

Comportamiento al hinchamiento de un hidrogel de base gelatina reticulada con transglutaminasa microbiana

Deyi Zhu,¹ Liqiang Jin,^{1*} Yulu Wang,¹ Haixia Ren,²

1. School of Light Chemistry and Environmental Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan, P. R. China, Phone: 86-13695319398, Fax: 86-531-89631163, e-mail: jin-liqiang@163.com

2. Shandong Academy of Agricultural science, Jinan, Shandong, P. R. China

Resumen:

Los hidrogeles son redes hidrófilas reticuladas física o químicamente que no se disuelven en agua, pero se hinchan considerablemente en un medio acuoso. Debido a su respuesta al cambio de las condiciones ambientales tales como temperatura, pH y la composición disolvente, estos compuestos han atraído mucha la atención en los campos farmacéutico, ingeniería médica y mecánica. En la actualidad, la mayoría de los hidrogeles se preparan a partir de un número limitado de polímeros sintéticos y sus derivados, tales como copolímeros de ácido metacrílico, acrilamida y N-isopropilacrilamida, los cuales son más o menos tóxicos. Los avances recientes en tecnología de hidrogel se han centrado en la búsqueda de compuestos más biocompatibles, no tóxicos, diseñados para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. La gelatina es una sustancia proteínica biocompatible derivada de colágeno, y cuando se aplica en el cuerpo vivo, muestra una baja antigenicidad y una bioabsorptividad muy alta. Aunque los materiales naturales son más biocompatibles que los polímeros sintéticos, el uso de un agente tóxico de reticulación (por ejemplo, glutaraldehído o formaldehído) sigue siendo una amenaza. La transglutaminasa es una enzima que cataliza una reacción de transferencia de acilo que induce una reticulación entre los residuos de lisina y glutamina, por tanto, la polimerización de las proteínas se puede conseguir gracias a la formación de enlaces intermoleculares o intramoleculares e-(g-glutamil) lisina. En este trabajo, se preparó un novedoso hidrogel de base gelatina, usando gelatina en presencia de transglutaminasa microbiana (MTG). Se midió el comportamiento de hinchamiento de los hidrogeles obtenidos con diferentes gelatinas Bloom. Posteriormente, se investigó la cinética de hinchamiento. También se determinaron las relaciones de hinchamiento en soluciones de

sal (NaCl, CaCl₂, FeCl₃, CrCl₃) así como a diferentes temperaturas. Además, el hinchamiento de los hidrogeles se midió en soluciones con un pH variable desde 1 hasta 12. Finalmente, se examinó la morfología de las muestras por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Palabras clave: hidrogel a base de gelatina; transglutaminasa microbiana; comportamiento al hinchamiento

1. Introducción

Los hidrogeles son redes hidrófilas reticuladas física o químicamente, que no se disuelven en agua, pero se hinchan considerablemente en un medio acuoso. El uso de hidrogeles como biomateriales ha ganado recientemente un gran interés vista su facilidad de fabricación, buenas propiedades viscoelásticas y una elevada biocompatibilidad^[1]. El hidrogel presenta muchas aplicaciones en biomédica y en bioingeniería como la administración de fármacos, material de cuidado de la herida, y la ingeniería de tejidos, etc. Se pueden sintetizar a partir de cadenas de polímeros naturales tales como colágeno, alginato o de polímeros sintéticos tales como poli (alcohol vinílico) (PVA) o poli (ácido acrílico) (PAA) o de sus híbridos. Debido a la más o menos toxicidad^[2, 3] de los polímeros sintéticos, los avances recientes en tecnología de hidrogel se han centrado en la búsqueda de compuestos más biocompatibles, no tóxicos, diseñados para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. Los polisacáridos más abundantes en la naturaleza tales como celulosa, almidón, alginatos y proteína^[4-6] han atraído intereses médicos y farmacéuticos.

La gelatina está compuesta de polipéptidos polidispersos obtenidos a través de ya sea ácido, compuestos alcalinos y los procesos de

mezcla de diferentes tipos de colágeno presentes en las fuentes naturales, como pieles de bovino y de cerdo y pieles de pescado. Es una sustancia proteínica biocompatible, y cuando se aplica en el cuerpo vivo, muestra una baja antigenicidad^[7] y una bioabsorptividad muy alta. En el caso de la gelatina, se realiza una reticulación física por calentamiento e irradiación ultravioleta, y una reticulación química mediante varios agentes tales como el formaldehído, glutaraldehído, carbodiimida soluble en agua, compuestos diepoxi, los diisocianatos y dialdehído dextrano. Aunque los materiales naturales son más biocompatibles que los polímeros sintéticos, el uso de un agente tóxico de reticulación (por ejemplo, glutaraldehído o formaldehído) sigue siendo una amenaza. La transglutaminasa microbiana (MTG) es la más utilizada como agente de entrecruzamiento en las modificaciones enzimáticas de las proteínas a base de hidrogeles^[8]. La enzima puede catalizar la formación de enlaces covalentes entre los grupos γ -carboxiamida y los enlaces péptidos de residuos de glutamina y los grupos ϵ amino de lisina o los grupos amino primarios de la cadena peptídica.

Esta investigación pretende preparar un novedoso hidrogel a base de gelatina utilizando transglutaminasa microbiana (MTG) como agente reticulante, y evaluar el comportamiento del hinchamiento de los hidrogeles obtenidos bajo condiciones de preparación diferentes: en soluciones con un pH que va de 1 a 12, en diversas soluciones de sal y diferentes temperaturas.

2. Metodología

2.1. Materiales

La fuente de transglutaminasa es un producto comercial obtenido de Yiming Biológica Products Co., Ltd (Jiangsu, China). La actividad enzimática de MTG es de 102 U / g de polvo (determinada por un método colorimétrico hidroxamato)^[9]. Los tres tipos de gelatinas con fuerza Bloom diferentes fueron proporcionados por Sigma (300 Bloom), una fábrica de gelatina en Qufu, Shandong, China (172 Bloom), y Tianjin Chemical Reagent CO., LTD (90 Bloom), respectivamente. Todos

los demás reactivos utilizados son de grado analítico.

2.2. Preparación del hidrogel de base gelatina

La gelatina en polvo se mezcló con agua destilada para obtener una concentración final de 8%. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas para permitir que la gelatina absorbiera agua y se hinchara, y la mezcla se incubó a continuación a 45°C durante 30 min en un baño de agua de temperatura controlada con agitación ocasional. Se ajustó el pH a $6,5 \pm 0,1$ con 0,2 mol / l de NaOH. Una vez disuelta totalmente la gelatina en polvo en agua, se añadió el MTG (4 U / g de gelatina). Las soluciones de gelatina-MTG se incubaron a 45°C durante 4h, seguido por una etapa de calentamiento de 90°C durante 5 minutos para inactivar la MTG, para formar el hidrogel a base de gelatina. El hidrogel se corta en lonchas finas de aproximadamente 50 mm de longitud, 10 mm de anchura, con un espesor de 1,5 ~ 2mm. Los cortes de hidrogel se lavaron extensamente con agua destilada para eliminar las cadenas de gelatina sin reticular. Los hidrogeles secos se obtuvieron manteniendo los cortes de hidrogel húmedos en un lugar bien ventilado a temperatura ambiente durante 3 días. Posteriormente, se pesaron y se colocaron en un horno al vacío a 60°C durante 24 horas y luego se volvieron a pesar. Prácticamente no se produjeron cambios en el peso seco de hidrogel respecto al que se encontró después del secado al vacío. En este trabajo, todas las muestras de hidrogel se prepararon con la gelatina de 172 Bloom excepto la muestra que se utilizó para investigar el efecto de la fuerza Bloom en la capacidad de hinchamiento.

2.3. Medición del hinchamiento

La medición del hinchamiento del hidrogel se llevó a cabo de la siguiente forma: se sumergieron piezas de hidrogel en 250 ml de agua destilada. Las muestras de hidrogel hinchado se pesaron después de la eliminación de agua de la superficie utilizando papel de filtro a intervalos de tiempo fijados. Los datos presentados en este experimento fueron los valores medios de mediciones por triplicado. Los resultados se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{W_s}{W_d} \quad (1)$$

Donde W_s es la masa del hidrogel en estado hinchado, W_d es la masa del hidrogel en estado seco y Q es la relación de hinchamiento de equilibrio.

2.4. Influencia de la fuerza Bloom en la propiedad de hinchamiento

Para investigar el efecto de la fuerza Bloom de hinchamiento del hidrogel, se utilizaron tres tipos de gelatinas Bloom diferentes (90, 172 y 300). Se utilizaron los métodos de preparación de hidrogel y medición del hinchamiento descritos en los puntos 2.2. y 2.3. Las piezas de hidrogel se sumergieron en 250 ml de agua destilada a 25°C. Las muestras del hidrogel hinchado se pesaron después de la eliminación de agua de la superficie utilizando papel de filtro. Todas las muestras fueron controladas de esta manera hasta que se alcanzó el equilibrio de hinchamiento.

2.5. Hinchamiento a varias temperaturas

El efecto de la temperatura sobre el hinchamiento se determinó colocando las muestras en seis baños de agua de temperatura controlada y se equilibraron durante 24 h. Se trabajó a 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C y 50°C, respectivamente.

2.6. Hinchamiento a varios valores de pH

Las soluciones con valores de pH ácidos y básicos se prepararon por dilución de NaOH (pH 12,0) y HCl (pH 1,0) para obtener soluciones de pH > 6,0 y pH <6,0, respectivamente. Los valores de pH fueron controlados con un pH-metro (Hanna Bench / pH 211, con una precisión de $\pm 0,01$). Entonces, las relaciones de hinchamiento se

midieron a 25°C y tiempo de equilibrio de 12 h de tal y como se ha explicado en el punto 2.3.

2.7. Hinchamiento con varias soluciones de sal

El hinchamiento del hidrogel se evaluó en soluciones de 0,5 M NaCl, 0,25 M de CaCl₂, 0,167 M de FeCl₃ y 0,167 M de CrCl₃ de acuerdo con el método anteriormente descrito para la medición de hinchamiento en agua destilada. Además, la relación de hinchamiento del hidrogel se midió en diferentes concentraciones de NaCl (de 0,05 a 0,5 M). Las relaciones de hinchamiento se midieron a 25°C y tiempo de equilibrio de 12 h tal y como se ha explicado en el punto 2.3.

2.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se seleccionó una muestra de hidrogel que había sido hinchada en agua destilada en la medición de hinchamiento. Se deshidrató utilizando un liofilizador (Christ Alfa 1-2, Alemania). La muestra deshidratada se trata con nitrógeno líquido y se rompe al azar con el fin de investigar la sección transversal de la muestra. La muestra se examinó utilizando un microscopio electrónico de barrido ambiental (FEI Quanta 200, Holanda) a 20 kV después de bombardeo iónico recubierto con oro.

3. Resultados

3.1. Efecto de la fuerza Bloom

La resistencia del gel es uno de los criterios importantes que determinan la calidad de la gelatina. Indica la dureza, rigidez, la firmeza y la compresibilidad del gel a una temperatura particular y la concentración. Se asocia con el contenido de prolina e hidroxiprolina en gelatina y peso molecular^[10]. En general, una gelatina de alto peso molecular da un valor Bloom alto^[11].

En nuestro experimento, el hidrogel no se podría obtener con la gelatina de 90 Bloom a una concentración de gelatina de 8%. Se supone que el peso molecular juega un papel esencial en la formación de hidrogel reticulado con MTG. Nosotros suponemos que es difícil

desarrollar una red firme de bajo peso molecular de cadenas proteínicas, de forma que un hidrogel no se puede formar. En la figura 1 (a) se muestra el comportamiento al hinchamiento de los hidrogeles de gelatina obtenidas con 300 Bloom y 172 Bloom. Los resultados muestran claramente que la fuerza Bloom tiene una influencia significativa en el comportamiento de hinchamiento de hidrogel. La capacidad de hinchamiento de gel de 172 Bloom (alrededor de 14 en el hinchamiento equilibrio) era mucho más alta que la del gel 300 Bloom (aproximadamente 5 en el hinchamiento de equilibrio). Se observó una baja relación de hinchamiento a fuerza Bloom superior. Esto es probablemente debido a cadenas de gelatina de mayor peso molecular, que son capaces de interactuar entre sí y son propensas a formar una red más compacta, y por lo tanto presentan una menor capacidad de retención de agua. Además, el tiempo de equilibrio de hinchamiento entre los dos geles también fue significativamente diferente. En cuanto al gel de 300 Bloom, el tiempo de equilibrio de hinchamiento era de aproximadamente 4 horas, en comparación con 10 horas del gel de 172 Bloom.

Como se puede observar en la figura 1 (a), el proceso de hinchamiento puede dividirse en dos etapas: el hinchamiento rápido que ocurre antes de las 10 h, y el hinchamiento de equilibrio que ocurre después de 10h. La teoría cinética de hinchamiento de segundo orden propone que la tasa de hinchamiento de un hidrogel es controlada tanto por la difusión de las moléculas del disolvente como por la relajación de cadenas de la macromolécula^[12], es decir, la tasa de hinchamiento es directamente proporcional al cuadrado de la capacidad de hinchamiento restante $(Q_e - Q)^2$. Así:

$$\frac{dQ_t}{dt} = K(Q_e - Q_t)^2 \quad (2)$$

La ecuación (2) está integrada entre los límites $Q = 0$, donde $t = 0$ y Q para t y reordenado. La ecuación de Schott se obtiene:

$$\frac{t}{Q_t} = \frac{t}{Q_e} + \frac{1}{K \square Q_e^2} \quad (3)$$

Donde Q_t es la relación de hinchamiento del

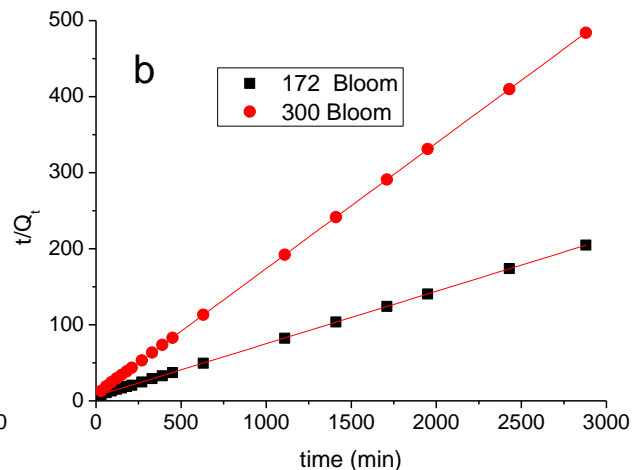
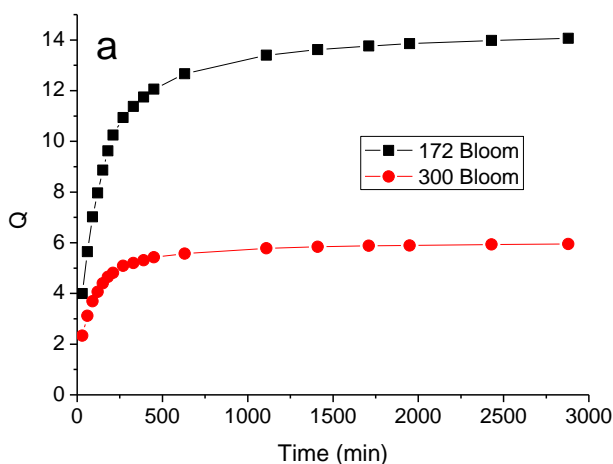


Fig.1 La relación de hinchamiento Q (a) y t/Q_t (b) de los hidrogeles a base de gelatina obtenida con gelatinas de diferentes fuerzas Bloom versus el tiempo de hinchamiento.

3.2. Cinética de hinchamiento

gel en el tiempo t , y Q_e es la relación de hinchamiento de equilibrio del hidrogel. K es la constante de velocidad.

La figura 1 (b) muestra las gráficas de t / SR como una función del tiempo t en tres tipos de soluciones salinas. La cinética de hinchamiento de los hidrogeles a base de gelatina concuerda con la ecuación de Schott (3).

3.3. Efecto de la temperatura

En la figura 2 (a) y figura 2 (b) se observa el efecto de la temperatura sobre la relación de equilibrio entre el hinchamiento y el peso en agua destilada del hidrogel 172 Bloom. La tasa de equilibrio del hinchamiento es significativamente diferente en el intervalo de temperatura investigado. Los resultados indican que la relación de hinchamiento aumenta con el aumento de la temperatura. Además, en la figura 2 (a) y figura 2 (b) también se puede observar que la tasa de hinchamiento no es afectada significativamente cuando la temperatura excede los 30°C. Por otro lado, la curva de hinchamiento a temperatura más baja (25°C - 30°C) muestra una tasa mucho menor de hinchamiento. Los resultados observados se pueden explicar por el hecho de que cuando aumenta la temperatura hasta 30°C, la capacidad de absorción de agua aumenta significativamente debido a un aumento de la movilidad segmental de las cadenas de hidrogel. Varios estudios anteriores^[13, 14] han investigado que el gel de la gelatina implica la formación de secuencias helicoidales triples

conectadas de una manera esencialmente aleatoria de secuencias de péptidos en conformación desordenada. Las cadenas de gelatina en hidrogel pueden revertir parcialmente a la triple hélice tropocolagénica, de forma desordenada a un estado bastante ordenado, dependiendo de la temperatura, la concentración y la velocidad de enfriamiento. Este fenómeno ocurre generalmente alrededor de 28°C, donde se observa la transición a hélice. Cuando se introdujo el MTG, se formó el enlace covalente cruzado entre los grupos γ -carboxiamida de los residuos de glutamina y los grupos ϵ aminoácidos de los residuos de lisina. Así, el hidrogel de gelatina resultante se compone de enlaces cruzados tanto física como químicamente. El resultado es que las partes de cualquiera de las tres cadenas o dos cadenas^[15] se estabilizan principalmente a través de enlaces de hidrógeno, formando así una red física básica acoplada a la covalente (Fig. 3, izquierda). Si se aumenta la temperatura a 30°C, los enlaces de hidrógeno dentro de la triple hélice tropocolagénica se rompen (Fig. 3, derecha), y la mayor parte de la triple hélice desaparece. Por lo tanto, las cadenas de hidrogel se vuelven más móviles y el hinchamiento de hidrogel incrementa.

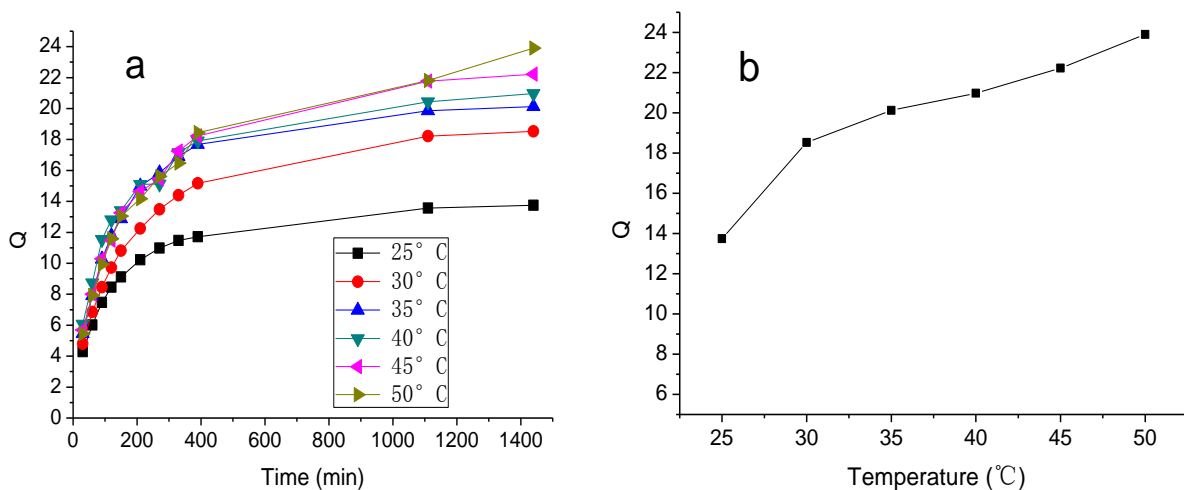


Fig. 2 El efecto de la temperatura sobre la relación de equilibrio del hinchamiento en agua destilada. (a): Comportamiento al hinchamiento de los hidrogeles a diferentes temperaturas. (b): Viabilidad del hinchamiento en agua destilada durante 24 horas a temperaturas diferentes.

Sin embargo, con el aumento de la temperatura de 30°C a 50°C, las cadenas de hidrogel deben haber adquirido relajación completa, de modo que con un aumento adicional de la

temperatura, no se aflojan y, como consecuencia, no se observó ningún cambio apreciable en el comportamiento de hinchamiento a una temperatura superior.

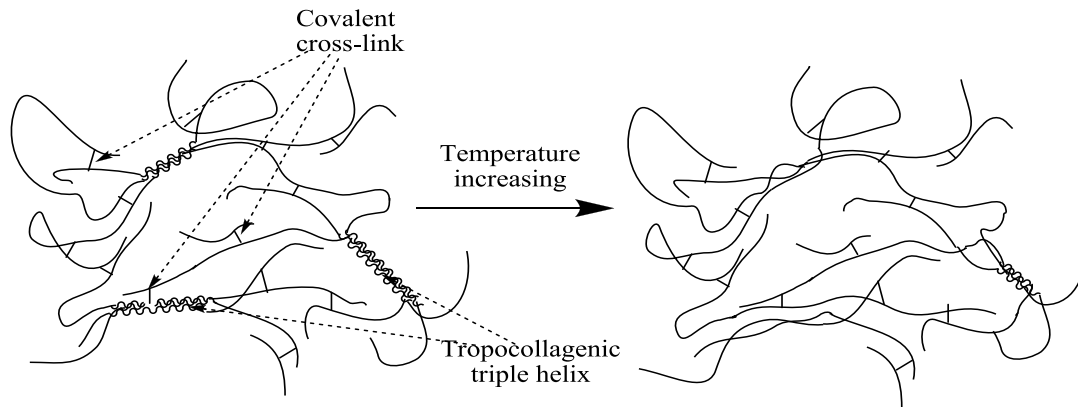


Fig.3 Esquema que ilustra una red de hidrogel de gelatina.

3.4 Efecto del pH

Los hidrogeles iónicos muestran cambios de hinchamiento en una amplia gama de valores de pH, dado que la capacidad de hinchamiento de todos los hidrogeles iónicos disminuye apreciablemente por la adición de iones contrarios al medio de hinchamiento^[16], sin ninguna solución tampón. Por lo tanto, se prepararon una serie de soluciones con valores de pH ácidos y básicos por dilución de soluciones de NaOH (pH 12.0) y HCl (pH 1.0) para conseguir un pH > 6,0 y un pH <6,0, respectivamente.

La figura 4 muestra el efecto del pH sobre la relación de hinchamiento del hidrogel. Los resultados indican claramente que el hidrogel muestra un fuerte hinchamiento en el medio a pH <2 y pH > 8, mientras que el hidrogel muestra un bajo hinchamiento en el medio entre pH 3 a pH 7.

Un hidrogel de gelatina polianfótera reticulada con MTG presenta una red que contiene grupos ionizantes positivos y negativos. En medio ácido, actúa como base y la gelatina toma iones H⁺ del medio formando grupos -

La relación de hinchamiento se relaciona principalmente con las características de la solución externa, como puede ser la carga, la fuerza iónica y la naturaleza del polímero, es decir, la elasticidad de la red, la presencia de grupos funcionales hidrófilos, y el grado de densidad de reticulación^[17].

En este estudio, se ha observado el efecto de los electrolitos mediante la adición de sales univalentes a la solución externa con un intervalo de concentración 0,05 M a 0,5 M y los resultados se representan en la figura 5. Se

NH₃⁺ y grupos -COOH, de forma que las proteínas se cargan positivamente. En medio alcalino, la proteína actúa como un ácido dando grupos H⁺, formando grupos -COO⁻ y grupos -NH₂, de forma que las proteínas se cargan negativamente.

En un ambiente ácido, el hinchamiento está controlado principalmente por el grupo -NH₃⁺, en medio básico por el grupo COO⁻, y entre pH 3,0 y 7,0 por los grupos -NH₃⁺ y COO⁻. En la figura 4, podemos observar que en medio básico el hinchamiento es mayor; este comportamiento se debe a la presencia de los grupos funcionales hidrófilos (principalmente COO⁻) en la estructura de gelatina. Además, los hidrogeles de gelatina comienzan a hidrolizarse a un pH cercano a 11,0, dando grupos carboxilo, que también producen el aumento de hinchamiento. El hinchamiento a pH 12 no se puede observar en la figura 4 porque el grado de hidrólisis de la muestra de hidrogel era demasiado elevado para medir el hinchamiento con precisión.

3.5 Efecto de las sales

puede señalar que la relación de hinchamiento del hidrogel aumenta en el intervalo de concentración investigado. Esta situación entre el hidrogel hinchado y la fase acuosa circundante se describe generalmente como un equilibrio de Donnan, donde la red del biopolímero actúa como su propia membrana^[18, 19] evitando así la difusión de los grupos ionizantes enlazados hacia la fase acuosa. Por lo tanto, la presión osmótica resultante de la diferencia de concentración de iones móviles entre el gel y la fase acuosa

aumenta en un cierto rango de concentración de NaCl, y, en consecuencia, aumenta la relación de hinchamiento. Un aumento similar

también ha sido aportado por Baker^[20] y Bajpai^[21] en los hidrogeles basados en acrilamida anfótera y no iónica.

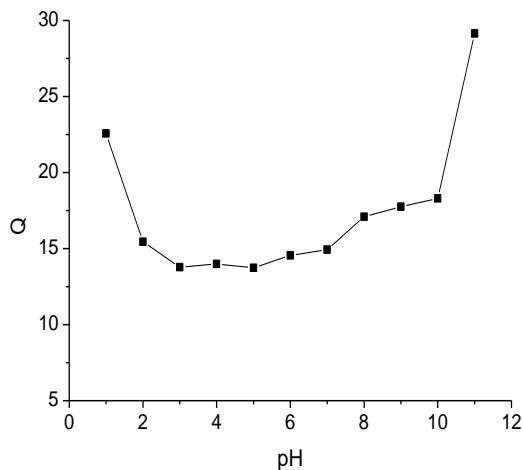


Fig.4 Efecto del pH de las soluciones en la capacidad de hinchamiento del hidrogel a 25°C durante 12 h.

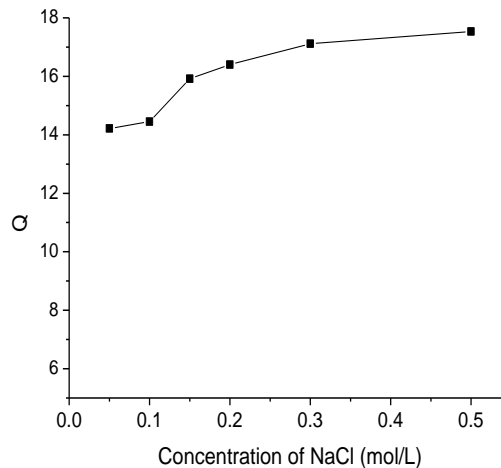


Fig.5 Hinchamiento del hidrogel en una solución de NaCl con un intervalo de concentración 0,05 M a 0,5 M. a 25°C durante 12 h.

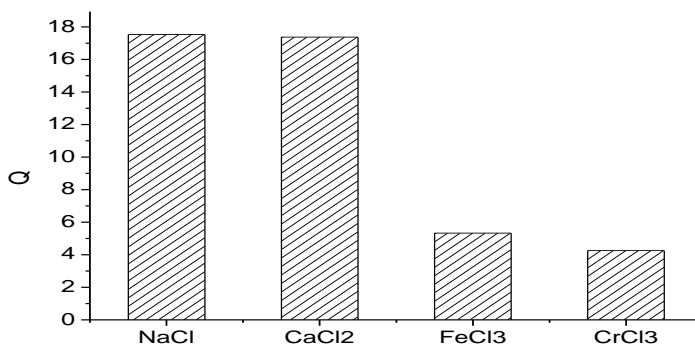


Fig.6 Capacidad de hinchamiento de hidrogel en diferentes soluciones salinas a 25°C durante 12 h.

El efecto del tipo de catión (cationes con radio diferente y carga) sobre el comportamiento de hinchamiento se muestra en la figura 6. A partir de estos datos, un efecto distinto en la relación de hinchamiento se puede observar para los cationes trivalentes (FeCl₃, CrCl₃) comparado con el efecto de un catión monovalente (NaCl) y un catión divalente (CaCl₂). El efecto electrostático y la reticulación iónica son las principales explicaciones de la fuerte pérdida de

hinchamiento^[17]. El efecto electrostático de la sal puede debilitar la interacción electrostática del hidrogel y el deshinchamiento del hidrogel, causando una repulsión electrostática anión-anión^[22]. Al igual que en la reticulación iónica, los hidrogeles de gelatina que contienen grupos carboxílicos pueden quelar con cationes multivalentes, tales como iones Cr³⁺ y Fe³⁺, lo que conduce a la contracción de la red y disminuye la porosidad de la red de gel, por lo tanto, produce un deshinchamiento de los

hidrogeles. Se puede observar en la figura 6 que el catión CaCl_2 no afecta significativamente al comportamiento de hinchamiento de hidrogel, y la relación de hinchamiento es ligeramente mayor que en agua destilada. Además, la relación de hinchamiento aumenta cuando el intervalo de concentración de NaCl es de 0,05 M a 0,5 M. Por lo tanto, el efecto de la reticulación iónica actúa como un factor más eficaz contra el hinchamiento respecto el efecto electrostático del catión.

3.6 Morfología del hidrogel

Las características morfológicas de las muestras liofilizadas del hidrogel hinchado

con agua se observó por microscopía electrónica de barrido. La muestra mostró una estructura de red relativamente regular con $20\mu\text{m}$ de tamaño de poro conectados entre sí, como se muestra en la figura 7. Se supone que los poros son las regiones de permeación de agua y sitios de interacción con los grupos hidrófilos de las cadenas de hidrogel. Estas imágenes verifican que el hidrogel a base de gelatina reticulado con MTG tiene una estructura porosa, que asegura la capacidad de hinchamiento del hidrogel de gelatina.

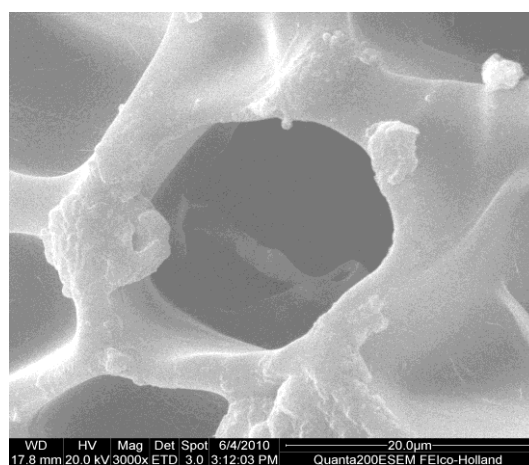
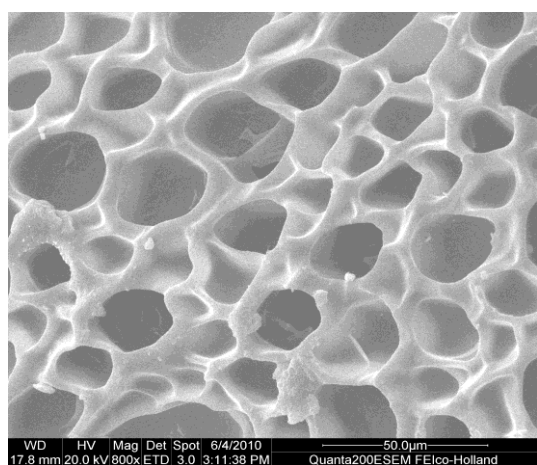


Fig.7 Escaneo de las secciones transversales del hidrogel hinchado liofilizado mediante microscopía electrónica de barrido. A la izquierda: $800\times$; derecha: $3000\times$

los hidrogeles a base de gelatina concuerda con la ecuación de Schott. Debido a la estructura de la triple hélice tropocolagénica incluida en el hidrogel a base de gelatina, el hinchamiento del hidrogel incrementa significativamente cuando se aumenta la temperatura de 25°C a 30°C . La curva de hinchamiento en función del pH a 25°C es de silla de montar, y en medio básico el hinchamiento es mayor debido a la presencia de los grupos funcionales hidrófilos y la hidrólisis de los hidrogeles de gelatina. Un aumento en la fuerza iónica (NaCl) del medio de hinchamiento de 0,05 M a 0,5 M dio como resultado un aumento en el grado de hinchamiento. Además, la influencia de cationes trivalentes (FeCl_3 , CrCl_3) en relación

al hinchamiento, es más importante que el producido por los cationes monovalentes (NaCl) y divalentes (CaCl_2) debido a la reticulación iónica. El hidrogel a base de gelatina presenta una cierta capacidad de hinchamiento debido a la alta porosidad y la interconexión entre algunos de los poros dentro del hidrogel tal y como se ha verificado a través de las imágenes SEM.

Bibliografia:

- [1]. Kopeček, J., Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*, 2007. 28(34): p. 5185-5192.
- [2]. Yin, H., et al., Toxicity evaluation of biodegradable and thermosensitive PEG-PCL-PEG hydrogel as a potential in situ sustained ophthalmic drug delivery system. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010. 92(1): p. 129-37.
- [3]. Gong, C.Y., et al., Biodegradable in situ gel-forming controlled drug delivery system based on thermosensitive PCL-PEG-PCL hydrogel: part 1--Synthesis, characterization, and acute toxicity evaluation. *J Pharm Sci*, 2009. 98(12): p. 4684-94.
- [4]. Martins, V.G., et al., Chemical Modification and Structural Analysis of Protein Isolates to Produce Hydrogel using Whitemouth Croaker (*Micropogonias furnieri*) Wastes. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011.
- [5]. Lee, J., et al., Enhanced regeneration of the ligament-bone interface using a poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) scaffold with local delivery of cells/BMP-2 using a heparin-based hydrogel. *Acta Biomater*, 2011. 7(1): p. 244-57.
- [6]. Kumar, P.T., et al., Synthesis, characterization and cytocompatibility studies of alpha-chitin hydrogel/nano hydroxyapatite composite scaffolds. *Int J Biol Macromol*, 2011. 49(1): p. 20-31.
- [7]. Chvapil, M., Collagen sponge: theory and practice of medical applications. *J Biomed Mater Res*, 1977. 11(5): p. 721-41.
- [8]. Hu, B.H. and P.B. Messersmith, Rational design of transglutaminase substrate peptides for rapid enzymatic formation of hydrogels. *J Am Chem Soc*, 2003. 125(47): p. 14298-9.
- [9]. Folk, J.E., Transglutaminase (guinea pig liver). *Method in Enzymology*, ed. H.A.C.W. Tabor. 1970, New York: Academic Press. 889-894.
- [10]. Choi, S.S.R.J., Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. *Journal of Food Science*, 2000. 65: p. 194-199.
- [11]. Lim, Y. and A. Mohammad, Physicochemical Properties of Mammalian Gelatin in Relation to Membrane Process Requirement. *Food and Bioprocess Technology*, 2011. 4(2): p. 304.
- [12]. Zhao, Y., et al., Swelling behavior of ionically cross-linked polyampholytic hydrogels in varied salt solutions. *Colloid & Polymer Science*, 2007. 285(12): p. 1395.
- [13]. Crescenzi, V., A. Francescangeli and A. Taglienti, New gelatin-based hydrogels via enzymatic networking. *Biomacromolecules*, 2002. 3(6): p. 1384-91.
- [14]. Ross-Murphy, S.B., Structure and rheology of gelatin gels: recent progress. *Polymer*, 1992. 33(12): p. 2622-2627.
- [15]. A., D.J., et al., Characterization of cross-linked polyampholytic gelatin hydrogels through the rubber elasticity and thermodynamic swelling theories. *Polymer*, 2009. 50(25): p. 6065-6075.
- [16]. Pourjavadi, A., B. Farhadpour and F. Seidi, Synthesis and investigation of swelling behavior of new agar based superabsorbent hydrogel as a candidate for agrochemical delivery. *Journal of Polymer Research*, 2009. 16(6): p. 655.
- [17]. A. Pourjavadi, M.K., Collagen-based highly porous hydrogel without any porogen: Synthesis and characteristics. *European Polymer Journal*, 2007. 43: p. 877-889.

- [18]. Gary M. Eichenbaum, P.F.K.A., Investigation of the Swelling Response and Loading of Ionic Microgels with Drugs and Proteins: The Dependence on Cross-Link Density. *Macromolecules*, 1999. 32 (15): p. 4867–4878.
- [19]. English, A.E., T. Tanaka and E.R. Edelman, Polyelectrolyte hydrogel instabilities in ionic solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 1996. 105(23): p. 10606-10613.
- [20]. Baker, J.P., H.W. Blanch and J.M. Prausnitz, Swelling properties of acrylamide-based ampholytic hydrogels: comparison of experiment with theory. *Polymer*, 1995. 36(5): p. 1061-1069.
- [21]. Bajpai, A.K. and M. Shrivastava, DYNAMIC SWELLING BEHAVIOR OF POLYACRYLAMIDE BASED THREE COMPONENT HYDROGELS. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 2000. 37(9): p. 1069–1088.
- [22]. Sadeghi, M., Synthesis and Swelling Behaviors of graft copolymer Based on Chitosan-g-poly(AA-co-HEMA). *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2010. 1(4): p. 354-358.

Acknowledgements

The authors would like to thank the funding of Shandong Provincial Outstanding Youth Scholar foundation for Scientific Research (Grant No.2009BSB01053) and Shandong Provincial Education Department Program (Grant No. J11LB10)