fibra de colágeno es la molécula de tropocolágeno, una hélice triple de tres cadenas polipeptídicas identificadas como cadena α , éstas contienen una o más secuencias de polipéptidos (glicina (Gly)-X-Y), donde X e Y corresponde a prolina e hidroxiprolina (19).

El colágeno es una proteína helicoidal compleja que presenta una conformación dividida en cuatro estructuras: primaria que corresponde al triplete de aminoácidos, secundaria representa las hélices o cadenas α , la estructura terciaria es la triple hélice de la proteína y la estructura cuaternaria es la fibrilla de colágeno (7). En la Figura 6 se muestra la estructura del colágeno en algunas de las estructuras mencionadas anteriormente.

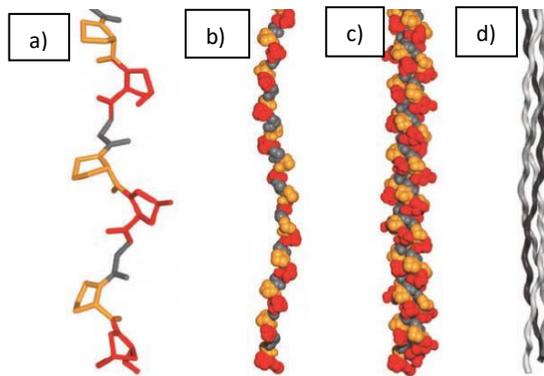


Figure 5. Estructura del colágeno, a) estructura secundaria aminoácidos constituyentes representado en gris glicina, en anaranjado prolina y en rojo hidroxiprolina. b) Modelo de espacio lleno de un polipéptido. c) Modelo de espacio lleno de la triple hélice. d) Esqueleto que muestra los tres polipéptidos (28).

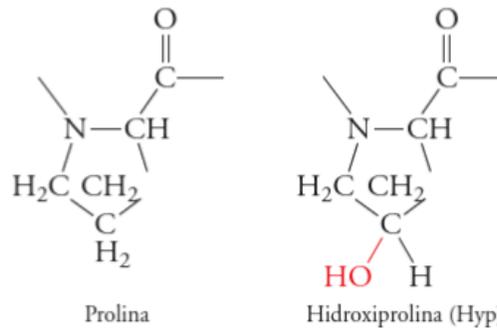


Figura 6. Aminoácidos esenciales del colágeno (28).

La triple hélice del colágeno es estabilizada por enlaces de hidrógeno. Una serie de interacciones unen el grupo N-H del esqueleto aportado por cada Gly a un grupo C=O del esqueleto de cadena. La geometría de la triple hélice impide que los grupos N-H y C=O de la estructura formen enlaces de hidrógeno entre sí, pero son capaces de interactuar con una red muy ordenada de moléculas de agua que rodean la triple hélice como una vaina (28).

Naturalmente, el colágeno promueve la reparación de heridas promoviendo la coagulación sanguínea. El colágeno tipo I forma parte de la red que previene fallas mecánicas prematuras en la mayoría de los tejidos (30). Es considerado una proteína fibrosa que contribuye funciones únicas a la piel, tendones, hueso y cartílago. Existen 29 tipos de colágeno (31), sin embargo, el colágeno tipo I es más común en mamíferos y peces.

El colágeno es ampliamente usado en las industrias cosmetológicas, biomédicas, farmacéutica por su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja antigenicidad (32), se ha extraído de piel y huesos de animales bovinos y porcinos. Sin embargo ambos han presentado enfermedades transmisibles al humano, es por ello que se pretende extraer el colágeno de animales que no tengan la capacidad de transmitir alguna enfermedad, por lo tanto se ha propuesto la obtención del colágeno a partir de animales marinos (33) así como de la piel de patas de pollo (34).

1.5.1 Tipos de colágeno

Existen 29 tipos de colágeno reportados en la literatura, sin embargo, la Tabla 3 muestra los más representativos.

Tabla 3. Tipos de colágeno en el cuerpo humano (35).

TIPO	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
I	Tejido conjuntivo de piel, huesos, tendones, ligamentos, dentina, esclerótica, aponeurosis y cápsulas de órganos.	Provee resistencia a fuerzas, tensiones y estiramiento.
II	Cartílago (hialino y elástico) y discos intervertebrales.	Provee resistencia a la compresión intermitente.
III	Vísceras (útero, hígado, bazo, riñón, etc.), músculo liso, vasos sanguíneos y piel fetal.	Provee sostén estructural para las células especializadas de órganos diversos y para los vasos sanguíneos.
IV	Láminas basales de epitelios, glomérulos renales y cápsula del cristalino.	Provee sostén y barrera de filtración.

TIPO	LOCALIZACIÓN	FUNCIÓN
VI	Forma parte de la matriz cartilaginosa que rodea los condrocitos.	Fija el condrocito a la matriz.
VII	Presente en las fibrillas de anclaje de la piel, ojos, útero y esófago.	Adhesión de la lámina basal a las fibrillas del tejido conjuntivo.
X	Producido por condrocitos en la zona de hipertrofia del disco epifisario normal.	Contribuye al proceso de mineralización ósea al formar redes hexagonales necesarias para organizar los colágenos tipos II, IX y XI dentro del cartílago.
XXI	Presente en encías, músculo cardíaco y esquelético y otros tejidos humanos con fibrillas de colágeno tipo I.	Se desempeña en el mantenimiento de la arquitectura tridimensional de los tejidos conjuntivos densos.

1.6 Antecedentes de la extracción de colágeno a partir de residuos de pescado.

Al ser el colágeno una proteína estructural importante para la industria médica, farmacéutica, cosmética y alimenticia, se han investigado diversas fuentes para su obtención, entre las que destacan la extracción de colágeno a partir de piel y tendones de mamíferos (bovinos y porcinos) (36), patas de pollo y escamas de pescado (37).

Recientemente, para aplicaciones médicas se ha optado por fuentes de extracción de colágeno más seguras, ya que algunos autores mencionan la posible transmisión de enfermedades hacia el receptor del colágeno, es por ello que se ha optado por optimizar los trabajos de aislamiento de colágeno en especies marinas (32).

En la Tabla 4 se enlistan algunos de los trabajos realizados respecto a la extracción de colágeno a partir de residuos de pescado, resaltando el rendimiento y la región de extracción, así como la especie y el desecho empleado para la extracción.

Tabla 4. Antecedentes de extracción de colágeno a partir de residuos de pescado.

Año	Especie	Fuente	Rendimiento [%]		Región del mundo	Autor
			CSA	CSP		
1996	Sardina	Escamas	--	71.1	Japón	Nomura (38)
2000	<i>Lateolabrax japonicus</i> (Lubina japonesa)	Piel	51.4	--	Japón	Nagai (39)
		Huesos	40.7	--		
		Aletas	5.2	--		
	<i>Scomber japonicus</i> (estornino)	Piel	49.8	--		
	<i>Heterodontus</i> (tiburón toro o bullhead shark)	Piel	50.1	--		
	<i>Katsuwonus pelamis</i> (listado)	Hueso	42.3	--		
2003	<i>Pagrus major</i> (pargo japonés)	Escama	--	2	Japón	Ikoma(40)
	<i>Oreochromis niloticus</i> (tilapia del nilo)	Escama	--	2		
2004	<i>Sardina</i>	Escama	--	50.9	Japón	Nagai(41)
	<i>Lateolabrax japonicus</i> (Lubina japonesa)	Escama	--	41		
	<i>Pagellus bogaraveo</i>	Escama	--	37.5		
2005	<i>Lutjanus vitta</i> (pargo)	Piel	9	4.7	Tailandia	Jongjareonrak(42)
2008	<i>Siganus fuscescens</i> (pez conejo)	Piel	3.6	--	Japón	Bae(43)
	<i>Kyphosus bigibbus</i> (carpa marrón)	Piel	3.6	--		
	<i>Myliobatis tobijei</i>	Piel	3.5-5.7	---		
	<i>Dasyatis akajei</i>	Piel	3.5-5.7	---		
	<i>Dasyatis laevigata</i>	Piel	3.5-5.7	---		
2009	<i>Cyprinus carpio</i> (Carpa)	Piel	41.3	--	China	Duan(44)
		Escama	1.35	--		
		Hueso	1.06	--		
2010	<i>Gadus morhua</i> (Bacalao báltico)	Columna vertebral	20	--	Polonia	Zelechowska(45)
2011	<i>Parupeneus heptacanthus</i>	Escama	0.46	1.2	Tailandia	Matmaroh(46)
2011	<i>Pangasianodon hypophthalmus</i> (pez gato)	Piel	5.1	7.7	Tailandia	Singh(47)
2013	<i>Istiophorus platypterus</i> (pez vela)	Piel	5.7	2.1	India	Tamilmozhi(48)
2015	<i>Lates calcifer</i> (barramundi)	Escama	0.38	1.06	Tailandia	Chuaychan(33)
2015	<i>Ctenopharyngodon idella</i> (carpa herbívora)	Piel	--	--	China	Liu(49)
		Escama	--	--		
		Aleta	--	--		

2016	<i>Oreochromis niloticus</i> (tilapia del nilo)	Escama Piel	3.2 27.2	-- --	China	Chen(50)
2017	<i>Oreochromis ssp</i> (tilapia roja)	Escama Piel	6.5 15.5	-- --	Colombia	Quintero(51)
		Hueso	5.6	--		
2018	<i>Dover sole</i>	Piel	19.2	--	India	Arumugam(52)

1.7 Regeneración de tejido óseo

La regeneración es el crecimiento de una parte afectada o perdida, específicamente para algún tejido. Los animales pueden regenerar algún tejido como la piel o el hígado. Si una parte del hígado es perdida o se lesiona por alguna patología, el hígado crece de nuevo a su tamaño original pero no con la morfología original (53).

La medicina regenerativa es un campo nuevo de la medicina que pretende cambiar el curso de enfermedades crónicas, así como regenerar órganos que fallan por la edad, enfermedad, daño o defectos genéticos. Esta área incluye a la regeneración de tejidos, así como la autoregeneración, algunas veces necesita de materiales biológicos externos para reconstituir las células y así tejidos u órganos (53).

El hueso natural es un ensamble complejo de nanofibras paralelas de colágeno tipo I y cristales de HAp. Dos tipos de células juegan un rol importante en la formación de hueso: osteoblastos (formadoras de hueso) y osteoclastos (absorbedores de hueso). Durante el proceso de osificación, los osteoblastos secretan colágeno tipo I y otras proteínas. La matriz extracelular puede no ser cristalina inicialmente, pero gradualmente se transforma en cristalina (7).

En la regeneración de tejido óseo, el colágeno sirve como un andamio y permite iniciar la mineralización del hueso(7).

1.7.1 Materiales usados en regeneración de tejido óseo

Los sustitutos de injertos óseos sintéticos tienen el objetivo de imitar la naturaleza física y mecánica del tejido nativo y promover la osteoconducción para la regeneración ósea, ésto mediante la liberación de fármacos y factor de crecimiento, los cuales se encuentran inmersos en el material). Algunos biomateriales se emplean para diseñar andamios biomiméticos, como polímeros naturales y sintéticos, cerámicas, metales y compuestos (54).

1.7.1.1 Cerámicos

Una cerámica es un material inorgánico no metálico que puede poseer una estructura cristalina. Las cerámicas suelen tener alta resistencia a la compresión y

baja ductilidad, lo que significa que proporcionan una alta resistencia a la deformación, pero tienden a fallar debido a su naturaleza frágil (54).

Se han utilizado fosfatos de calcio, sulfatos de calcio y vidrio bioactivo como matrices para la regeneración ósea. Estas sustancias, especialmente los fosfatos de calcio son candidatos ideales para su uso como matrices porque el componente inorgánico del hueso está compuesto por la cerámica hidroxiapatita de calcio. El fosfato de calcio y el vidrio bioactivo también se consideran biomiméticos, ya que estimulan la formación, precipitación y deposición de fosfato de calcio de la solución y pueden dar como resultado una mayor resistencia de la interfaz hueso-matriz (54).

La cerámica puede formar estructuras sólidas preformadas o formas inyectables que se endurecen in situ:

❖ Matrices preformadas

Las matrices preformadas pueden diseñarse de diferentes formas tales como bloques, gránulos, polvos con estructura de poros, diámetro e interconnectividad cerca del hueso. Este tipo de matrices están indicadas en defectos en los que la forma se puede predecir en gran medida antes de la cirugía, como en la osteotomía, resección tumoral o fusiones espinales. La restauración de un segmento de hueso largo entrante que ha sido dañado como resultado de una lesión o extirpación de un tumor requiere matrices preformadas para la integridad estructural.

❖ Matrices inyectables

Este tipo de matrices están indicadas para su uso en defectos trabeculares en los que el tejido esquelético dañado no soporta carga, en defectos contenidos cuando el tejido óseo estructural principal aún está intacto y en pequeños sitios de extirpación de tumores en el esqueleto apendicular.

La principal ventaja de los cementos sobre las matrices preformadas es la capacidad de rellenar defectos a medida y aumentar la resistencia a la compresión. El material para matrices inyectables debe estar en estado líquido o gelatinoso y se endurecerá en un ambiente acuoso a 37°C (temperatura corporal). Esta propiedad permite que el polímero se inyecte en una cavidad o espacio con defecto óseo a través de una jeringa de calibre estrecho, minimizando el sitio quirúrgico a una pequeña incisión cutánea (54).

1.7.1.2 Polímeros

Los polímeros biodegradables naturales, como el colágeno tipo I, la fibrina, el ácido hialurónico y el quitosano son materiales empleados en la regeneración de tejidos, sin embargo, el uso de estos materiales está limitado debido a su muy baja estabilidad mecánica. Existen polímeros sintéticos biodegradables, tales como polianhídridos, fumarato de polipropileno, policaprolactonas, polifosfacenos,

polilactida, poliglicólico, y copolímeros asociados (polilactida-co-glicólico), son ampliamente utilizados como medios de andamiaje para ingeniería de tejidos (54).

Los polímeros expresan diferentes atributos físicos, propiedades mecánicas, tiempos de degradación y modos de degradación que pueden elegirse sobre la base de la aplicación prevista de la matriz (54).

1.7.1.3 Metales

Los metales porosos son una familia en expansión de estructuras o andamios porosos que tienen la característica innata de una estructura de poros interconectados tridimensionalmente comparable al hueso trabecular (54).

Además, el titanio y el tantalio son biocompatibles, altamente resistentes a la corrosión, duraderos y no biodegradables con un módulo elástico muy similar al del hueso trabecular y pueden prepararse en muchas formas y texturas diferentes sin afectar su biocompatibilidad (54).

Sin embargo, el carácter bioinerte de su óxido superficial protector de formación natural no forma fácilmente una interfaz fuerte con el tejido circundante. Además, la rigidez relativamente alta del titanio, en comparación con el hueso circundante, puede dar lugar a problemas de protección frente a tensiones y posterior aflojamiento del implante (54).

1.8 Pescados como fuente de hidroxiapatita y colágeno

Recientemente se ha enfocado en la extracción de colágeno e hidroxiapatita a partir de componentes naturales que eviten la transmisión de enfermedades o que sean dañinos para el humano, se ha optado por extraer estos materiales a partir de pescado, sin embargo, no se tiene claramente los rendimientos de los materiales aislados ya que depende de varios factores como la especie, el manejo de los residuos del pescado y la técnica de aislamiento que se emplea.

En la literatura se ha encontrado que la variación en el rendimiento de colágeno extraído de residuos de pescado puede deberse al pH ácido que gobierna durante precipitación con NaCl ya que proviene de una solución de ácido acético, es por ello que algunos equipos de investigación colocan un buffer durante el proceso de precipitación con NaCl (42).

A nivel mundial, más del 50% de la captura de peces no se procesa como un producto alimenticio valioso y consta de millones de toneladas de desechos biológicos no deseados. Se desperdician enormes cantidades de subproductos de pescado y se genera un impacto ambiental no deseado. Recientemente, los desechos de escamas de pescado se han utilizado como una fuente de bajo costo para la preparación de HAp natural. La HAp preparada a partir de desechos de peces reveló mayor actividad biológica debido a la existencia de aniones esenciales como Cl^- y F^- , así como cationes (Mg^{2+} , Al^{3+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , K^+ y Na^+), la aparición de

ambos iones muestra mejoras en las aplicaciones biomédicas, principalmente para la restauración ósea rápida (18).

1.9 Compósito hidroxiapatita/colágeno

Los materiales compuestos se obtienen al unir dos materiales para conseguir una combinación de propiedades que no es posible obtener en los materiales originales. Estos compuestos pueden seleccionarse para lograr combinaciones poco usuales de rigidez, resistencia, peso, rendimiento a altas temperaturas, resistencia a la corrosión, dureza o conductividad (55). Los compuestos se pueden clasificar en tres categorías: con partículas, con fibras y laminares, dependiendo de la forma de los materiales.

Un material compósito es definido como la mezcla de dos o más materiales que muestran mejores propiedades que los materiales individuales. Los constituyentes son un refuerzo y una matriz. Las principales ventajas de los compósitos son su alta resistencia y rigidez, combinadas con baja densidad, en comparación con los materiales individuales, lo que permite una reducción de peso en algunos materiales. La fase del material que corresponde al refuerzo proporciona la resistencia y rigidez (56).

En la mayoría de los casos, el refuerzo es más duro, más fuerte y rígido que la matriz. El refuerzo suele ser una fibra o partícula. Los materiales compuestos en partículas tienen dimensiones que son aproximadamente iguales en todas las direcciones. Éstas pueden ser esféricas, plaquetas o cualquier otra geometría regular o irregular. Los compósitos de partículas tienden a ser mucho más débiles y menos rígidos que los compósitos de fibra continuas, generalmente son menos costosos. Los compósitos reforzados con partículas generalmente contienen menos refuerzo debido a dificultades de procesamiento y fragilidad (56).

Capítulo 2 METODOLOGÍA

La investigación que se describe en esta tesis se muestra en los párrafos siguientes. El objetivo fue extraer hidroxiapatita (HAp) y colágeno a partir de residuos de pescado que se obtuvieron en el mercado municipal de Azcapotzalco, así como del mercado “Maravillas” en Madrid, España. Las especies del pescado utilizado son *Oreochromis Hunteri* y *Oreochromis Niloticus* respectivamente, comúnmente conocidas como tilapia.

2.1 Diseño de experimentos

Los experimentos que se realizaron en cada etapa de la investigación como la extracción de colágeno, síntesis de hidroxiapatita y la síntesis del compósito se muestran en las Tablas 5, 6 y 7 respectivamente. Se planteó realizar 12 experimentos en total teniendo en cuenta 5 experimentos para la extracción de colágeno, 5 de extracción y síntesis de HAp y 2 para la síntesis del compósito.

Tabla 5. Experimentos para la extracción de colágeno.

COLÁGENO			
PIEL		ESCAMAS	
No.	Experimentos	No.	Experimentos
1	Extracción de colágeno a partir de Tilapia <i>O. Hunteri</i> .	1	Extracción de colágeno a partir de Tilapia <i>O. Hunteri</i> .
2	Extracción de colágeno a partir de Tilapia <i>O. Niloticus</i> .	2	Extracción de colágeno a partir de Tilapia <i>O. Niloticus</i> .
3	Escalamiento.		

Tabla 6. Experimentos para la síntesis de HAp.

HIDROXIAPATITA			
No.	ESCAMAS	No.	SINTÉTICA
1	Siguiendo la metodología de Ulfyana para la extracción a partir de Tilapia <i>O. Hunteri</i> .	1	Siguiendo la metodología de Sequeda.
2	Siguiendo la metodología de Ulfyana para la extracción a partir de Tilapia <i>O. Niloticus</i> .	2	Escalar el experimento.
3	Escalar el experimento.		

Tabla 7. Experimentos para síntesis del material compósito.

COMPÓSITO	
No.	DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO
1	Mezcla del fosfato de calcio durante diálisis del colágeno.
2	Añadir fosfato de calcio durante la gelificación.

Anteriormente se describieron los experimentos a realizar, en las tablas 8 y 9 se muestran el total de experimentos realizados para esta tesis, tanto las extracciones de los materiales precursores como del material compósito.

Tabla 8. Total, de experimentos realizados para la extracción de precursores para el material compósito

Material	Cantidad de experimentos para <i>O. hunteri</i>	Cantidad de experimentos para <i>O. niloticus</i>	Cantidad de experimentos de HAp sintética
Colágeno	1	2	0
HAp	1	3	1

Los experimentos relacionados a la extracción de colágeno solo se observó el rendimiento obtenido y el tipo de material extraído, el segundo experimento de *O. niloticus* fue un escalamiento del aislamiento para tener material disponible para la síntesis del material compósito.

Tabla 9. Experimentos realizados para la síntesis del compósito.

Relación de precursores colágeno/Hap	Cantidad de experimentos
65/35	3

2.2 Extracción de colágeno

El colágeno se obtuvo a partir de escamas y piel de los pescados siguiendo la metodología establecida por Liu con algunas modificaciones que se describen posteriormente (57).

Materiales y equipos

Los residuos de pescado se recolectaron de una pescadería ubicada en el mercado de la delegación Azcapotzalco, Ciudad de México y del mercado “Maravillas” en Madrid, España. Se utilizó hidróxido de sodio (NaOH) de Sigma Aldrich, ácido etilendiamino tetracético (EDTA), ácido acético, pepsina porcina, cloruro de sodio (NaCl), agua destilada, bolsa de diálisis de 7 a 30kDa, agitador magnético, cámara de enfriamiento, balanza granataria, centrífuga con control de temperatura, liofilizador.

2.2.1 Colágeno a partir de escamas

1. Recuperar las escamas del pescado, lavarlas con agua fría para eliminar todo residuo orgánico no deseado y almacenarlas hasta su utilización a una temperatura inferior a 4°C.
2. Sumergirlas en hidróxido de sodio a 0.1M con una relación 1:10 (p/v) por 36 horas con agitación continua y cambiando la solución cada 12 horas, esto con la finalidad de desproteínizar los residuos.
3. Descalcificar las escamas colocándolas en ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 0.5M por 3 días, cambiando diario la solución.
4. Lavar con agua destilada.
5. Extraer los residuos y sumergirlos en ácido acético 0.5M que contenga pepsina porcina al 0.1% en una relación 1:10 (p/v), la pepsina solo se emplea para extraer colágeno soluble en pepsina, para extraer colágeno soluble en ácido no se requiere de la pepsina.
6. Centrifugar a 12,500 rpm durante 40 minutos a 4°C.
7. Añadir Cloruro de sodio (NaCl) 2M, precipitar y posteriormente centrifugar nuevamente con las características anteriores.
8. Añadir ácido acético (CH₃COOH) 0.5M con una relación 1:10 (p/v).
9. Añadir Cloruro de sodio (NaCl) 2M, decantar y posteriormente añadir ácido acético (CH₃COOH) 0.5M.
10. Dializar con agua destilada en una bolsa de diálisis con corte MW 7kDa.
11. Liofilizar el material obtenido.

2.2.2 Colágeno a partir de piel

1. Retirar la piel del pescado, lavarla con agua fría para eliminar todo residuo orgánico no deseado, mantener una temperatura inferior a 4°C.
2. Cortar la piel en cuadros de 0.5cm para facilitar la extracción química del colágeno, mismos que deben sumergirse en hidróxido de sodio a 0.1M con una relación 1:10 (p/v) por 36 horas con agitación continua y cambiando la solución cada 12 horas, esto con la finalidad de desproteínizar los residuos.
3. Eliminar la grasa de la piel, en este proceso los residuos se someten a una solución de alcohol butílico al 10% por 36 horas con cambio de solución cada 12 horas, este proceso es exclusivo de la piel.
4. Lavar con agua destilada.

5. Extraer los residuos y sumergirlos en ácido acético 0.5M que contenga pepsina porcina al 0.1% en una relación 1:10 (p/v), la pepsina solo se emplea para extraer colágeno soluble en pepsina, para extraer colágeno soluble en ácido no se requiere de la pepsina.
6. Centrifugar a 12,000 rpm durante 40 minutos a 4°C.
7. Añadir Cloruro de sodio (NaCl) 2M, precipitar y posteriormente centrifugar nuevamente con las características anteriores.
8. Añadir ácido acético (CH₃COOH) 0.5M con una relación 1:10 (p/v).
9. Añadir Cloruro de sodio (NaCl) 2M, decantar y posteriormente añadir ácido acético (CH₃COOH) 0.5M.
10. Dializar con agua destilada en una bolsa de diálisis con corte MW 7kDa.
11. Liofilizar el material obtenido.

2.3 Síntesis de hidroxiapatita

En cuanto a la hidroxiapatita (HAp), se obtendrá a partir de la escama del pescado antes mencionado siguiendo la metodología que plantea Ulfyana et.al. (27).

Materiales y equipos

Para la síntesis de HAp se emplearon los siguientes materiales y equipos: escamas de tilapia, hidróxido de sodio (NaOH) de Sigma Aldrich, papel filtro, agitador magnético con calentamiento, balanza granataria, horno de secado, horno de calcinación y termómetro.

2.3.1 Síntesis de hidroxiapatita a partir de escamas

1. Lavar con agua corriente las escamas para retirar residuos biológicos.
2. Hervir las escamas con agua por 30 minutos.
3. Lavar con agua destilada y posteriormente escurrir.
4. Sumergir en hidróxido de sodio (NaOH) al 1% durante 2 horas, posteriormente lavar con agua destilada y dejar secar a temperatura ambiente por 24 horas.
5. Secar en horno a 110° por 5 horas.
6. Calcinar por 5 horas a una temperatura de 950°C.

2.3.2 Síntesis de hidroxiapatita por precipitación

1. Colocar nitrato de calcio tetrahidratado (Ca(NO₃)₂ · 4H₂O) en una concentración de 1M en un vaso de precipitados.
2. Añadir fosfato diamónico en una concentración 0.6M a una velocidad de 5mL/min.
3. Ajustar el pH, durante el proceso, entre 9 y 11 y con hidróxido de amonio (NH₄OH).
4. Todo el proceso se realiza a 90°, posteriormente se deja en agitación continua por una hora.
5. Se deja en reposo por 72 horas que corresponde al proceso de envejecimiento.
6. Lavar hasta alcanzar un pH neutro, secar al ambiente por 24 horas.

7. Secar en un horno de secado por 1 hora a 250°C y calcinar a 1000°C durante 3 horas.

2.4 Síntesis de compósito hidroxiapatita/colágeno

La síntesis del compósito reportada en la literatura se describe a partir de la síntesis de la HAp *in situ* (58), este proceso es mostrado en la Figura 7. En este trabajo la metodología cambia ligeramente, como se muestra en la Figura 6, ya que los materiales obtenidos son un fosfato de calcio y colágeno, eso quiere decir que la HAp ya está formada durante el proceso de extracción. Por ello se propone gelificar el colágeno siguiendo la metodología para la preparación de gel 3D propuesta por Advanced BioMatrix Innovative 3D Solutions y al mismo tiempo añadir el fosfato de calcio.

La síntesis del material compósito de HAp/colágeno se realiza mediante la combinación de 0.085g de HAp, 0.046g de colágeno liofilizado, 7.6 ml de ácido acético 0.02M, 2.74ml de solución buffer de fosfato (PBS) y 100µl de NaOH 1N.

Primero se disuelve el colágeno liofilizado en ácido acético a 0.02M, posteriormente se añade la HAp y se mezcla pipeteando. El proceso de gelificación y/o formación de colágeno fibrilar se efectúa a pH neutro para lo que se requiere añadir el PBS y el NaOH. Una vez mezclados estos compuestos se somete la solución a una temperatura de 37°C durante una hora.

En la Figura 8 se muestra el esquema de la metodología que se describe anteriormente.

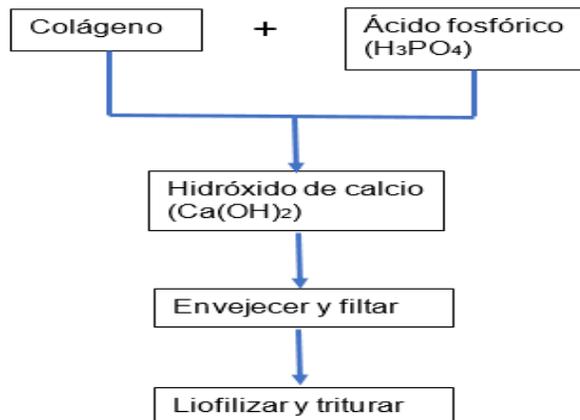


Figura 7. Esquema de la síntesis del compósito HAp/colágeno propuesta por Sasmal et.al.

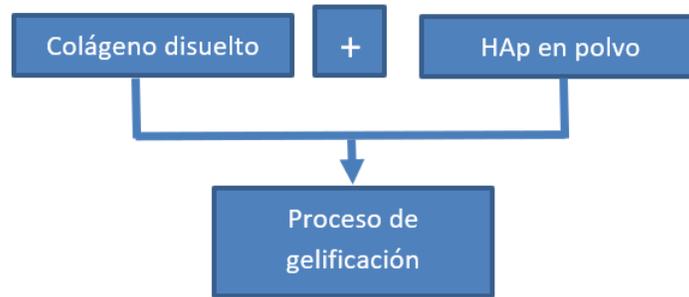


Figura 8. Síntesis de compuesto HAp/Colágeno.

2.5 Técnicas de caracterización fisicoquímicas

Estas técnicas de caracterización permiten la identificación de los materiales a estudiar a través de procesos físicos y químicos que interactúan con las muestras. En las Tablas 10, 11 y 12 se muestran las técnicas de caracterización fisicoquímica que se emplearon para la identificación del colágeno, HAp y del material compuesto, respectivamente.

Tabla 10. Técnicas para la caracterización del colágeno.

COLÁGENO	
TÉCNICA	FUNCIÓN
Electroforesis	Análisis bandas por peso molecular.
Microscopía de fuerza atómica (AFM)	Análisis topográfico.
Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	Análisis de grupos funcionales característicos.

Tabla 11. Técnicas para la caracterización de HAp.

HIDROXIAPATITA	
TÉCNICA	FUNCIÓN
Difracción de rayos X	Determinar la estructura cristalina.
Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	Análisis de grupos funcionales característicos.
Microscopía electrónica de barrido (MEB)	Observar morfología de la superficie.
Análisis químico elemental (EDS)	Analizar elementos presentes en la muestra y su relación molar.
Análisis químico elemental (ICP)	Analizar y corroborar elementos presentes en la muestra.
Análisis termogravimétrico	Determinar la temperatura de calcinación de la escama

Tabla 12. Técnicas para la caracterización del material compuesto.

COMPÓSITO HAp/COLÁGENO	
TÉCNICA	FUNCIÓN
Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	Análisis de grupos funcionales característicos.
Difracción de rayos X	Determinar la cristalinidad.
Microscopía electrónica de barrido	Observar morfología de la superficie.

Capítulo 3 RESULTADOS

Se ha extraído colágeno a partir de escamas y piel de pescado, se ha sintetizado HAp y se han procesado las escamas para la obtención de HAp. Los materiales se han sometido a algunas técnicas de caracterización y los resultados se describen a continuación.

La primera caracterización realizada fue un análisis termogravimétrico (TGA) de la escama de tilapia para identificar la temperatura de calcinación, en la Figura 9 se muestra este análisis, en el cual se observa que no existe pérdida de masa a temperaturas superiores a 800°C, lo que confirma que la temperatura de calcinación de la escama ideal para extraer el óxido de calcio puede efectuarse a 900°C.

La literatura menciona que la primera pérdida de masa se presenta entre 100 y 300°C representando una pérdida del 30%, la cual está asociada a la pérdida de agua; a una temperatura entre 300 y 600°C se presentan pérdidas del 30 al 40% por descomposición de materia orgánica y una pérdida de masa entre 1 y 2% alrededor de 600°C representando la carbonización (59).

En el análisis realizado en el laboratorio con una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de flujo de 50mL/min y una rampa de calentamiento de 10°C/min hasta alcanzar 900°C. El resultado se muestra en la Figura 9, en la cual se observa una pérdida del 21% entre 0 y 110°C que se corresponde con la pérdida de agua, entre 120 y 550°C se muestra una pérdida del 60% que se corresponde con materia orgánica y alrededor del 18% que representa una descarbonización (pérdida de carbonos presentes en el carbonato de calcio) en temperaturas superiores a 600°C.

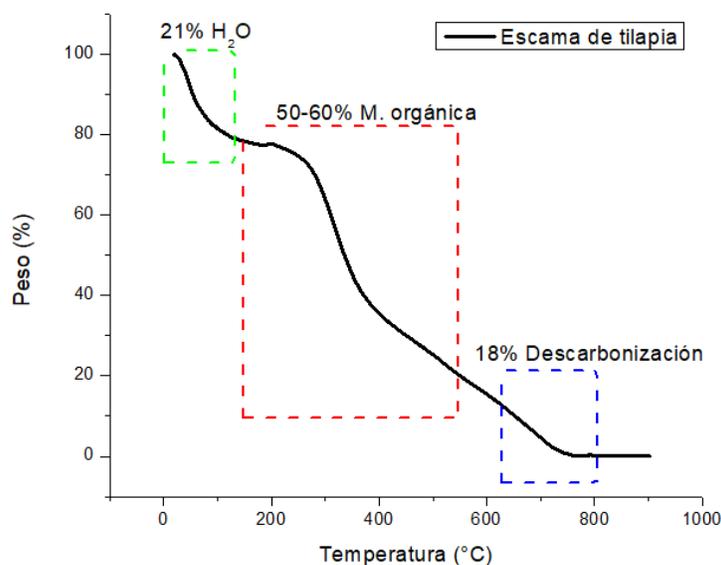


Figura 9. Análisis termogravimétrico de escama de tilapia.

3.1 Colágeno

Se ha extraído colágeno a partir de escamas y piel del pescado tilapia (*Oreochromis hunteri* y *Oreochromis niloticus*), el cual ha sido caracterizado por:

- ❖ Espectroscopía UV-Vis: técnica en la que se observa principalmente una banda de absorción característica entre 210 y 240 nm como lo reporta la literatura, (31,60) sin embargo, junto con esa banda de absorción se muestran algunas otras que podrían indicar alguna especie contaminante que se encuentre presente en la muestra. La Figura 10 muestra el espectro UV-VIS del colágeno, la banda característica que reporta la literatura se encuentra enmarcada en el recuadro verde, las siglas CPTdil corresponden a colágeno de piel de tilapia diluido mientras que CPT es colágeno que se encuentra en una dilución mínima. Las siglas CETdil y CET representan el colágeno diluido y con una disolución menor respectivamente, extraído a partir de escamas de tilapia.

Al presentarse las bandas máximas de absorbancia entre el rango reportado en la literatura, se espera que sea colágeno el material obtenido, pero es necesario realizar otros análisis complementarios, que brinden la certeza de que el material extraído sea colágeno, por ejemplo, la cuantificación de hidroxiprolina por espectroscopía UV-Visible, electroforesis y microscopía de fuerza atómica (AFM).

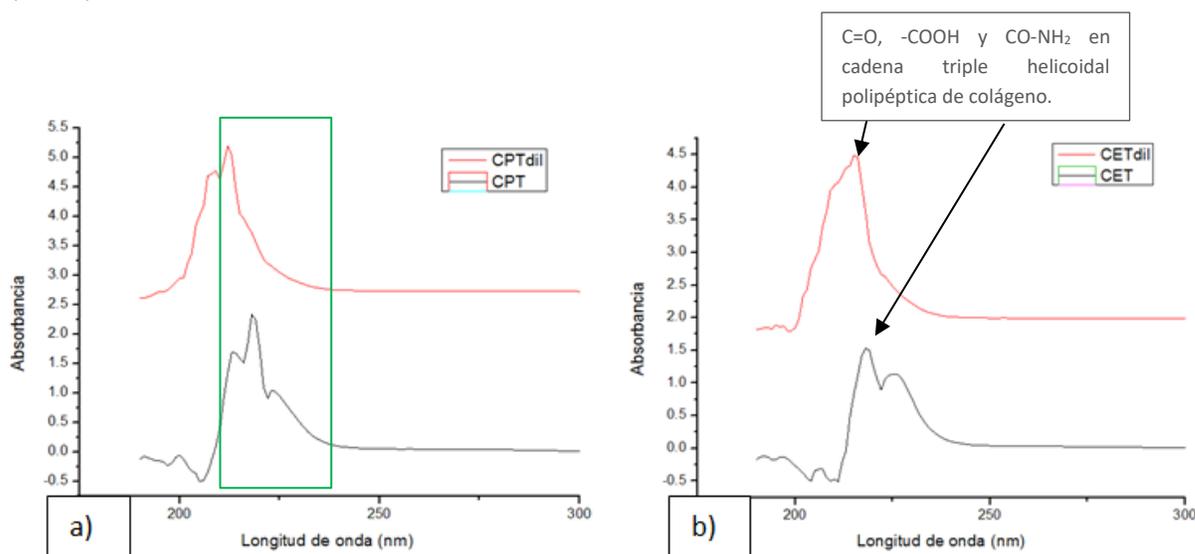


Figura 10. Espectros UV-Visible de colágeno tipo I extraído a partir de *Oreochromis hunteri*. a) Se muestra el espectro del colágeno extraído de piel y b) es del colágeno extraído de escamas.

- ❖ Espectroscopía infrarroja (FT-IR): las muestras del colágeno aislado de piel y escamas se han caracterizado por esta técnica ya que en ella podemos observar grupos funcionales que son característicos de proteínas como el colágeno, en la Figura 11 se muestran los espectros obtenidos. Se puede observar que al compararlo con la literatura el espectro que tiene mayor parecido con el espectro reportado es del colágeno liofilizado, sin embargo la intensidad en la Figura 11 a) parece menor al compararla con la reportada en la literatura (57).

Al graficar únicamente el colágeno extraído de escama de tilapia liofilizado, Figura 11 b) se corrobora que el espectro es muy similar al reportado ya que se encuentran los grupos amida I, II y III en las longitudes de onda 1630 cm^{-1} , 1548 cm^{-1} y 1239 cm^{-1} , respectivamente, en este espectro también se presentan bandas bien definidas en 2933 cm^{-1} y 3324 cm^{-1} que se corresponden con amida B y A, respectivamente. Según Doyle, las vibraciones que se presentan alrededor de las longitudes de onda 3400 y 3440 cm^{-1} se corresponden a estiramientos NH cuando el grupo NH de un péptido está asociado con un enlace de hidrógeno. Y respecto a las bandas de amida B, éstas están asociadas con el estiramiento asimétrico de metileno (CH_2) (31).

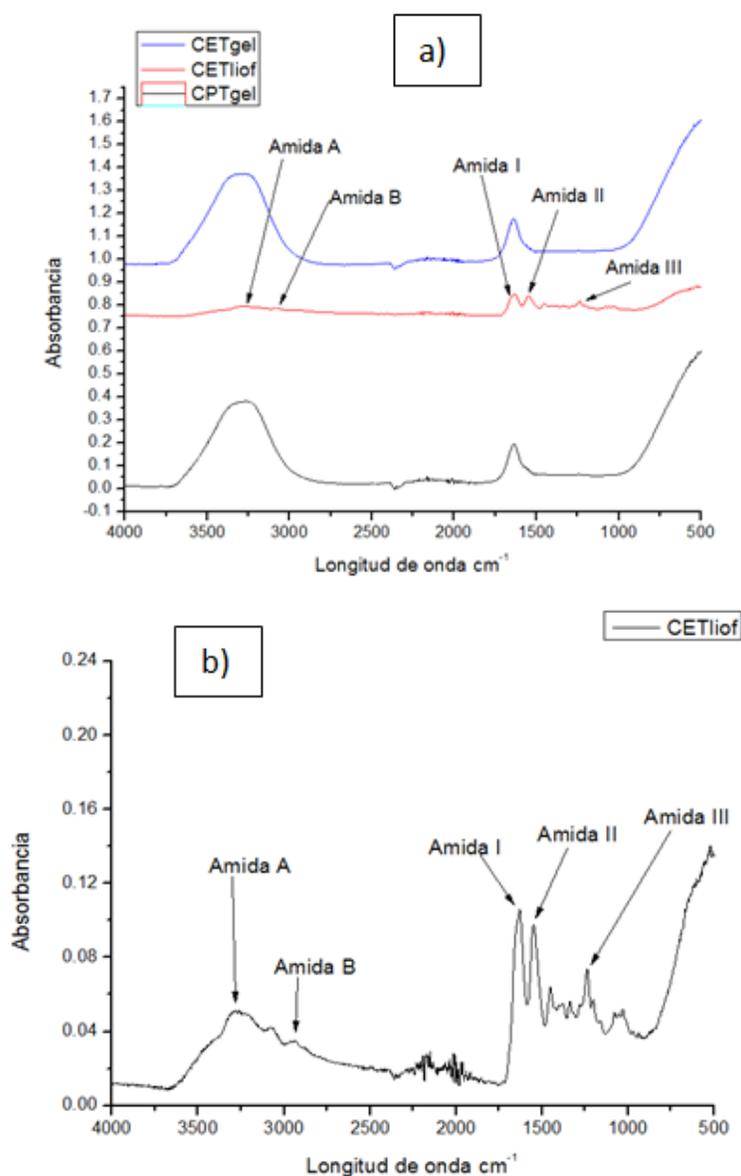


Figura 11. Espectros FT-IR de colágeno extraído de escamas y piel de tilapia. a) Colágeno de escamas en gel (azul), colágeno de escamas liofilizado (rojo) y colágeno de piel en gel (negro). b) Colágeno de escamas liofilizado, gráfico amplificado.

En la Figura 12 a) se muestran los espectros en modo comparativo del colágeno extraído a partir de piel y escamas de tilapia y en la Figura 12 b) se muestra el ya reportado en la (ColEE y ColPE), es necesario destacar que el espectro se obtuvo en una solución gelosa, es por ello que aparece una banda significativa entre 3000 y 3500 cm^{-1} correspondiéndose con enlace O-H de agua .

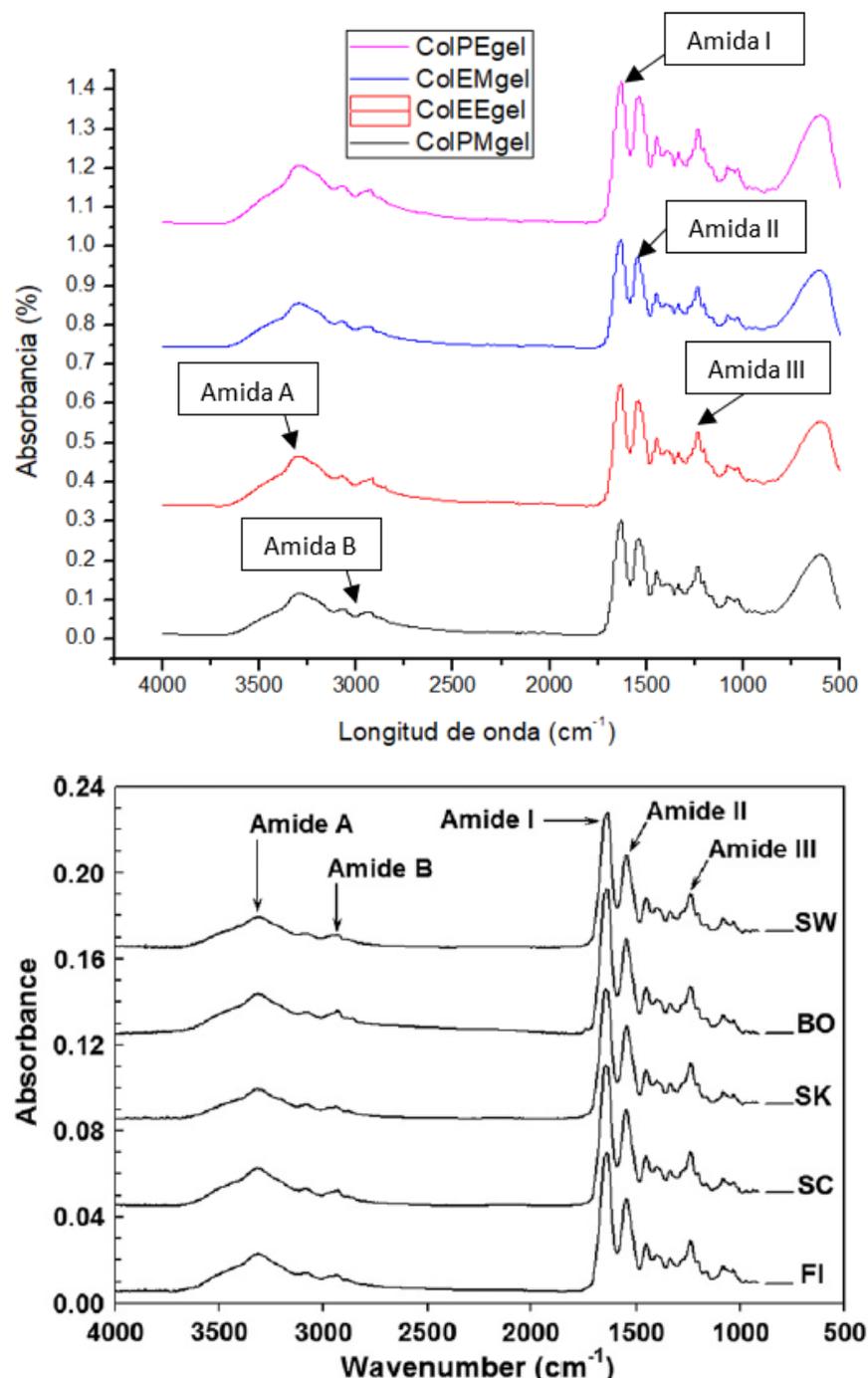


Figura 12. a) Espectro FTIR de colágeno extraído de escamas y piel de *O. niloticus* (ColEEgel y ColPEgel, respectivamente) y colágeno extraído de escamas y piel de *O. hunteri* (ColEMgel y ColPMgel, respectivamente) b) Espectro obtenido de la literatura para fines ilustrativos.

- ❖ Microscopía de fuerza atómica (AFM): imágenes correspondientes a la Figura 13. En ellas se observan las fibras características del colágeno, presentando una distancia medida entre estrías de 63.14nm, con ello se puede corroborar una vez más la presencia del colágeno extraído. Se observa que el acomodo de estas fibras es aleatorio, la muestra en la cual se realizó este análisis fue neutralizada previamente y se obtuvo un gel con una concentración del 100% colágeno.

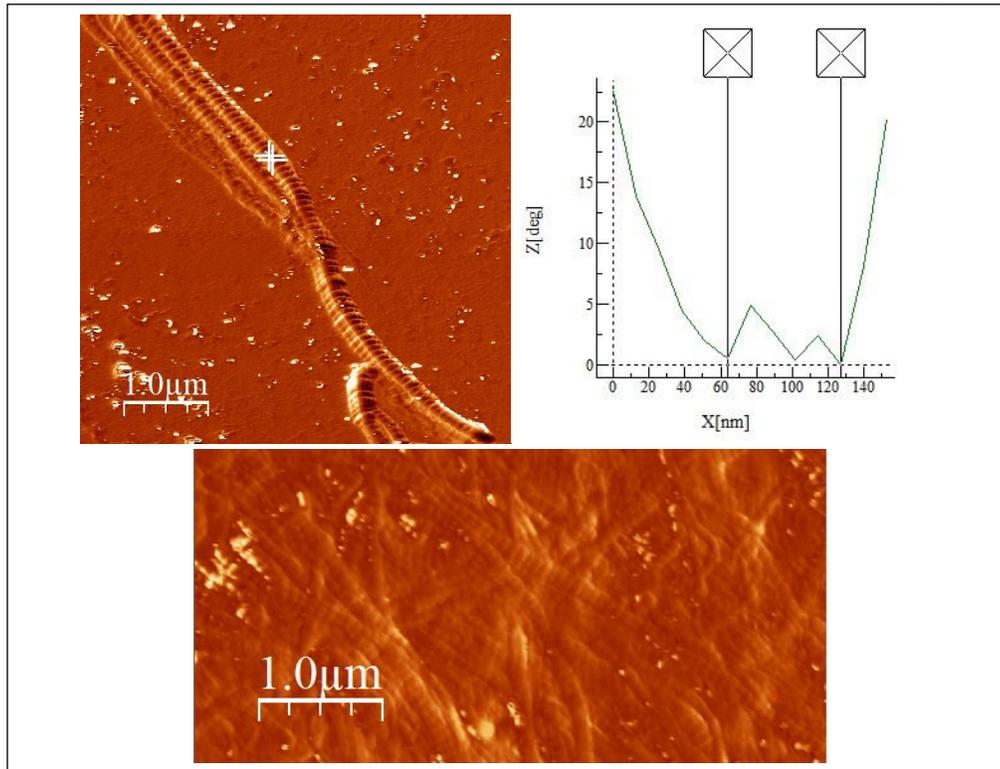


Figura 13. Fibra de colágeno extraída de piel de Tilapia.

- ❖ Electroforesis: técnica reportada para corroborar la presencia del colágeno, en ella se realiza la separación de la proteína por su tamaño (peso molecular) y carga eléctrica. En la Figura 14 se muestra el gel electroforético con las bandas correspondientes al colágeno tipo I que se ha comparado con colágeno extraído de cola de rata. Como se puede observar, en la técnica empleada se presenta que el peso molecular de la proteína se encuentra entre 100 y 250kD haciendo referencia a las cadenas alfa 1 y alfa 2 que se encuentran presentes en el colágeno tipo I (1).

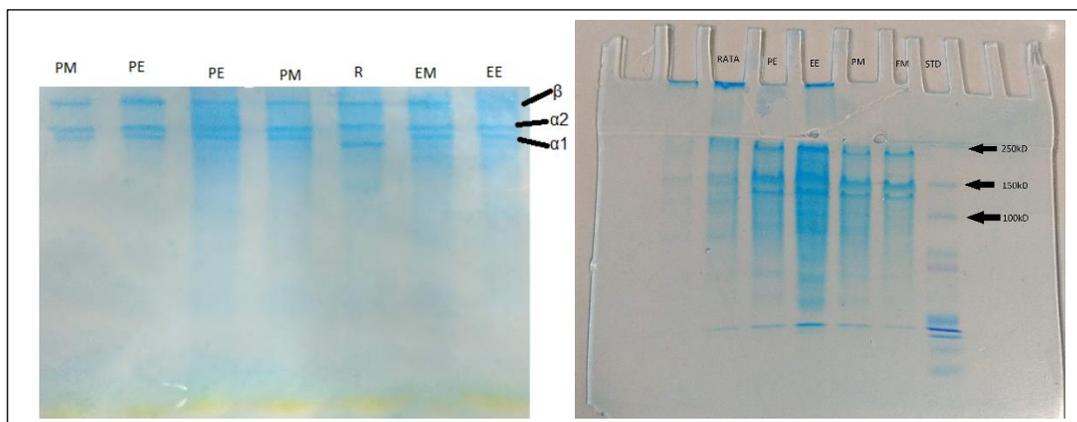


Figura 14. Electroforesis de colágeno extraído de escamas y piel de pescado comparado con colágeno de cola de rata. (PM: colágeno extraído de piel de *O. hunteri*, PE: colágeno extraído de piel de *O. niloticus*, R: colágeno extraído de cola de rata, EM: colágeno extraído de escamas de *O. hunteri*, EE: colágeno extraído de escamas de *O. niloticus* y STD estándares de peso molecular de proteínas).

Con las técnicas de caracterización antes presentadas se corrobora que la extracción de colágeno a partir de residuos de pescado es exitosa. Un parámetro que se pretende comprobar es el rendimiento que se obtiene en la extracción para el cual se emplea la ecuación mostrada abajo, obteniendo un rendimiento de la extracción de colágeno a partir de escamas de *O. hunteri* de 1.86% y de 2.05% para la extracción de colágeno a partir de piel, con respecto a la tilapia *O. niloticus* se obtuvieron 11.14% y 11.76% para la extracción de colágeno a partir de escamas y piel, respectivamente:

$$\text{Ec. 1} \quad \text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{peso de colágeno liofilizado (g)}}{\text{peso inicial del residuo (g)}} \times 100 \quad (33)$$

Con ello se comprueba que el método experimental que se siguió es repetible y que los datos reportados son muy similares a los obtenidos con esta especie, a pesar de las diferencias en condiciones ambientales de crecimiento.

3.2 Hidroxiapatita

Se ha obtenido un fosfato de calcio a partir de las escamas de tilapia, para identificarlo se ha caracterizado por diversas técnicas como se muestra a continuación. Además, se sintetizó HAp en el laboratorio por el método de coprecipitación, a continuación, se presentan los resultados obtenidos de su caracterización.

La síntesis de HAp a partir de escamas de pescado se ha realizado de acuerdo con la metodología establecida por Ulfyana et.al. (27), el proceso se ha culminado hasta

la obtención de óxido de calcio a partir de las escamas de pescado, según lo reportado por Ulfyana et. al. El material obtenido se ha analizado por difracción de rayos X, microscopía electrónica de barrido a través de electrones secundarios y análisis elemental EDS.

- ❖ Microscopía electrónica de barrido: en la Figura 15a se muestran las imágenes del material extraído de escamas de *O. hunteri*, obtenidas con el equipo Zeiss SUPRA 55VP, mediante la técnica de detección de electrones secundarios. En la Figura 15b se muestran las micrografías obtenidas del material extraído a partir de escamas de *O. niloticus* con el microscopio electrónico Hitachi TM-1000, por la misma técnica. En las micrografías de la Figura 15 a) se observa que se trata de un material que presenta una morfología de block y se aprecia que las estructuras aunadas al block tienen bordes curvos y granulados, en ambas micrografías se muestra un material poroso (lo que es ideal para la proliferación y crecimiento celular) y que presenta rugosidad, así como una estructura densa de aglomerados (16).

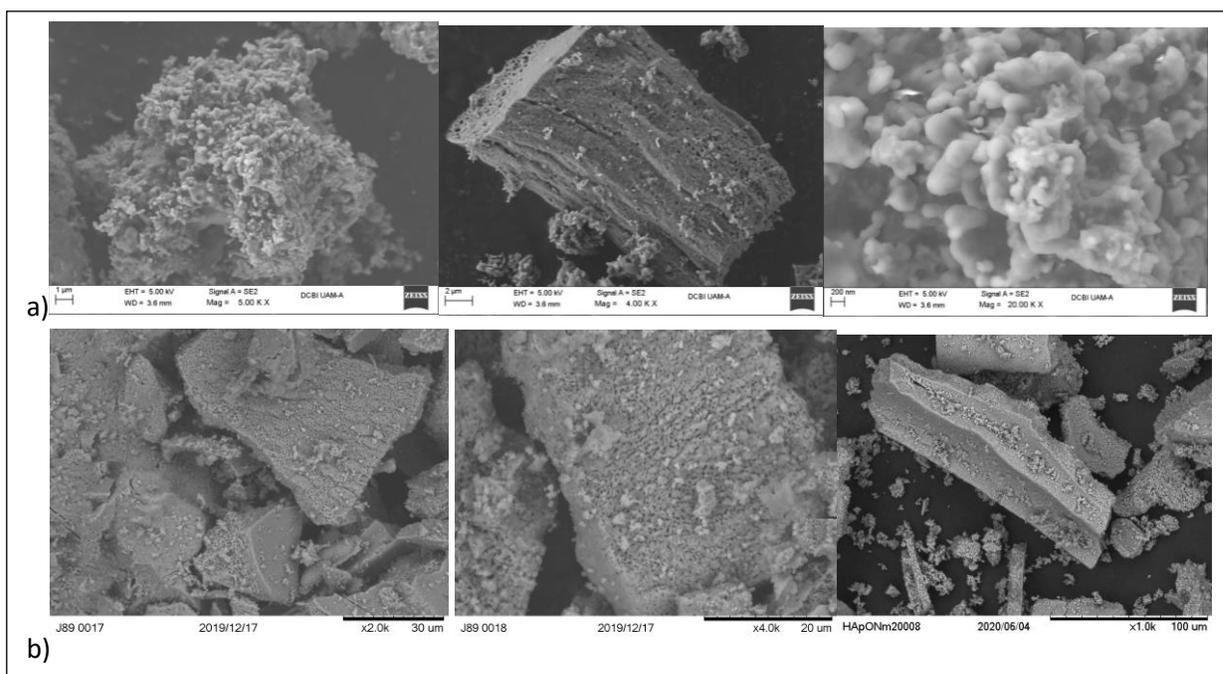


Figura 15. Micrografías MEB de fosfato de calcio obtenido de escamas de a) *O. hunteri* b) *O. niloticus*.

- ❖ Análisis elemental por espectroscopía de rayos x de energía dispersa (EDS): en esta técnica se corroboran los elementos constituyentes del material a analizar. En la Figura 16a se muestran los resultados del material extraído a partir de *O. hunteri* obtenidos a través de un análisis de polvos, a una velocidad de aceleración de 20kV. En la Figura 16b se muestra el análisis químico realizado al fosfato de calcio extraído a partir de escamas de *O. niloticus*. En estos resultados se muestra que el material extraído de escamas contiene fosfato,

calcio, sodio, magnesio y carbono; la literatura menciona que estos metales en su forma iónica son beneficiosos en aplicaciones médicas (18).

La relación molar de Ca/P de la muestra de tilapia *O. hunteri* es de 1.68 y 2.6 para la muestra extraída de tilapia *O. niloticus*, la relación se obtuvo dividiendo el % en peso del calcio entre el % en peso del fósforo. El carbono que se presenta en el análisis es resultado de la cinta doble cara de carbón sobre la que fue montada la muestra. La Figura 17 muestra la región sobre la cual se obtuvo el análisis elemental para ambas muestras.

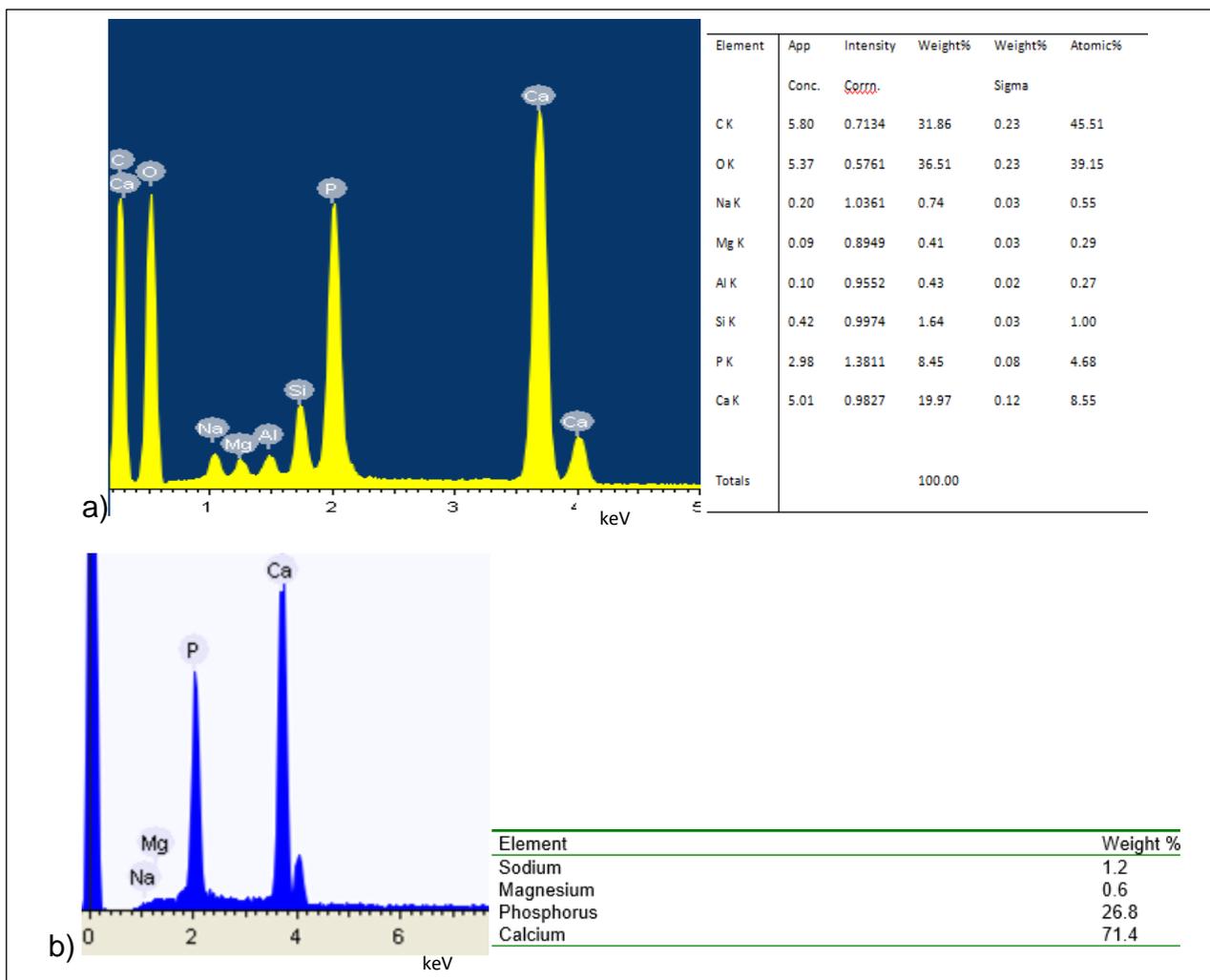


Figura 16. Análisis EDS del material obtenido a partir de escamas de a) *O. hunteri* y b) *O. niloticus*.

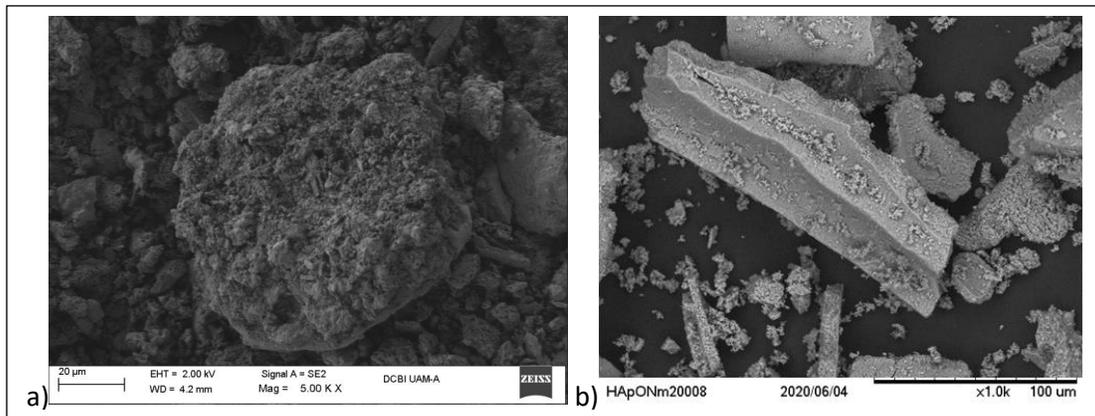


Figura 17. Región del material extraído sobre la que se realizó el EDS, a) *O. hunteri* y b) *O. niloticus*.

- ❖ Difracción de rayos X (DRX): en la Figura 18 se muestran los difractogramas de los materiales obtenidos a partir de escamas indicando una similitud con hidroxiapatita que ha sido comparada con la simulación de hidroxiapatita obtenida con el software Mercury. Como se puede ver en el DRX, se confirma la presencia de una estructura similar a la de HAp, se observan reflexiones bien definidas lo que indica un material cristalino, además de la coincidencia con las reflexiones de la simulación de hidroxiapatita a partir de su CIF, obtenido de la página del centro de base de datos cristalográficos Cambridge¹.

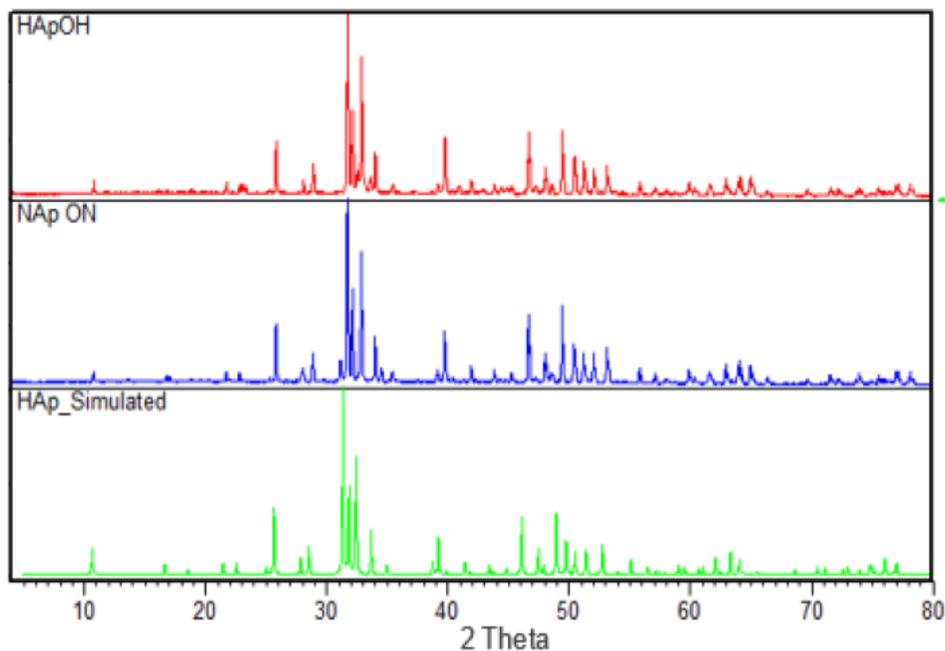


Figura 18. DRX de escamas procesadas.

¹ The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC). Disponible en: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/>

- ❖ Análisis químico por plasma de acoplamiento inductivo (ICP): este análisis se realizó con la finalidad de corroborar los elementos químicos de las muestras. En la Tabla 13 se muestran los resultados, encontrando similitud en la presencia de los elementos constituyentes de las muestras. Los materiales extraídos a partir de escamas de pescado presentan en su composición calcio y fósforo, principalmente, además de algunos otros elementos como magnesio y sodio en menor proporción. Cabe señalar la diferencia con la HAp sintética (HAp_s), en la cual sólo se observa la presencia de calcio y fósforo.

Tabla 13. Análisis químico elemental (ICP)

Nombre	Línea	Concentración (wt-%)
HApOH	P	15.09
	Ca	37.29
	Na	2.71
	Mg	0.69
HApON	Al	0.00
	P	15.04
	Ca	37.41
	Na	1.14
HAp_{sc}	P	15.01
	Mg	0.4787
	Ca	36.96
	Na	0.8029
HAp_s	P	14.43
	Ca	39.81

HAp_{sc}: hidroxiapatita sin procesamiento químico, solo lavado, secado y calcinación.

- ❖ Análisis por infrarrojo (FTIR): en la Figura 19 se muestran los resultados del análisis por infrarrojo de la extracción de HAp a partir de las escamas de tilapia *O. hunteri* y *niloticus*. Se presenta en transmitancia, en este análisis se pueden observar bandas bien definidas alrededor de 575cm^{-1} y 608cm^{-1} que se atribuyen al modo de flexión del fosfato (PO_4^{3-}), también se muestran pequeñas bandas en 3568cm^{-1} y 629cm^{-1} que representan vibraciones de estiramiento del grupo hidroxilo (OH^-), y las bandas entre 1047 y 1093cm^{-1} que representan el modo de estiramiento de PO_4^{3-} . Además, en el espectro de hidroxiapatita extraída a partir de *O. hunteri* se presenta otra banda alrededor de 1419 y 1464cm^{-1} que está asociado con la flexión de HAp de carbonato tipo-B (61,62).

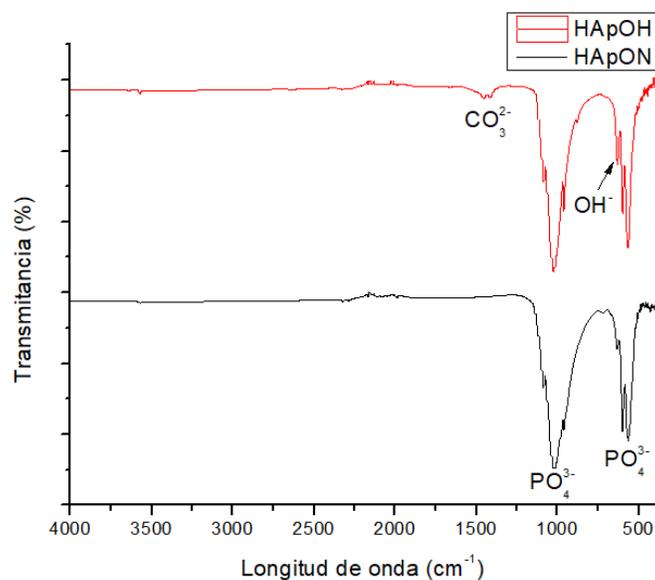


Figura 191. Análisis por FTIR de hidroxiapatita extraída de tilapia *O. hunteri* (HApOH) y tilapia *O. niloticus* (HApON).

3.3 Compósito

El material compósito fue caracterizado por algunas de las técnicas físicoquímicas empleadas en sus precursores. Como se puede apreciar, el material obtenido presenta una coloración blanca (Figura 20 a) con una estructura entretrejida (Figura 20 b), muy parecido al hueso humano (Figura 21). Por otro lado, dado el colágeno extraído de piel presenta una coloración ligeramente beige, el compósito también presenta esta coloración (Figura 20 c), mientras que el material compósito extraído de escamas es más claro (Figura 20 d). En ambos casos, sigue presente la porosidad.

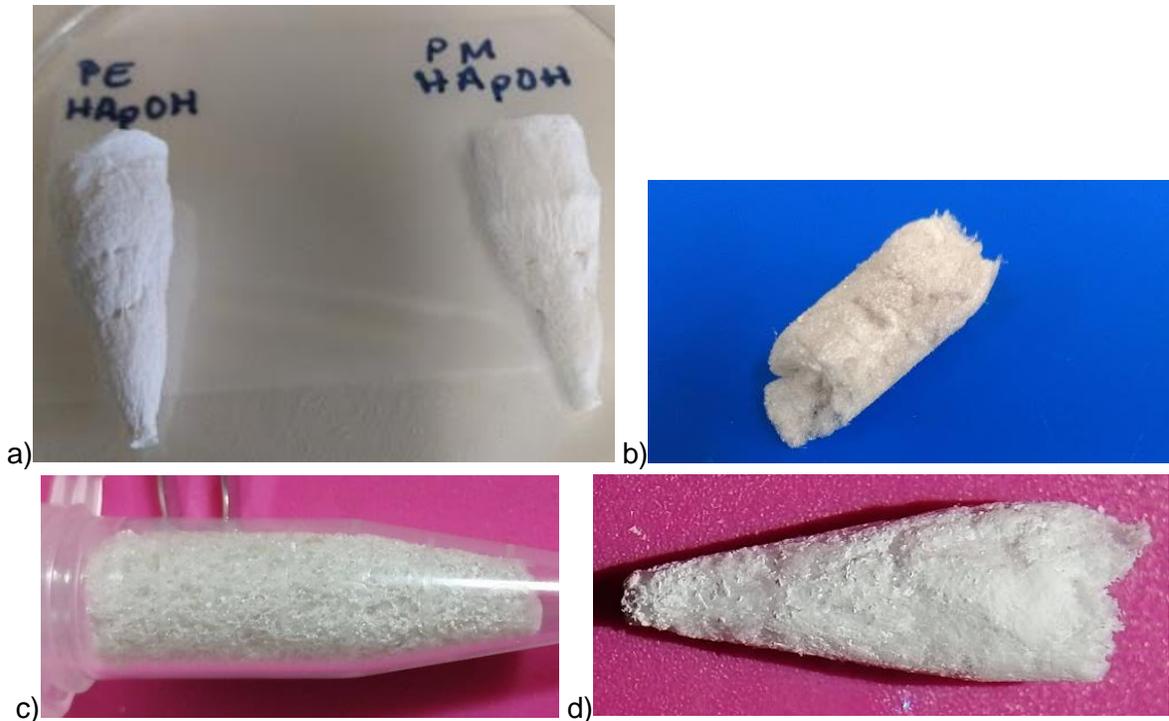


Figura 20. Apariencia física del material compuesto de HAp/colágeno sintetizado en una relación de 35/65. a) material sintetizado a partir de colágeno extraído de piel de *O. hunteri* (PM) y *O. niloticus* (PE), b) compuesto en el que se puede apreciar la porosidad del material. c) compuesto sintetizado con colágeno extraído de piel y d) compuesto sintetizado con colágeno extraído de escamas.

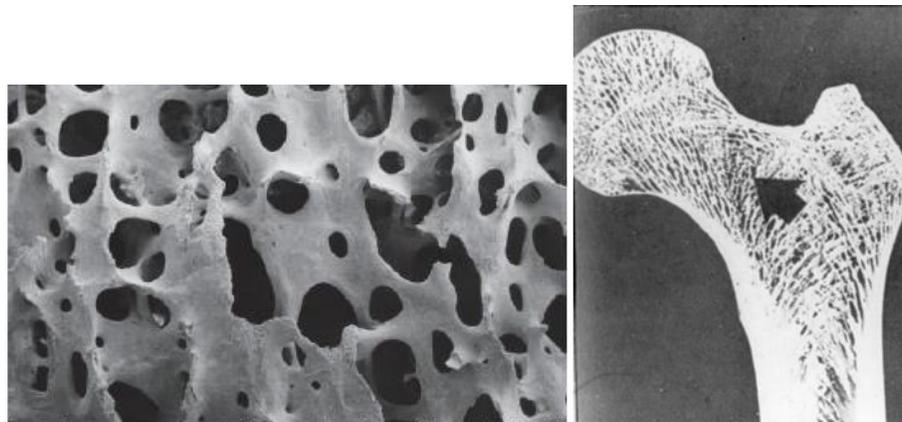


Figura 21. Estructura interna del hueso humano, a) fotomicrografía electrónica de barrido de la arquitectura tridimensional del hueso esponjoso. b) Aspecto macroscópico, radiografía de fémur. Flecha señalando tejido óseo trabecular (esponjoso) (9).

- ❖ **Análisis térmico:** En la Figura 22 se muestra la gráfica donde se compara el compuesto sintetizado a partir de colágeno extraído de piel e hidroxapatita de *O. niloticus* (HAp1), HAp sintética fue empleada en el compuesto identificado como HAp3 y para la muestra “HAp2” se utilizó HAp *O. hunteri*. En este análisis se muestra una diferencia significativa en la pérdida de peso en la muestra con HAp2 lo cual representa la presencia de impurezas presentes en la muestra extraída. En las muestras sintetizadas “HAp3 e HAp1” se muestran

gráficas similares perdiendo peso en las mismas temperaturas lo que indica la estabilidad en la extracción de HAp a partir de escamas y que al inicio del calentamiento existe una pérdida del material orgánico (colágeno).

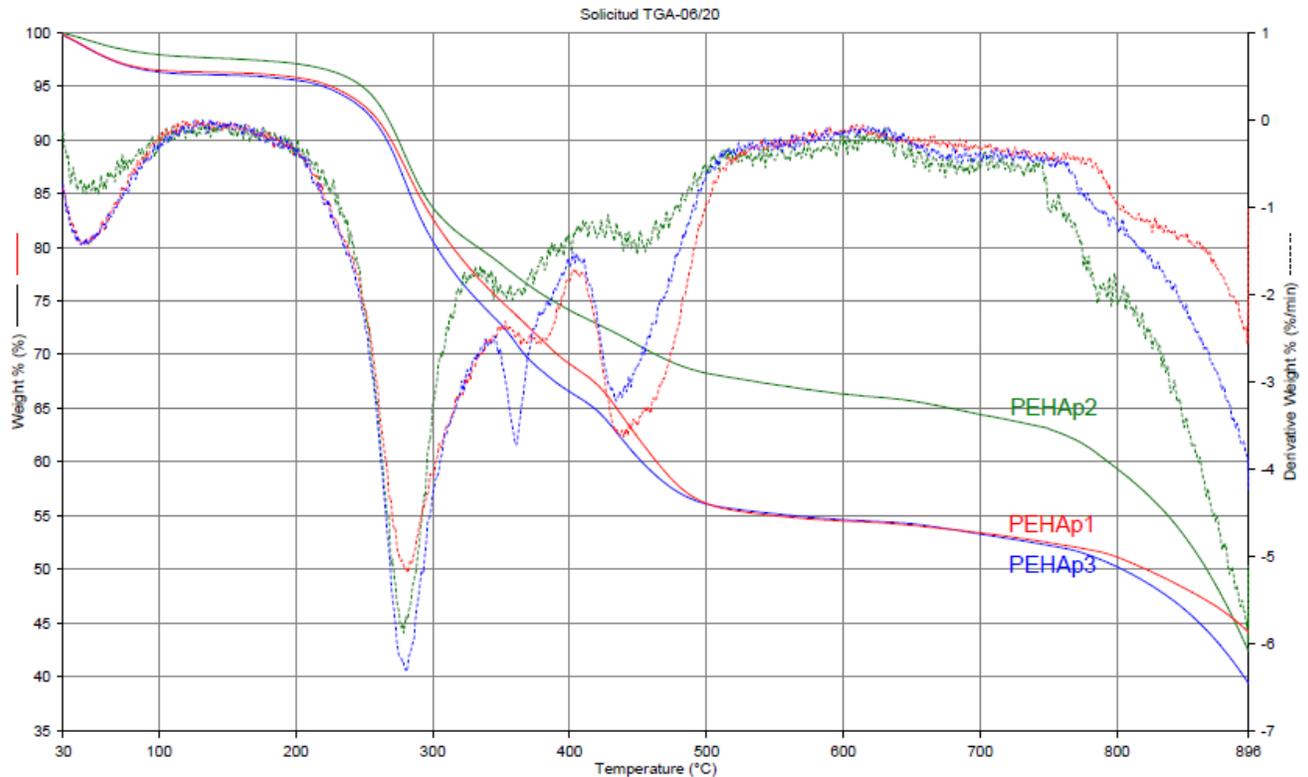


Figura 22. Análisis térmico de material compuesto.

❖ Análisis por infrarrojo (FTIR):

En la Figura 23 se muestran los espectros IR de los materiales obtenidos, de arriba hacia abajo se muestra la HAp, colágeno y el material compuesto con una relación 35% y 65% de sus componentes iniciales, respectivamente. Se puede observar la similitud que existe en los espectros de los materiales de partida con el compuesto. Se muestra claramente que ambos materiales son constituyentes del material compuesto. En la Figura 23 b) se muestra el espectro de un material compuesto sintetizado por un método de mineralización intrafibrilar, al compararlo con el espectro que se obtuvo en el laboratorio, se muestra gran similitud en las bandas bien definidas que se sobresalen y que se corresponden con los materiales de inicio.

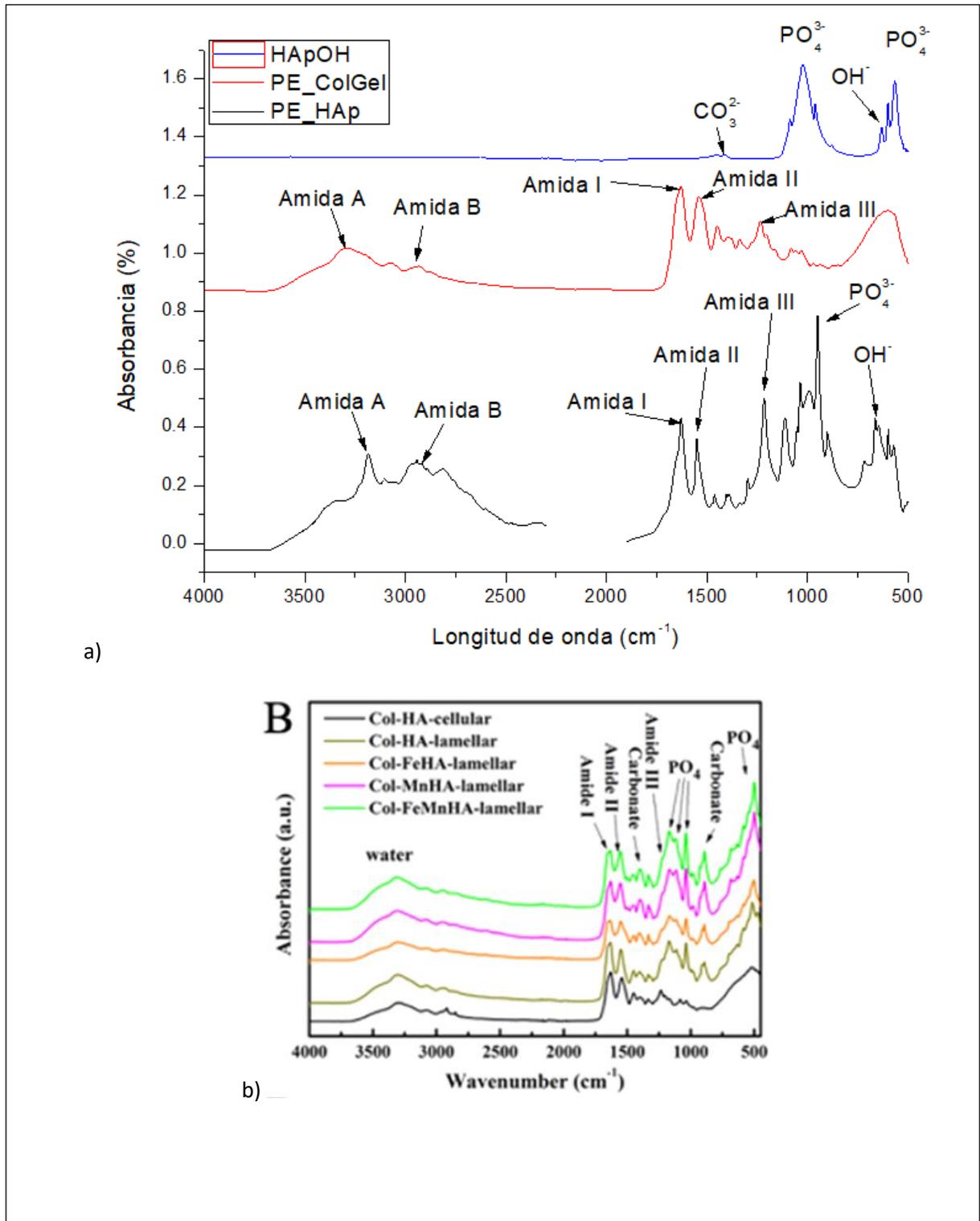


Figura 23. a) Espectro FTIR de colágeno, HAp y el material compósito, b) imagen del espectro del compósito HAp/colágeno reportado en la literatura (63).

- ❖ Microscopía electrónica de barrido (MEB): en la Figura 24 se muestran las micrografías del material compuesto, en ellas se pueden apreciar las fibras del colágeno que se entrecruzan y la presencia de HAp depositada sobre estas fibras, la HAp se puede observar en tonos más blancos y brillosos. En las imágenes se aprecia cierta porosidad en el material.

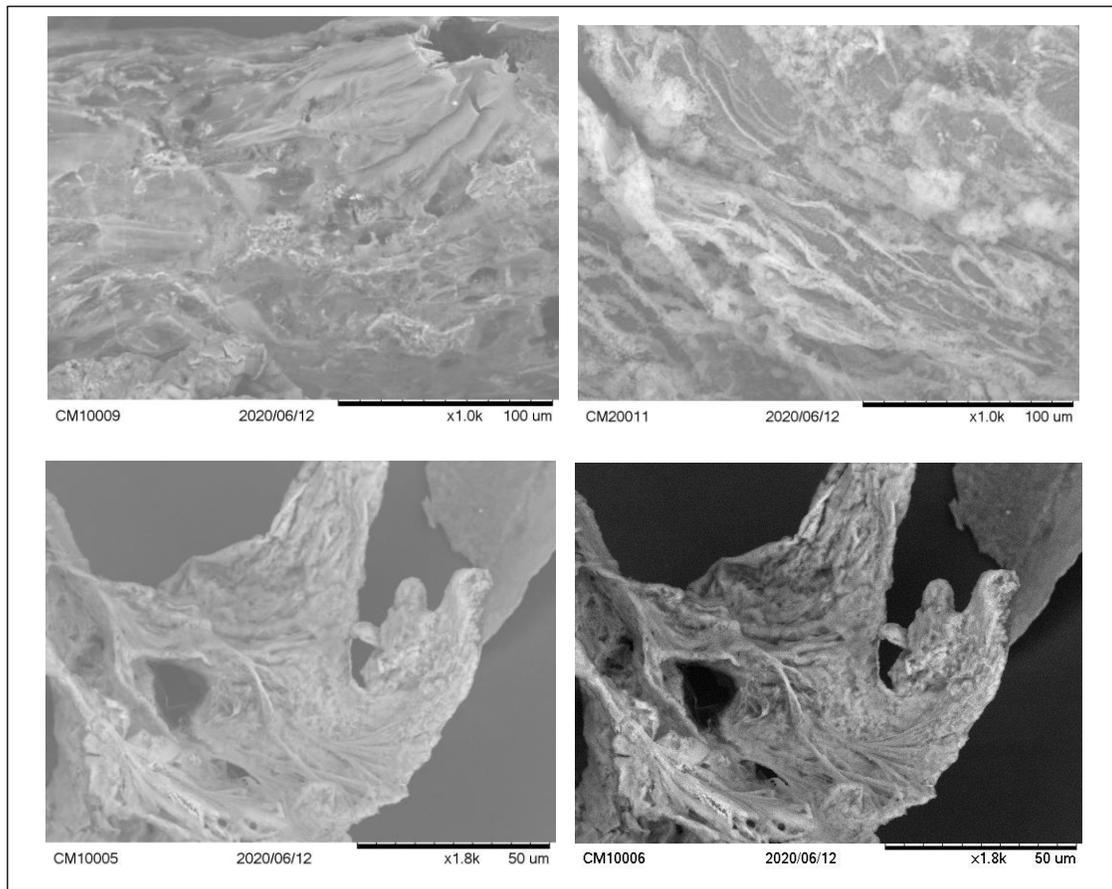


Figura 24. Micrografías del material compuesto HAp/colágeno.

- ❖ Hinchamiento o swelling:

En este análisis se trata de observar el porcentaje de hinchamiento del material al sumergirse en agua o en PBS, para esta técnica se sigue la metodología descrita por Beladi y otros autores (64). Esta técnica se describe a partir de la ecuación 2, donde W_s es el peso en gramos del material después de ser sumergido y quitando el exceso de líquido y W_d es el peso en gramos del material compuesto.

$$\text{Ec. 2: } \text{Hinchazón}(\%) = \frac{W_s - W_d(g)}{W_d(g)} \times 100 \quad (64)$$

El PBS se preparó disolviendo 8g de cloruro de sodio (NaCl), 0.2g de cloruro de potasio (KCl), 1.44g de fosfato disódico (Na₂HPO₄) y 0.24g de fosfato monopotásico (KH₂PO₄) en 800ml de agua destilada. Después de ajustar el pH a 7.4 con HCl (1mol*L⁻¹) volumen total de la solución 1L (65). En la Figura 35 se muestran las gráficas obtenidas de este proceso en las cuales se observa una disminución en la absorción de líquido cuando se trata de la solución búfer (PBS), esto se debe a la concentración de iones.

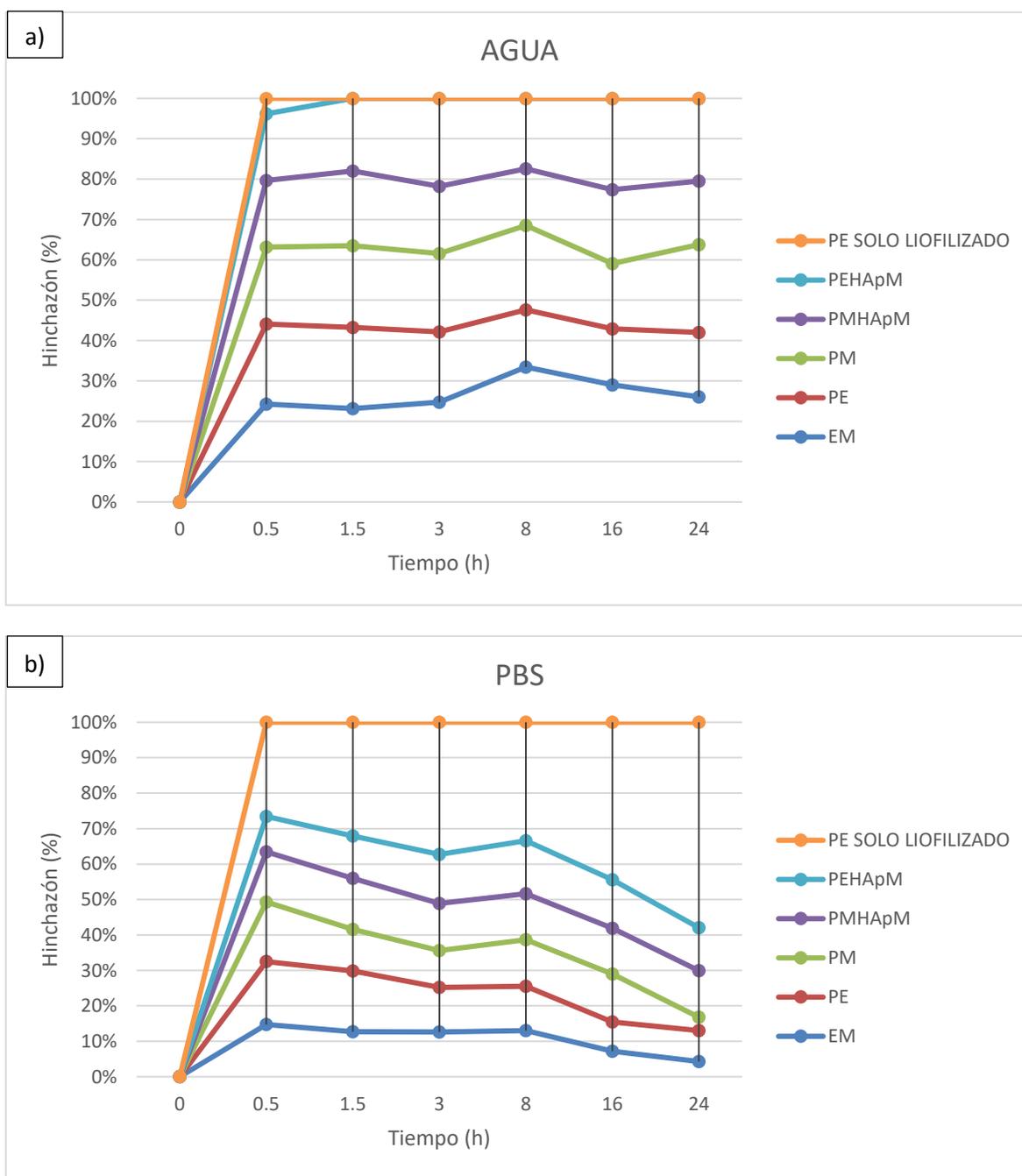


Figura 35. Hinchazón del material sintetizado en a) agua y en b) PBS.

Capítulo 4 CONCLUSIONES

La extracción de colágeno e hidroxiapatita a partir de residuos de Tilapia ha sido exitosa, ya que se han obtenido rendimientos similares a los obtenidos por otros autores con especies diferentes.

Las caracterizaciones muestran que el colágeno obtenido es de tipo I, aun cuando la longitud de las fibras constituyentes del colágeno extraído de piel y escamas de Tilapia es menor a la longitud del colágeno reportada en la literatura; el biomaterial cumple con las demás características principales del colágeno.

La metodología para la extracción de hidroxiapatita es novedosa ya que no requirió de fosfato adicional como se reporta para otras especies, y al caracterizar el material obtenido, se confirmó la presencia de hidroxiapatita rica en Calcio enriquecida con Sodio y Magnesio.

Respecto a los materiales compósitos que se sintetizaron, al combinar la hidroxiapatita con el colágeno extraído de piel se observa que el compósito tiene alta área superficial lo que nos da indicios de ser un material apto para el crecimiento celular. Esto se puede observar al comparar los resultados obtenidos por la técnica de fisisorción de los materiales compósitos.

Al observar las fotografías del material sintetizado, se puede apreciar que a gran escala es un material poroso y de consistencia esponjosa con un gran parecido en textura al hueso humano. Esta observación indica también que será un material que pueda ser empleado en la regeneración ósea o en otras aplicaciones médicas.

Queda pendiente la esterilización y las pruebas biológicas que se habían planteado inicialmente, pero que por la pandemia de Covid-19 no fue posible llegar hasta esa etapa. Con los resultados que se han obtenido se ha concretado la mayor parte del proyecto inicial que era sintetizar un material compósito de hidroxiapatita y colágeno a partir de desechos de pescado, y que sea viable como biomaterial para regeneración ósea.

Es necesario remarcar que con el trabajo obtenido se han realizado dos publicaciones, una de ellas fue la presentación de los resultados obtenidos de la extracción de hidroxiapatita en un congreso internacional, y la otra fue una publicación en una revista nacional en la cual se revisa el estado del arte en cuanto a la extracción de colágeno a partir de residuos de pescado de diferentes especies en el mundo.

Capítulo 5 PUBLICACIONES

Este proyecto de tesis permitió realizar dos publicaciones:

1. Anaya-Barajas, D.; Aguilar-Pliego, J.; González-Vélez, V. y Vélez-Tirado, M. (2019) Biomateriales para regeneración de tejido óseo extraídos de desechos de pescado. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 40(3): e201927EE3. DOI: 10.17488/rmib.40.3.13.
2. D Ayala-Barajas, V González-Vélez, M Vélez-Tirado, J Aguilar-Pliego (2020) Hydroxyapatite extraction from fish scales of Tilapia. *Proceedings of the 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)*: 2206-2208. DOI: 10.1109/EMBC44109.2020.9176479.

ARTÍCULO DE REVISIÓN - EDICIÓN ESPECIAL

Vol. 40 | No. 3 | SEPTIEMBRE - DICIEMBRE 2019 | pp 1-10

ib REVISTA MEXICANA DE
Ingeniería
Biomédica

[dx.doi.org/10.17488/RMIB.40.3.13](https://doi.org/10.17488/RMIB.40.3.13)

E-LOCATION ID: e201927EE3

Biomateriales para Regeneración de Tejido Óseo Extraídos de Desechos de Pescado

Biomaterials for Bone Tissue Regeneration Extracted from Fish Wastes

D. Anaya-Barajas¹, J. Aguilar-Pliego², V. González-Vélez², M. Vélez-Tirado³

¹UAM Azcapotzalco, Estudiante del Posgrado en Materiales, CBI

²UAM Azcapotzalco, Depto. Ciencias Básicas

³Instituto de Catálisis y Petroleoquímica CSIC-UAM, Grupo de Biocatálisis

1.

RESUMEN

Los biomateriales para regeneración ósea comúnmente se basan en el diseño natural del hueso, el cual mezcla la dureza de un material cerámico como la hidroxiapatita con la flexibilidad de un polímero como el colágeno. Ambos materiales pueden extraerse de los desechos del pescado consumido en la dieta humana, tales como escamas, piel e incluso huesos. Esta extracción tiene la ventaja de aportar biomateriales naturales, de baja toxicidad y como añadido, que evitan la transmisión de enfermedades que se ha reportado para colágenos provenientes de animales mamíferos. En este trabajo se hace una revisión de bibliografía referente a la extracción de colágeno tipo I, precursores de hidroxiapatita y síntesis de compósitos de ambos, para proponer la recuperación de estos biomateriales como una alternativa amigable con el ambiente y útil para usos médicos.

PALABRAS CLAVE: Biomateriales; desechos de pescado; colágeno; hidroxiapatita

ABSTRACT

Biomaterials for bone tissue regeneration are commonly based in the natural design of bone where the stiffness of a ceramic material as hydroxyapatite is combined with the flexibility of a polymer such as collagen. Both materials can be extracted from human consumed fish waste, such as scales, bones and skin. The recovery of these biomaterials from fish waste has the advantage of yielding natural materials of low toxicity, avoiding the possible disease transmission found for the collagen coming from mammals. In this article, we review several reports about collagen type I and hydroxyapatite precursors extraction, and composite synthesis, from fish waste in order to propose these methods as a green alternative for biomaterials useful for medical purposes.

KEYWORDS: Biomaterials; fish wastes; collagen; hydroxyapatite

Correspondencia

DESTINATARIO: Daniela Ayala Barajas
INSTITUCIÓN: UAM Azcapotzalco
DIRECCIÓN: Av. San Pablo #180, Col. Reynosa
Tamaulipas, Alcaldía Azcapotzalco, C. P. 02200,
Ciudad de México, México
CORREO ELECTRÓNICO: daniela_barajas@live.com

Fecha de recepción:

15 de junio de 2019

Fecha de aceptación:

15 de agosto de 2019

INTRODUCCIÓN

El tejido óseo es un tejido del cuerpo que asemeja un material compósito ya que contiene una fase inorgánica que combina componentes minerales que contienen fosfato, calcio y grupos hidroxilos (hidroxiapatita) y una fase orgánica compuesta principalmente de colágeno. Esta útil combinación de materiales permite que el hueso tenga, al mismo tiempo, resistencia y flexibilidad [1] [2].

La regeneración del tejido óseo se da de manera natural durante toda la vida, sin embargo, cuando existe una afección como fracturas, pérdida de masa ósea derivado de alguna enfermedad como tumores, degeneraciones o infecciones, donde el tejido ha sido destruido o removido lo cual llevan a que el hueso, en este caso, deje que cumplir la función vital de dar soporte y de permitir la comunicación bien protegida de la red nerviosa y la red sanguínea. Es necesario inducir o crear un tejido sustituto a través de la ingeniería de tejidos que cumpla las funciones vitales del tejido, esto es posible gracias a la compleja estructura a micro y nanoescala que presenta el hueso como material compósito bioactivo, mezcla de hidroxiapatita y colágeno [2] [3].

Un biomaterial para regeneración ósea debe cumplir la función de reemplazar al hueso dañado al tiempo que permita que continúe la funcionalidad de los tejidos que forman parte de él, como vasos sanguíneos y nervios. Más aún, es deseable que sea bioactivo, es decir que induzca la reparación natural del tejido óseo conocida como osteogénesis. Los compósitos basados en hidroxiapatita (HAP) son muy utilizados, combinados con un polímero que les aporte flexibilidad y resistencia mecánica [4].

La hidroxiapatita presente en los huesos tiene una composición similar a la HAP sintética, aunque se ha encontrado que esta última suele ser más frágil. Es un material cerámico que presenta una composición de

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y mantiene una relación molar de calcio a fósforo (Ca/P) de 1.67. En el tejido óseo, la HAP está presente en un 60% en forma de nanocristales [3]. Para que la HAP sintética pueda ser empleada en aplicaciones médicas es necesario que cumpla con algunas normas, por ejemplo, debe cumplir un grado mínimo de cristalinidad del 45% según la ISO 137779-2:2000, también debe ser osteoconductor, osteoinductivo y bioactivo [2] [4].

El colágeno (Col) es una de las principales proteínas estructurales del tejido conectivo de los vertebrados, constituye alrededor del 30% de sus proteínas totales ya que es el principal componente de tendones, piel, huesos, tejidos del sistema vascular entre otros tejidos [5].

Existen 29 variantes reportadas de colágeno [6], sin embargo, el colágeno tipo I es el componente principal de la matriz extracelular de mamíferos, contribuye a funciones fisiológicas únicas como la protección de tejidos y órganos, así como la regulación fisiológica del entorno celular para muchas especies animales [7]. Como característica principal del colágeno que está compuesto de una cadena de tres hélices, como unidad básica presenta las tres cadenas α que contienen una o más secuencias de polipéptidos (Gly-X-Y) y estas a su vez presentan entre 600 a 3,000 aminoácidos [1].

El colágeno es ampliamente usado en las industrias cosméticas, biomédicas, farmacéutica por su excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja antigenicidad [8], actualmente se ha extraído de piel y huesos de animales bovinos y porcinos. Sin embargo, ambos han presentado brotes de encefalopatía espongiiforme bovina y encefalopatía espongiiforme transmisible, es por ello que se pretende extraer el colágeno de animales que no tengan la capacidad de transmitir alguna enfermedad, por lo tanto, se ha optado por la obtención del colágeno a partir de animales marinos, ya que el colágeno tipo I es más común en piel, escamas, huesos y aletas de peces [9].

El presente artículo de revisión tiene como propósito mostrar los trabajos que se han reportado respecto a la extracción de HAp y de colágeno a partir de desechos de pescado, ya que esta recuperación puede ser una alternativa prometedora y amigable con el ambiente para obtener precursores de biomateriales compósitos para regeneración ósea.

CRONOLOGÍA

Colágeno

En los años noventas Kimura y colaboradores aislaron colágeno equinodermos indicando la presencia de colágeno fibrilar en la pared del cuerpo ^[10]. Unos años después Nomura y colaboradores extrajeron colágeno de escamas de sardina, obteniendo un rendimiento del 5%. En este estudio se propone que la etapa de desmineralización de las escamas es un paso importante para la recuperación del colágeno ^[7].

En el año 2000, Nagai y colaboradores ^[11] aislaron colágeno a partir de la piel, las aletas y los huesos del pescado. En su trabajo hacen mención de la escasa información disponible sobre la presencia de colágeno en tejidos calcificados de peces. Determinan que la temperatura de desnaturalización del colágeno obtenido de la piel de las diferentes especies de peces es de alrededor de 25°C, 10°C menos que el colágeno porcino, mientras que para el colágeno extraído de hueso de pescados es de 29°C. Más tarde, varios trabajos siguen la metodología de Nagai para extraer colágeno soluble en ácido y en pepsina a partir de escamas ^[5] ^[12], de entre los cuales destaca Jongjareonrak y colaboradores porque reporta rendimientos del 9 y 4.7% para colágenos solubles en ácido y en pepsina, respectivamente ^[5]. Posteriormente Dasong y colaboradores en 2012 extrajeron y caracterizaron colágeno soluble en pepsina obtenido de escamas, aletas, huesos y piel. Su trabajo es relevante porque describe detalladamente la metodología que siguieron, mencionando las diferencias de solubilidad en las reacciones de extracción del

colágeno obtenido de escama y hueso contra el obtenido de piel. Dos años después Dasong compara el colágeno soluble en ácido obtenido de la piel y escamas de cuatro tipos de carpas, observando diferencias en la presencia y concentración de las cadenas α , mostrando tres cadenas α_1 , α_2 y α_3 , y no solo dos como se había reportado anteriormente ^[8].

Más recientemente Chuaychan y colaboradores aislaron colágeno soluble en pepsina (PSC) y colágeno soluble en ácido (ASC) a partir de escamas y siguiendo la metodología establecida por Nagai; sin embargo, reportan rendimientos mucho menores (0.38% ASC, 1.06% PSC) ^[9]. Wang y colaboradores logran extraer colágeno tipo I soluble en ácido y en pepsina con rendimientos de alrededor del 20% de piel de lochas nativas de Asia, postulando a este procedimiento como una buena alternativa al colágeno extraído de mamíferos. Finalmente Bhuimbar y colaboradores reportaron la extracción de colágeno soluble en ácido láctico proveniente de la piel de la medusa y muestran su potencial, junto con quitosano, como antibacterial ^[13].

Hidroxiapatita

Wen-Kuang Liu et al. extrajeron hidroxiapatita a partir de escamas para emplearla en la remoción de iones de plomo en aguas residuales ^[14]. Ulfyana y su equipo aislaron hidroxiapatita de las escamas de pescado reportando un rendimiento de la obtención de calcio de 83.62% y 12.7% de fosfato. Contemplaron que la HAp debía cumplir un grado de cristalinidad mínimo del 45% para poder ser un material empleado en el área de los biomateriales, realmente de la escama sólo obtuvieron el precursor de HAp que es el óxido de calcio (CaO), para obtener la hidroxiapatita se añadieron ácido fosfórico e hidróxido de amonio ^[4]. Más recientemente, Wibison y colaboradores describen la obtención de precursores de un material con fases secundarias de β -TCP para la HAp de las escamas, éste estudio lo realizaron a partir de escamas de nemátodos y conchas de cangrejo por métodos húmedos ^[15].

Compósitos HAp/colágeno

Sasmal y Begam sintetizaron un material compósito de hidroxiapatita/colágeno, extrajeron el colágeno a partir de piel de un pescado y posteriormente elaboraron el compósito por método químico húmedo ^[16]. Yoruc y colaboradores sintetizaron el compósito de HAp/col, utilizando colágeno tipo I de origen bovino y los precursores de HAp a través del método de precipitación ^[17]. Posteriormente Yoruc y colaboradores sintetizaron un compósito de HAp/ β -fosfato tricalcio/colágeno (HAp/ β -TCP/Col), ellos aislaron el fosfato de calcio y el colágeno de escamas obteniendo una concentración en porcentaje de peso para el calcio igual a 31.8% y 20% en peso del fosfato ^[18]. Recientemente Chai y colaboradores reportaron la comparativa de dos procesos de elaboración de estructuras híbridas de colágeno/hidroxiapatita, en uno de los experimentos colocaron moléculas de colágeno (Col-M/HAp) y en el otro colocaron fibras de colágeno (Col-F/HAp), con el objetivo de conocer los procesos de auto organización de las estructuras híbridas con la finalidad de comprender mejor el mecanismo de formación de los tejidos óseos ^[19].

MÉTODOS

Extracción de colágeno a partir de piel de pescado

Para obtener colágeno soluble en ácido y soluble en pepsina, Nagai y colaboradores establecieron las bases de la metodología que se continúa empleando en estudios recientes (Figura 1). Hacen énfasis en mantener la piel a 4°C durante la extracción para evitar desnaturar el colágeno. Proponen un tratamiento previo de cortado de la piel y lavado, a continuación la hidrólisis o remoción de proteínas no colagenosas y la eliminación de grasas suspendiendo los residuos anteriores en una solución de alcohol butílico. Después, efectúan el tratamiento ácido para obtener colágeno soluble en ácido, o en una solución de ácido más pepsina para obtener colágeno soluble en pepsina. Luego de precipitar, realizan la diálisis y la liofilización del colágeno ^[11].



FIGURA 1. Etapas para la extracción de colágeno a partir de piel de pescado.

Extracción de colágeno a partir de escamas

La extracción de colágeno a partir de las escamas de pescado ha sido reportada por Dasong y colaboradores, cuya metodología ha sido citada por trabajos más recientes (Figura 2).



FIGURA 2. Etapas para la extracción de colágeno a partir de escamas de pescado.

Este grupo propone seguir los mismos pasos reportados por Nagai ^[11] para la extracción de colágeno a partir de piel, incorporándoles algunas modificaciones en la concentración de las soluciones y sustituyendo la eliminación de grasa en piel por la descalcificación de escamas ^[20].

Extracción de HAp a partir de escamas

Ulfyana y colaboradores han descrito recientemente una metodología para extraer precursores de HAp de las escamas del pescado (Figura 3). En ella incluyen como primer paso la remoción de todo residuo biológico no deseado, para posteriormente ser sometidas a hidrólisis, esterilización, secado y calcinación.

Con ello, se obtiene el óxido de calcio como precursor de la HAp. Posteriormente vierten un una solución el óxido de calcio con el precursor de fosfato (ácido fosfórico), una vez mezclados estos componentes, se continúa con los tratamientos mecánico y térmico que permiten obtener la HAp ^[4].

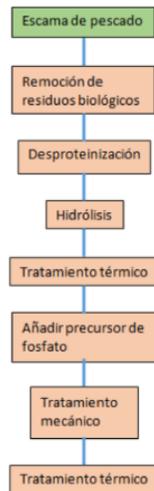


FIGURA 3. Etapas para la extracción de HAp a partir de escamas de pescado.

Síntesis de compuesto HAp/Col

En cuanto a la síntesis del material compuesto (Figura 4), Sasmal y Begam propusieron la obtención del mismo a través del método de precipitación que consiste en mezclar el colágeno con el precursor de fosfato y por adición incorporar el calcio hidratado, posteriormente dejar envejecer el material, filtrar y liofilizarlo ^[16].

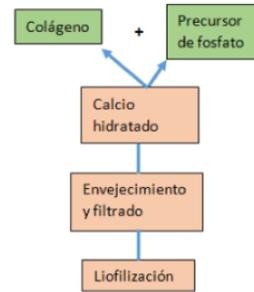


FIGURA 4. Etapas para la síntesis del compuesto HAp/Col.

Caracterización y cuantificación de colágeno extraído

Para confirmar la presencia de colágeno tipo I en el material extraído de piel o escamas, como se describió en las Figuras 1 y 2, se suelen utilizar técnicas de caracterización fisicoquímica tales como Electroforesis de Gel (para determinar qué tipo de colágeno se tiene), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) (para ver los enlaces característicos del material en cuestión), espectrofotometría UV-visible (verificar la presencia del compuesto/material) y BET (determinación de área superficial, porosidad del material). Todas estas técnicas detectan la presencia de las cadenas $\alpha 1$ y $\alpha 2$, y de las bandas amida que son características del colágeno tipo I ^[6] ^[18].

En cuanto a la caracterización de la HAp se emplean técnicas fisicoquímicas como difracción de rayos-x (XRD) para determinar la estructura cristalina y con ello el grado de cristalinidad, FT-IR para identificar los grupos funcionales característicos de la HAp, microscopio

pía electrónica de barrido (SEM) para analizar la morfología del material, espectrometría de energía dispersiva (EDS) para cuantificar la presencia de los elementos presentes en la muestra, entre otras técnicas [21].

TABLA 1. Rendimiento de la extracción de colágeno.

REG.	PESCADO		REND. %		REF.
			ASC	PSC	
Asia	Sardina	Escama	--	--	[7]
Asia	Lateolabrax japonicus (Lubina japonesa)	Piel	51.4	--	
		Huesos	40.7	--	
		Aletas	5.2	--	
Asia	Scomber japonicus (Estornino)	Piel	49.8	--	[11]
Asia	Heterodontus (Tiburón toro o bullhead shark)	Piel	50.1	--	
Asia	Katsuwonus pelamis (Listado)	Hueso	42.3		[11]
Asia	Pagrus major (Pargo japonés)	Escama	--		[12]
Asia	Oreochromis niloticus (Tilapia)	Escama	--	2	
Asia	Sardina	Escama	--	50.9	
Asia	Lateolabrax japonicus (Lubina japonesa)	Escama	--	41	[22]
Asia	Pagellus bogaraveo	Escama	--	37.5	
Asia	Lutjanus vitta (Pargo)	Piel	9	4.7	[5]
Asia	Siganus fuscescens (Pez congo)	Piel	3.6	--	[23]
Asia	Kyphosus bigibbus (Carpa marino)	Piel	3.6	--	
Asia	Myliobatis tobijei	Piel			
Asia	Dasyatis akajei	Piel	3.5	--	
Asia	Dasyatis laevigata	Piel	5.7	--	
Europa	Cyprinus carpio (Carpa)	Piel	41.3	--	[24]
		Escama	1.35	--	
		Hueso	1.06	--	
Asia	Parupeneus heptacanthus	Escama	0.46	1.2	[25]
Asia	Pangasianodon hypophthalmus (Pez gato)	Piel	5.1	7.7	[26]
Asia	Istiophorus platypterus (Pez vela)	Piel	5.7	2.1	[27]
Asia	Lates calcifer (Barramundi)	Escama	0.38	1.06	[9]
Asia	Ctenopharyngodon idella (Carpa herbívora)	Piel	--	--	[28]
		Escama	--	--	
		Aleta	--	--	
Asia	Oreochromis niloticus	Escama	3.2	--	[29]
		Piel	27.2	--	
América del Sur	Oreochromis ssp (Tilapia roja)	Escama	6.5	--	[30]
		Piel	15.5	--	
		Hueso	5.6	--	
Asia	Dover sola	Piel	19.2	--	[31]

REG: Región de origen del pescado.
 REND: Rendimiento de la extracción de colágeno.
 REF: Referencia.
 ASC: Colágeno soluble en ácido.
 PSC: Colágeno soluble en pepsina.

DISCUSIÓN

Como se muestra en la Tabla 1, los diferentes autores que han extraído colágeno a partir de residuos de pescado han encontrado diferencias en los rendimientos de colágeno obtenido. Esto podría deberse, en parte, a las diferentes especies utilizadas, así como a la metodología y cuidado de la temperatura durante la extracción. Se debe tener en cuenta la observación que realiza Nagai [11] respecto a la temperatura de desnaturalización del colágeno respecto al lugar de origen de los peces, pues apunta que el colágeno obtenido de peces que viven en aguas más frías, tiene una temperatura de desnaturalización menor que los que viven en aguas más cálidas. Además, como lo indica Jongjareonrak [5], la cantidad de colágeno aislada también varía con la edad y temporada en la cual se adquirió el pez.

Aún con algunas de las observaciones realizadas por los grupos de investigación sobre los rendimientos obtenidos de colágeno, es importante destacar que la variabilidad del rendimiento es grande con respecto a los datos reportados por Nagai. Para poder obtener rendimientos con una variabilidad mínima es necesario establecer una metodología que sea aplicada para la mayor parte de los peces o incluso hacerlas para aquellos que cumplan la mayor cantidad de características de una población, lo que ayudaría a conocer con mayor exactitud el rendimiento promedio de la extracción de colágeno a partir de los residuos de pescado y de esta manera poder equipararlo e incluso competir con el colágeno obtenido de animales bovinos y porcinos y con ello poder incrementar su aplicación en el área médica y evitando la potencial transmisión de enfermedades que conlleva el uso de colágeno bovino y porcino.

Debido a la literatura consultada referente al material compuesto HAp/colágeno a partir de desechos de pescado, se ha observado que existe información limitada sobre este tema, lo cual indica que es un área con gran potencial de investigación para la obtención de materiales que son recuperados de residuos.

CONCLUSIONES

La recuperación de materiales, tales como el colágeno y la HAp, a partir de desechos de pescado, es una alternativa importante con impacto positivo para el medio

ambiente y para la fabricación de biomateriales de baja toxicidad y mayor biocompatibilidad, con potencial de ser aprovechada con fines de uso médico, en particular para la regeneración ósea.

REFERENCIAS

- [1] F. Silver y D. L. Christiansen, *Biomaterials Science and biocompatibility* Frederick H. Silver. New York, USA: Springer-Verlag, 1999.
- [2] G. Rh. Owen, M. Dard, y H. Larjava, "Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects", *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 106, núm. 6, pp. 2493-2512, 2018. doi: [10.1002/jbm.b.34049](https://doi.org/10.1002/jbm.b.34049)
- [3] J. D. Bronzino, *Tissue Engineering and Artificial Organs*, Third Edit. New York, USA, 2006.
- [4] D. Ulfyana, F. Anugroho, S. H. Sumarlan, y Y. Wibisono, "Bioceramics synthesis of hydroxyapatite from red snapper fish scales biowaste using wet chemical precipitation route", *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, vol. 131, núm. 1, 2018. doi: [10.1088/1755-1315/131/1/012038](https://doi.org/10.1088/1755-1315/131/1/012038)
- [5] A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan, T. Nagai, y M. Tanaka, "Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*)", *Food Chem.*, vol. 93, núm. 3, pp. 475-484, 2005. doi: [10.1016/j.foodchem.2004.10.026](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.026)
- [6] J. Wang, X. Pei, H. Liu, y D. Zhou, "Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*)", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 106, pp. 544-550, 2018. doi: [10.1016/j.ijbiomac.2017.08.046](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.046)
- [7] Y. Nomura, H. Sakai, Y. Ishii, y and K. Shirai, "Preparation and Some Properties of Type I Collagen from Fish Scales", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 60, núm. 12, pp. 2092-2094, 1996. doi: [10.1271/bbb.60.2092](https://doi.org/10.1271/bbb.60.2092)
- [8] D. Liu, P. Zhou, T. Li, y J. M. Regenstein, "Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species", *Food Hydrocoll.*, vol. 41, pp. 290-297, 2014. doi: [10.1016/j.foodhyd.2014.04.030](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.04.030)
- [9] S. Chuaychan, S. Benjakul, y H. Kishimura, "Characteristics of acid and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lateolabrax japonicus*)", *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 63, núm. 1, pp. 71-76, 2015. doi: [10.1016/j.lwt.2015.03.002](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.002)
- [10] M. S. H. KIMURA, S. Omura, Y. Ishida, "Molecular Characterization of fibrillar collagen from the body wall of starfish *Asterias Amurensis*", vol. 104B, núm. 3, pp. 663-668, 1993. doi: [0305-0491/93](https://doi.org/10.3305-0491/93)
- [11] T. Nagai, "Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins", *Food Chem.*, vol. 68, núm. 3, pp. 277-281, 2000. doi: [10.1016/S0308-8146\(99\)00188-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00188-0)
- [12] T. Ikoma, H. Kobayashi, J. Tanaka, D. Walsh, y S. Mann, "Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 32, núm. 3-5, pp. 199-204, 2003. doi: [10.1016/S0141-8130\(03\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00054-0)
- [13] M. V. Bhuimbar, P. K. Bhagwat, y P. B. Dandge, "Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film", *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 7, núm. 2, p. 102983, 2019. doi: [10.1016/j.jece.2019.102983](https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102983)
- [14] W. K. Liu, B. S. Liaw, H. K. Chang, Y. F. Wang, y P. Y. Chen, "From Waste to Health: Synthesis of Hydroxyapatite Scaffolds From Fish Scales for Lead Ion Removal", *Jom*, vol. 69, núm. 4, pp. 713-718, 2017. doi: [10.1007/s11837-017-2270-5](https://doi.org/10.1007/s11837-017-2270-5)
- [15] Y. Wibisono et al., "Synthesis and sinterability of hydroxyapatite from fishery by-products", *J. Korean Ceram. Soc.*, vol. 55, núm. 6, pp. 570-575, 2018. doi: [10.4191/kcers.2018.55.6.03](https://doi.org/10.4191/kcers.2018.55.6.03)
- [16] P. Sasmal y H. Begam, "Extraction of Type-I Collagen from Sea Fish and Synthesis of Hap/Collagen Composite", *Procedia Mater. Sci.*, vol. 5, pp. 1136-1140, 2014. doi: [10.1016/j.mspro.2014.07.408](https://doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.408)
- [17] A. B. H. Yoruc y A. K. Aydinoglu, "Synthesis of hydroxyapatite/collagen (HA/COL) composite powder using a novel precipitation technique", *Acta Phys. Pol. A*, vol. 127, núm. 4, pp. 1264-1267, 2015. doi: [10.12693/APhysPolA.127.1264](https://doi.org/10.12693/APhysPolA.127.1264)
- [18] S. Belouafa, A. Bennamara, y A. Abourriche, "Low-cost processing technology for the synthesis of a biocomposite for biomedical applications: A preliminary study", *J. Mater. Environ. Sci.*, vol. 8, núm. 3, pp. 825-830, 2017.
- [19] Y. Chai y M. Tagaya, "Simple preparation of hydroxyapatite nanostructures derived from fish scales", *Mater. Lett.*, vol. 222, pp. 156-159, 2018. doi: [10.1016/j.matlet.2018.04.009](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.04.009)
- [20] D. Liu, L. Liang, J. M. Regenstein, y P. Zhou, "Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*)", *Food Chem.*, vol. 133, núm. 4, pp. 1441-1448, 2012. doi: [10.1016/j.foodchem.2012.02.032](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.032)
- [21] W. Pon-on, P. Suntonsaratoon, N. Charoenphandhu, y J. Thongbunchoo, "Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material", *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 183-189, 2016. doi: [10.1016/j.msec.2016.01.051](https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.051)
- [22] T. Nagai, M. Izumi, y M. Ishii, "Fish scale collagen. Preparation and partial characterization", *Int. J. Food Sci. Technol.*, vol. 39, núm. 3, pp. 239-244, 2004. doi: [10.1111/j.1365-2621.2004.00777.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.00777.x)
- [23] I. Bae, K. Osatomi, A. Yoshida, y K. Osako, "Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes", *Food Chem.*, vol. 108, pp. 49-54, 2008. doi: [10.1016/j.foodchem.2007.10.039](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.039)
- [24] R. Duan, J. Zhang, X. Du, X. Yao, y K. Konno, "Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*)", *Food Chem.*, vol. 112, núm. 3, pp. 702-706, 2009. doi: [10.1016/j.foodchem.2008.06.020](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.020)
- [25] K. Matmaroh, S. Benjakul, T. Prodpran, y A. B. Encarnacion, "Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*)", *Food Chem.*, vol. 129, núm. 3, pp. 1179-1186, 2011. doi: [10.1016/j.foodchem.2011.05.099](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099)
- [26] P. Singh, S. Benjakul, S. Maqsood, y H. Kishimura, "Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*)", *Food Chem.*, vol. 124, núm. 1, pp. 97-105, 2011. doi: [10.1016/j.foodchem.2010.05.111](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.111)
- [27] S. Tamilmozhi, A. Veeruraj, y M. Arumugam, "Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sail fish (*Istiophorus platypterus*)", *FRIN*, vol. 54, núm. 2, pp. 1499-1505, 2013. doi: [10.1016/j.foodres.2013.10.002](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.002)

- [28] D. Liu, X. Zhang, T. Li, y H. Yang, "Extraction and characterization of acid- and pepsin-soluble collagens from the scales, skins and swim-bladders of grass carp (Ctenopharyngodon idella)", *Food Biosci.*, vol. 9, pp. 68-74, 2015. doi: [10.1016/j.fbio.2014.12.004](https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.12.004)
- [29] J. Chen, L. Li, R. Yi, N. Xu, R. Gao, y B. Hong, "Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (Oreochromis niloticus)", *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 66, pp. 453-459, 2016. doi: [10.1016/j.lwt.2015.10.070](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070)
- [30] J. Quintero y J. E. Zapata, "Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (Oreochromis spp) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta", *Inf. Tecnol.*, vol. 28, núm. 1, pp. 109-120, 2017. doi: [10.4067/S0718-07642017000100011](https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100011)
- [31] G. K. S. Arumugam, D. Sharma, R. M. Balakrishnan, y J. B. P. Ettiyappan, "Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin", *Sustain. Chem. Pharm.*, vol. 9, núm. May, pp. 19-26, 2018. doi: [10.1016/j.scp.2018.04.003](https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.04.003)

The screenshot shows the IEEE Xplore interface. At the top, there are navigation links for IEEE.org, IEEE Xplore, IEEE-SA, IEEE Spectrum, and More Sites. There are also links for SUBSCRIBE, Cart, Create Account, and Personal Sign In. The main header features the IEEE Xplore logo, a search bar with a dropdown menu set to 'All', and an 'Institutional Sign In' button. Below the search bar, the breadcrumb trail reads 'Conferences > 2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)'. The article title 'Hydroxyapatite extraction from fish scales of Tilapia' is prominently displayed, along with 'Publisher: IEEE', 'Cite This' button, and a 'PDF' icon. The authors listed are D. Ayala-Barajas, V. González-Vélez, M. Vélez-Tirado, J. Aguilar-Pilego, and All Authors. A blue banner on the right side of the page reads 'Need Full-Text access to IEEE Xplore for your organization?'.

2.

Abstract:

Hydroxyapatite is the inorganic component of human bones. To be used for bone replacements, hydroxyapatite can be synthesized or extracted from natural components. In this work we present the hydroxyapatite extraction from fish scales of the same Oreochromis family (Tilapia) but from two different species usually consumed in Mexico and in Spain. Our results indicate, for both species, that it is possible to obtain hydroxyapatite, and moreover, that this biomaterial is enriched with magnesium for the Mexican Oreochromis hunteri, and with aluminum for the Spanish Oreochromis niloticus.

Published in: 2020 42nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine & Biology Society (EMBC)

Date of Conference: 20-24 July 2020

INSPEC Accession Number: 19964370

Date Added to IEEE Xplore: 27 August 2020

DOI: 10.1109/EMBC44109.2020.9176479

► ISBN Information:

Publisher: IEEE

► ISSN Information:

Conference Location: Montreal, QC, Canada

PubMed ID: 33018445

I. INTRODUCTION

Calcium phosphates are biomaterials composed of calcium and phosphate with molar



June 5, 2020

Dr. Julia Aguilar, Pliego
 Universidad Autónoma Metropolitana
 apj@azc.uam.mx
 falseta09@gmail.com
 02200 Mexico
 Mexico

Dear Dr. Julia Aguilar, Pliego,

You are cordially invited to attend and present the paper (s) listed at the 42nd IEEE Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC'20. This prestigious event is the world's largest annual Biomedical Engineering forum, and will be held July 20 – 24, 2020 in Montréal, Québec, Canada at the Palais de Congrès de Montréal.

Montréal is well known for its distinctive urban life, entertainment and gastronomy. Its dynamism and charm make it a memorable city to visit. The city offers old-world flair with new-world energy embodied by the 17th century colonial architecture sharing the skyline with sleek high-rises, and a blend of cultural influences from all over the world. The Palais de Congrès de Montréal is located in the heart of the city within walking distance from main artery streets of downtown Montréal and a core of its commercial and cultural life. Montréal is a major Canadian healthcare hub with four universities, Montreal Neurological Institute (MNI), TransMedTech Institute, the Consortium for Industrial Research and Innovation in Medical Technology (MEDTEQ), and a large number of regional companies active in the healthcare business.

The overarching theme of EMBC'20 is "Enabling Innovative Technologies for Global Healthcare". Consistent with the theme, we have arranged plenary keynotes from leading academic and industrial scientists, who will present aspects of innovation and translational engineering in biomedical research activities. The conference program consists of mini symposia, workshops, oral and poster sessions by, social sessions for students and young professionals, and sessions designed for clinicians and entrepreneurs. The scientific tracks and sessions of the conference program will cover the standard topics of the EMBS technical committees along with cutting-edge research and innovation in biomedical engineering, healthcare technology and medical informatics.

In addition, to the conference program the conference exhibition will include biomedical companies, start-ups, biomedical institutes, universities, and provide networking opportunities for engineers, clinicians, other scientists, entrepreneurs and students.

All papers contributed to the conference will be peer reviewed by the EMBS Conference Editorial Boards, and accepted full-contributed papers, which meet the IEEE format requirements, will appear in the Conference Proceedings and indexed by IEEE and PubMed Medline.

Please note that this invitation for participation does not, in any way financially oblige either EMBC'20 or the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBS) for the expenses one incurs for travel and conference admission.

Please visit <https://embc.embs.org/2020/> we look forward to your participation in EMBC'20

Sincerely, EMBC 2020 Co-Chairs

Mohamad Sawan

Mohamad Sawan
 Polytechnique Montreal/
 Westlake University

Atam Dhawan

Atam P Dhawan
 New Jersey Institute of Technology

Carolyn McGregor

Carolyn McGregor AM
 Ontario Tech University

Accepted paper details:

Daniela Ayala, Barajas, Virginia González-Vélez, Marisela Vélez, Tirado, Julia Aguilar, Pliego, "Hydroxyapatite Extraction from Fish Scales of Tilapia." Scheduled for presentation on Monday July 20, 2020, 08:30-12:30 hrs.

Referencias

1. Bonilla CEP, Perilla JE. The past, present and near future of materials for use in biodegradable orthopaedic implants. *Ing e Investig.* 2011;31(2):124–33.
2. Bergmann CP, Stumpf A. Biomaterials. In 2013. p. 9–13. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-38224-6_2
3. Hudecki A, Kiryczyński G, Łos MJ. Biomaterials, Definition, Overview. In: *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*. Elsevier; 2019. p. 85–98.
4. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *Adv Tissue Eng.* 2016;51:8–12.
5. Institutes N. NATIONAL INSTITUTE OF BIOMEDICAL IMAGING AND BIOENGINEERING Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2013;(July).
6. Montufar E. Espumas inyectables de hidroxiapatita obtenidas por el método de espumado de la fase líquida de un cemento de fosfato tricálcico alfa . Universidad Politécnica de Cataluña. 2010.
7. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* [Internet]. 2012;8(9):3191–200. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>
8. Sabotta J, Welsch U. Histología. In: *Histología*. 2a ed. Editorial Medica Panamericana; 2006. p. 131–47.
9. Montalvo CE. Tejido Oseo. *Fac Med Univ Nac Autónoma México* [Internet]. 2010;21. Disponible en: http://bct.facmed.unam.mx/wp-content/uploads/2018/08/tejido_oseo_2010.pdf
10. Castillo L. Tilapia roja. *Mundo Tilapia* [Internet]. 2006;(6):1–124. Disponible en: https://mundotilapia.es.tl/Tilapia-Roja_Oreochromis-Sp-red.htm
11. Instituto Nacional de Pesca I. Acuicultura Tilapia [Internet]. 2018. Disponible en <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/acuicultura-tilapia>
12. Froese R and DP. World Wide Web electronic publication [Internet]. FishBase. 2020. Disponible en: <https://www.fishbase.se/summary/Oreochromis-hunteri.html>
13. Froese R and DP. World Wide Web electronic publication [Internet]. FishBase. 2020. Disponible en: <https://www.fishbase.se/summary/2>
14. CONAPESCA. México entre los diez primeros lugares a nivel mundial en producción de tilapia: SAGARPA | Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca | Gobierno | gob.mx [Internet]. 2017. p. 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapesca/prensa/mexico-entre-los-diez-primeros-lugares-a-nivel-mundial-en-produccion-de-tilapia-sagarpa-103606?idiom=es>
15. Rigano L, Lionetti N. Nanobiomaterials in galenic formulations and cosmetics. *Appl Nanobiomaterials.* 2016;10:121–48.

16. Sadat-Shojai M, Khorasani MT, Dinpanah-Khoshdargi E, Jamshidi A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Vol. 9, *Acta Biomaterialia*. Elsevier Ltd; 2013. p. 7591–621.
17. Hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$. Univ Liverpool [Internet]. 2020; Disponible en: <http://www.chemtube3d.com/solidstate/SShydroxyapatite.htm>
18. Sathiskumar S, Vanaraj S, Sabarinathan D, Bharath S, Sivarasan G, Arulmani S, et al. Green synthesis of biocompatible nanostructured hydroxyapatite from *Cirrhinus mrigala* fish scale – A biowaste to biomaterial. *Ceram Int*. 2019 Apr 15;45(6):7804–10.
19. Bronzino JD. *Tissue Engineering and Artificial Organs*. Third Edit. Taylor & Francis Group, editor. New York, USA; 2006.
20. Song J, Liu Y, Zhang Y, Jiao L. Mechanical properties of hydroxyapatite ceramics sintered from powders with different morphologies. *Mater Sci Eng A* [Internet]. 2011;528(16–17):5421–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msea.2011.03.078>
21. Sequeda L, Díaz J, Gutiérrez S, Perdomo S, Gómez O. Obtención de hidroxiapatita sintética por tres métodos diferentes y su caracterización para ser utilizada como sustituto óseo. *Rev Colomb Ciencias Químico - Farm*. 2012;41(1):50–66.
22. Martínez-Valencia AB, Esparza-Ponce HE, Carbajal-De la Torre G, Ortiz-Landeros J. Caracterización estructural y morfológica de hidroxiapatita nanoestructurada : estudio comparativo de diferentes métodos de síntesis. *Superf y Vacío*. 2008;21(4):18–21.
23. Rajesh R, Hariharasubramanian A, Ravichandran YD. Chicken bone as a bioresource for the bioceramic (hydroxyapatite). *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem*. 2012;187(8):914–25.
24. Mustafa N, Ibrahim MHI, Asmawi R, Amin AM. Hydroxyapatite extracted from Waste Fish Bones and Scales via Calcination Method. 2015;774:287–90.
25. Manoj M, Subbiah R, Viswanathan C, Meena P, Mangalaraj D, Ponpandian N, et al. Paperr 30 PUBLICATIONS 192 CITATIONS SEE PROFILE Green Synthesis and Characterization of Bioceramic Hydroxyapatite (HAp) Nanosheets and Its Cellular Study. *Adv Sci Eng Med*. 2016;8:1–6.
26. Rincón-López JA, Hermann-Muñoz JA, Giraldo-Betancur AL, De Vizcaya-Ruiz A, Alvarado-Orozco JM, Muñoz-Saldaña J. Synthetic and Bovine-Derived Hydroxyapatite Ceramics : A Comparison. *Materials (Basel)*. 2018;11(333):17.
27. Ulfyana D, Anugroho F, Sumarlan SH, Wibisono Y. Bioceramics synthesis of hydroxyapatite from red snapper fish scales biowaste using wet chemical precipitation route. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2018;131(1).
28. Pratt. C, K. Cornely. *Bioquímica*. In: Moderno M, editor. 2a Edición. Ciudad de México; 2011. p. 138–47.
29. Soroushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. *The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial*

- Development. Vol. 31, Advanced Materials. Wiley-VCH Verlag; 2019.
30. Silver F, Christiansen DL. Biomaterials Science and biocompatibility Frederick H. Silver. New York, USA: Springer-Verlag; 1999.
 31. Wang J, Pei X, Liu H, Zhou D. Extraction and characterization of acid-soluble and pepsin-soluble collagen from skin of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Int J Biol Macromol*. 2018 Jan 1;106:544–50.
 32. Liu D, Zhou P, Li T, Regenstein JM. Comparison of acid-soluble collagens from the skins and scales of four carp species. *Food Hydrocoll*. 2014;41:290–7.
 33. Chuaychan S, Benjakul S, Kishimura H. Characteristics of acid- and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). *LWT - Food Sci Technol*. 2015 Sep 1;63(1):71–6.
 34. Zhou C, Li Y, Yu X, Yang H, Ma H, Elgasim A, et al. Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. *LWT - Food Sci Technol* [Internet]. 2016;74:145–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.024>
 35. Ross M, Wojciech P. HISTOLOGIA Texto y Atlas color con Biología Celular y Molecular. 5a ed. Médica Panamericana; 2007.
 36. Bhagwat PK, Dandge PB. Collagen and collagenolytic proteases: A review. Vol. 15, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Elsevier Ltd; 2018. p. 43–55.
 37. Araújo ÍBDS, Bezerra TKA, Nascimento ES Do, Gadelha CADA, Santi-Gadelha T, Madruga MS. Optimal conditions for obtaining collagen from chicken feet and its characterization. *Food Sci Technol*. 2018 Dec 1;38:167–73.
 38. Nomura Y, Sakai H, Ishii Y, Shirai and K. Preparation and Some Properties of Type I Collagen from Fish Scales. *Biosci Biotechnol Biochem* [Internet]. 1996;60(12):2092–4. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.60.2092>
 39. Nagai T. Isolation of collagen from fish waste material — skin, bone and fins. *Food Chem*. 2000;68(3):277–81.
 40. Ikoma T, Kobayashi H, Tanaka J, Walsh D, Mann S. Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of *Pagrus major* and *Oreochromis niloticus*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2003;32(3–5):199–204. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12957317>
 41. Nagai T, Izumi M, Ishii M. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. *Int J Food Sci Technol*. 2004;39(3):239–44.
 42. Jongjareonrak A, Benjakul S, Visessanguan W, Nagai T, Tanaka M. Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chem*. 2005;93(3):475–84.
 43. Bae I, Osatomi K, Yoshida A, Osako K, Yamaguchi A, Hara K. Biochemical properties of acid-soluble collagens extracted from the skins of underutilised fishes. *Food Chem*. 2008;108(1):49–54.

44. Duan R, Zhang J, Du X, Yao X, Konno K. Properties of collagen from skin, scale and bone of carp (*Cyprinus carpio*). *Food Chem*. 2009;112(3):702–6.
45. Zelechowska E, Sadowska M, Turk M. Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Hydrocoll*. 2010 Jun;24(4):325–9.
46. Matmaroh K, Benjakul S, Prodpran T, Encarnacion AB. Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chem [Internet]*. 2011;129(3):1179–86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099>
47. Singh P, Benjakul S, Maqsood S, Kishimura H. Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chem*. 2011 Jan;124(1):97–105.
48. Tamilmozhi S, Veeruraj A, Arumugam M. Isolation and characterization of acid and pepsin-solubilized collagen from the skin of sailfish (*Istiophorus platypterus*). *Food Res Int*. 2013 Dec;54(2):1499–505.
49. Liu D, Wei G, Li T, Hu J, Lu N, Regenstein JM, et al. Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chem [Internet]*. 2015;172:836–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.147>
50. Chen J, Li L, Yi R, Xu N, Gao R, Hong B. Extraction and characterization of acid-soluble collagen from scales and skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *LWT - Food Sci Technol [Internet]*. 2016;66:453–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.070>
51. Quintero J, Zapata JE. Optimización de la Extracción del Colágeno Soluble en Ácido de Subproductos de Tilapia Roja (*Oreochromis* spp) mediante un Diseño de Superficie de Respuesta. *Inf Tecnol*. 2017;28(1):109–20.
52. Arumugam GKS, Sharma D, Balakrishnan RM, Ettiyappan JBP. Extraction, optimization and characterization of collagen from sole fish skin. *Sustain Chem Pharm [Internet]*. 2018;9(April):19–26. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2018.04.003>
53. Abu-Hussein AEHG. Introductory chapter: Concepts of Tissue Regeneration. *Intech [Internet]*. 2016;13. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
54. Matassi F, Nistri L, Chicon Paez D, Innocenti M. New biomaterials for boneregeneration. *Int Orthop*. 2012;36(8):1583–8.
55. Askeland DR, Phulé PP. *Ciencia e ingeniería de los materiales*. 2004;669–721.
56. Weber DN, Shaw. CF, Petering DH. Introduction to composite materials. *Struct Compos Mater*. 2010;262(15):6962–4.
57. Liu D, Liang L, Regenstein JM, Zhou P. Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chem*. 2012 Aug 15;133(4):1441–8.

58. Sasmal P, Begam H. Extraction of Type-I Collagen from Sea Fish and Synthesis of Hap/Collagen Composite. *Procedia Mater Sci*. 2014;5:1136–40.
59. Goto T, Sasaki K. Effects of trace elements in fish bones on crystal characteristics of hydroxyapatite obtained by calcination. *Ceram Int* [Internet]. 2014;40(7):10777–85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.03.067>
60. Bhuiambar M V., Bhagwat PK, Dandge PB. Extraction and characterization of acid soluble collagen from fish waste: Development of collagen-chitosan blend as food packaging film. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2019;7(2):102983. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102983>
61. Pon-On W, Suntornsaratoon P, Charoenphandhu N, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Tang IM. Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. *Mater Sci Eng C*. 2016 May 1;62:183–9.
62. Ren F, Leng Y. Carbonated apatite, Type-A or Type-B? *Key Eng Mater*. 2012;493–494:293–7.
63. Yu L, Rowe DW, Perera IP, Zhang J, Suib SL, Xin X, et al. Intrafibrillar Mineralized Collagen-Hydroxyapatite-Based Scaffolds for Bone Regeneration. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020;12(16):18235–49.
64. Beladi F, Saber-Samandari S, Saber-Samandari S. Cellular compatibility of nanocomposite scaffolds based on hydroxyapatite entrapped in cellulose network for bone repair. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2017;75:385–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.040>
65. Abd-Khorsand S, Saber-Samandari S, Saber-Samandari S. Development of nanocomposite scaffolds based on TiO₂ doped in grafted chitosan/hydroxyapatite by freeze drying method and evaluation of biocompatibility. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;101:51–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.067>
66. Brouwer KM, Versteeg EMM, Faraj KA, Geutjes PJ, Versteeg EM, Wismans RG, et al. The effect of ethylene oxide sterilisation, beta irradiation and gamma irradiation on collagen fibril-based scaffolds. Evaluation of biological, physical and chemical parameters. Autologous fat grafting in scars View project Combination of Sunitinib and cG250 for the treatment of patients with mRCC View project Kaeuis Faraj The Effect of Ethylene Oxide Sterilisation, Beta Irradiation and Gamma Irradiation on Collagen Fibril-Based Scaffolds [Internet]. Vol. 8, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2011. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/215596280>
67. Parenteau-Bareil R, Gauvin R, Berthod F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials (Basel)*. 2010;3(3):1863–87.
68. Romero A. Estudio de composites de hidroxiapatita y quitosano para su aplicación como biomateriales. Universidad Autónoma Metropolitana;

APÉNDICE

Este apéndice contiene información adicional sobre dos procedimientos experimentales que quedaron pendientes de realizarse para los biomateriales extraídos.

1. Esterilización

Antes de emplear los materiales en cultivos celulares es necesario que se lleve a cabo un proceso de eliminación de microorganismos que contaminen el cultivo celular y que este sea el factor de lisis celular. Para el desarrollo y crecimiento celular es importante que se encuentren en un ambiente libre de microorganismos patógenos para lo que se requiere que los materiales a sembrar en las células no estén contaminados y de esta forma poder corroborar la interacción o afectación que el material pudiese tener con las células.

En la literatura se encuentran diferentes técnicas de esterilización que pueden ser aplicadas en materiales que contengan colágeno, (66) entre ellas se encuentran:

- ❖ Esterilización por rayos gamma de baja dosis
- ❖ Esterilización con óxido de etileno
- ❖ Esterilización con rayos beta
- ❖ Esterilización química (inmersión en concentración baja de ácido peracético o en ácido fórmico)
- ❖ Esterilización por inmersión en etanol con antibióticos y fungicidas.

Es importante remarcar que al tratarse de una proteína como constituyente del material compósito se debe tener presente la fragilidad de ésta para ser sometida a un proceso de esterilización. Es necesario destacar que todas las técnicas de esterilización pueden alterar la estructura molecular y con ello modificar las algunas de las propiedades físicas del material, entre las afectaciones se puede encontrar la disminución de la resistencia mecánica (67).

2. Pruebas de biocompatibilidad

Estas pruebas permiten identificar la viabilidad y biocompatibilidad que presentan los materiales al ponerlos en contacto con un medio similar al del cuerpo humano (células y líquidos corporales).

La caracterización biológica de los materiales se debe realizar para determinar la viabilidad y adhesión celular a los materiales. Se necesitará una línea celular, su medio de cultivo, suero fetal bovino, antibiotico-antimicótico (anti-anti) y un buffer.

Las células se pueden cultivar mediante el kit de cultivo que incluye el medio, suero fetal bovino, anti-anti y el Buffer a una temperatura de 37°C (68).

Se sugiere la siguiente secuencia de pasos:

- Para los cultivos celulares, se hará un sembrado de células en cajas de Petri de las muestras y el control de los cultivos, estos últimos servirán para comparar el comportamiento celular.
- Se colocarán pequeñas cantidades de los materiales compósitos a diferentes concentraciones en las cajas Petri.
- Posteriormente se colocarán las células en un tubo eppendorf de 15mL, centrifugar a 1200 RPM por 6 minutos para formar un botón celular.
- Añadir 5.5mL de medio de cultivo y posteriormente se re-suspendió el botón celular.
- Incubar las células, el medio de cultivo será cambiado cada tercer día. Cultivar por 5 días.
- Para corroborar la viabilidad celular se realizaron los siguientes pasos:
- Retirar del medio de cultivo, posteriormente lavar con buffer de fosfato salino, colocar 2mL del buffer, retirar suavemente por las paredes y volver a colocar 2mL del buffer para retirar el medio de cultivo de las células y el material.
- Preparar buffer con Calceina-AM y Homodimero de estudio en la concentración sugerida por el kit.
- Colocar 500microL de la solución antes preparada en cada caja Petri, meter a la incubadora por 30 minutos.
- Proteger las cajas Petri de la luz durante su transportación al microscopio confocal.
- En cuanto a la adhesión celular es necesario:
- Preparar un buffer de fosfato de sodio dinástico + fosfato de sodio monobásico 0.1M con pH de 7.4.
- Retirar el medio de cultivo como se realizó anteriormente, repetir este lavado 5 veces.

- Retirar el buffer de fosfato + sales y agregar el fijador celular (glutaraldehído), sellar con parafina y refrigerar a 4°C por 24 horas.
- Realizar un lavado con buffer de fosfato, posteriormente colocar 2mL del buffer, retirar suavemente por las paredes y volver a colocar 2mL del buffer fosfato + sales, realizar este lavado cada 10 minutos de 3-5 repeticiones.
- Posteriormente se realizará la deshidratación en alcoholes iniciando con 30% con una rampa del 10% hasta alcanzar una concentración puerta de etanol, entre cada solución se realizarán 3 lavados cada 10 minutos.

Encapsular las muestras para secarlas y realizar la caracterización por microscopía electrónica de barrido. En la Tabla 14 se muestran los materiales y porcentajes a los cuales se sugiere realizar las pruebas biológicas.

Tabla 14. Relación de muestras biológicas sugeridas.

PRUEBAS BIOLÓGICAS		
No.	MATERIAL	PORCENTAJE [%]
1	Control (cultivo celular)	100
2	Colágeno de piel de pescado	100
3	Colágeno de escamas de pescado	100
4	Colágeno comercial	100
5	HAp de escamas de pescado	100
6	HAp sintética	100
7	HAp de pez + colágeno de piel	65/35
8	HAp de pez + colágeno de escama	65/35
9	HAp sintética + colágeno de piel	65/35
10	HAp sintética + colágeno de escama	65/35
11	HAp sintética + colágeno comercial	65/35